

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Martin Bauer**

Přepínání fenotypů a diferenciaci buněk u kvasinky *Cryptococcus neoformans*

Phenotypic switching and cell differentiation in yeast *Cryptococcus neoformans*

Bakalářská práce

Školitel:

Mgr. Martin Kuthan, Ph.D.

**Praha, 2019**

## **Poděkování**

Děkuji svému školiteli Mgr. Martinu Kuthanovi, Ph.D. za pomoc a rady při psaní této práce.

Také děkuji Bc. Anně Pavlů za pomoc při práci s informačními databázemi a za technickou podporu.

## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 10. 5. 2019

Podpis

## ABSTRAKT

*Cryptococcus neoformans* je oportunně patogenní kvasinkou zapříčiňující kolem 600 000 úmrtí ročně. Její schopnost vyvolat chronickou infekci je dána mimo jiné výskytem různých morfologických forem. Tyto formy se liší v buněčných strukturách a mechanismech ovlivňujících virulenci a majících vliv na odolnost vůči stresovým faktorům, jimž je tento patogen v hostiteli vystaven. V práci jsou nejprve popsány molekulární mechanismy tvorby povrchových struktur ovlivňujících virulenci. Dále jsou představeny některé důležité morfotypy objevující se při infekci. Zároveň je představen pseudohyální morfotyp, který je hypovirulentní, ale je zajímavý modifikací signalizace, která jej navozuje. Popsané dráhy pak představují možné cesty regulace faktorů virulence, tedy signalizace vedoucí k projevu jednotlivých morfotypů. Pochopení těchto signalizačních drah by pak mohlo zlepšit možnosti vývoje nových léčiv, jelikož těm současným *Cryptococcus neoformans* ve velké míře odolává.

**Klíčová slova:** *Cryptococcus neoformans*, přepínání fenotypů, titánské buňky, diferenciaci buněk, virulence, Vad1, Rim101, Usv101, RAM

## ABSTRACT

*Cryptococcus neoformans* is an opportunistic pathogenic yeast causing around 600 000 deaths annually. Its ability to cause a chronic infection is given by the emergence of different morphotypes. These morphotypes differ in cell structures and mechanisms (virulence factors) which have an influence on the resistance to stress factors encountered in the host. This work first describes molecular mechanisms of formation of these virulence factors. Next, it presents morphotypes occurring during infection and the hypovirulent pseudohyphal morphotype. However, this morphotype is interesting because of a modification in the signalisation leading to its manifestation. Finally, described signalling pathways present possible ways of regulating the virulence factors, and so the manifestation of different morphotypes. Understanding these signalling pathways could ultimately lead to improving the development of new drugs, given that *Cryptococcus neoformans* is highly resistant to the existing ones.

**Keywords:** *Cryptococcus neoformans*, phenotypic switching, titan cells, cell differentiation, virulence, Vad1, Rim101, Usv101, RAM

# OBSAH

<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....</b>	<b>V</b>
<b>1 ÚVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2 FAKTORY VIRULENCE .....</b>	<b>3</b>
2.1 Buněčná stěna.....	4
2.2 Kapsule.....	4
2.3 Melanizace.....	8
<b>3 FENOTYPOVÉ PŘEPÍNÁNÍ .....</b>	<b>8</b>
3.1 Mukoidní morfotyp .....	10
3.2 Pseudohyální morfotyp .....	11
<b>4 TITÁNSKÉ BUŇKY .....</b>	<b>12</b>
<b>5 SIGNALIZACE SPOJENÉ SE ZMĚNAMI FENOTYPU .....</b>	<b>13</b>
5.1 cAMP/PKA signalizace.....	14
5.2 Signalizace spojené s MAP-kinasami .....	16
5.2.1 Feromonová signalizace .....	16
5.2.2 PKC/Mpk1 – Teplotní sensitivita.....	17
5.2.3 HOG – osmotický stres .....	18
5.3 RAM signalizace .....	19
5.4 TOR signalizace .....	19
5.5 Efektory signálních drah .....	20
5.5.1 Transkripční faktor Rim101 .....	21
5.5.2 Transkripční faktor Usv101.....	22
<b>6 ZÁVĚR .....</b>	<b>23</b>
<b>7 ZDROJE .....</b>	<b>25</b>

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

### Seznam zkratek

BS – buněčná stěna

C – pilovitý fenotyp

cAMP – cyklický adenosin monofosfát

CME – kryptokoková meningoencefalitida

ER – endoplasmatické retikulum

GA – Golgiho aparát

GAP – GTPase Activating Protein

GDP – guanosin difosfát

GTP – guanosin trifosfát

GlcpA – glukopyranosyluronová kyselina

GXM – glukuronoxylomanan

GXMGal – galaktoxylomanan

HOG – high osmolarity glycerol, signalizační dráha

IS – imunitní systém

MAPK – mitogen-activated protein kinase

MAPKK – mitogen-activated protein kinase kinase

MAPKKK – mitogen-activated protein kinase kinase kinase

### Geny a proteiny

Ada2 – SAGA acetyltransferasa

Ags1 –  $\alpha$ -glukan syntasa

All1/2 – allergen 1/2

Amt1/2 – permeasa amonných iontů

Bck1 – MAPKKK PKC/Mpk1 dráhy

Cac1 – adenylát cyklasa

Cac2 – chromatin assembly complex 2

Can2 – karbon anhydrasa

MC – mukoidní fenotyp

MTL – mating type locus

PA – pantotenová kyselina

PAK – p21 aktivovaná kinasa

Pal/Rim – pH responsivní dráha

PH – pseudohyální fenotyp

PI-3-K – fosfoinositol-3-kinasa

PKA – cAMP dependentní protein kinasa A

PKC – protein kinasa C

PLC – fosfolipasa C

RAM – regulation of Ace2 and morphogenesis, signální dráha

SM – hladký fenotyp

SREB – dráha odpovědi na hypoxii

SRG – Structural Reported Group

TF – transkripční faktor

TOR – target of rapamycin, signální dráha

UDP – uridin difosfát

UPP – ubiquitin proteasome pathway

WR – zvrásněný fenotyp

$\Delta$  – označení delece příslušného genu

---

Cas1 – 6-O-acetyltransferasa

Cda1/2/3 – chitin deacetylasa

Cir1 – protein vnímající hladinu železa

Crz1/Sp1-like (Sp1) – transkripční faktor, efektor SREB dráhy

Csr2 – regulátor chitin syntasy

Ctr1/4 – transportér měďnatých iontů

Cxt1 –  $\beta$ (1,2)-xylosyl transferasa

Dig1/2 – inhibitor Ste12 u *S. cerevisiae*

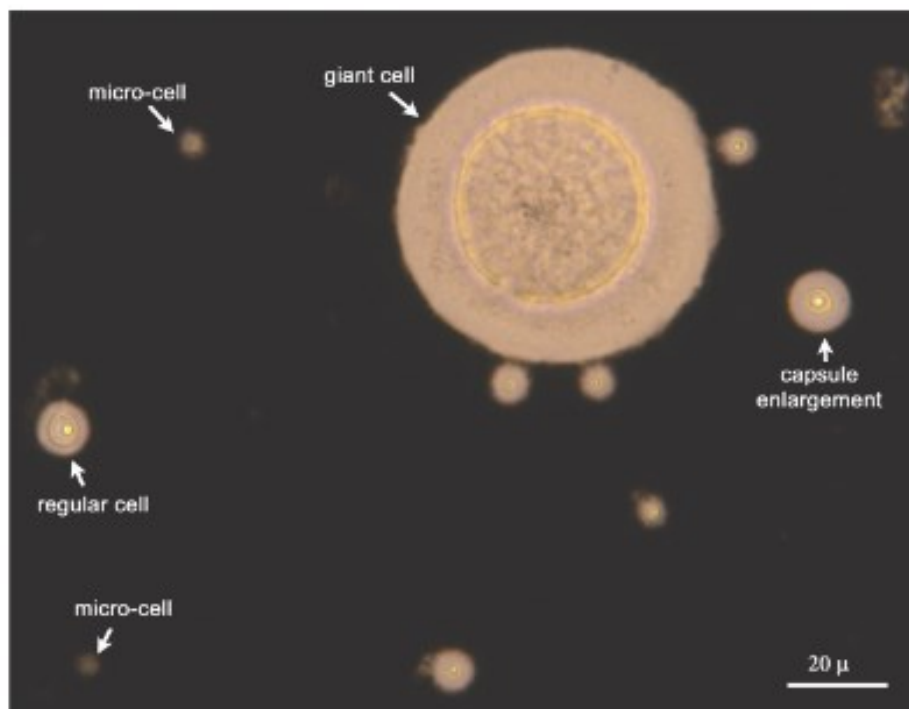
EFG1 – gen kontrolující fenotypové přepínání u *Candida albicans*

Fks1 –  $\beta$ -glukan syntasa  
 Gas1 –  $\beta$ -glukanasa  
 Gat201 – transkripční faktor regulovaný PKA  
 Gpa1/2/3 –  $\alpha$  podjednotky trimerního G-proteinu  
 Gpb1 –  $\beta$  podjednotka trimerního G-proteinu  
 GPCR – G-protein coupled receptor  
 Gpr4/5 – GPCR receptory vnímající koncentraci živin  
 Hog1 – MAPK HOG dráhy  
 Hym1 – protein asociující s Kic1 u *S. cerevisiae*  
 Chs3/8 – chitin syntasa  
 KIC1 – gen pro kinasu fosforylující Orb6  
 Kre6 – enzym účastnící se syntézy  $\beta$ -glukanu  
 Lac1/2 – lakasa  
 LMP1 – gen pro hypotetický protein  
 MAN1 – gen pro enzym syntézy GDP-manosy  
 Mkk1/2 – MAPKK PKC/Mpk1 dráhy  
 MOB2 – gen pro protein asociující s Orb6  
 Mpf3 – GPI-protein stimulující T-buňky  
 Mpk1 – MAPK PKC/Mpk1 dráhy  
 Msb2 – membránový sensor HOG dráhy  
 Not1 – globální represor transkripce  
 Nrg1 – transkripční faktor, cíl PKA  
 Orb6 – efektorová kinasa RAM signalizace  
 Pbs2 – MAPKK HOG dráhy  
 Pck1 – fosfoenolpyruvát kinasa  
 Pka1/2 – katalytická podjednotka PKA  
 Pkr1 – regulační podjednotka PKA  
 Plc1 – fosfolipasa C1  
 Plb1 – fosfolipasa B1  
 Qsp1 – quorum sensing protein  
 Rim101 – transkripční faktor, cíl PKA  
 Scp1 – protein SREB dráhy  
 SGF29 – gen pro transkripční faktor vázající histon deacetylasu  
 Sho1 – membránový sensor HOG dráhy *S. cerevisiae*  
 Skn1 – enzym účastnící se syntézy  $\beta$ -glukanu  
 Sln1/Ypd1/Ssk1 – osmosensorický komplex HOG dráhy *S. cerevisiae*  
 SOG2 – gen pro protein asociující s Kic1  
 Sre1 – produkt genu SREBP  
 Ssk2 – MAPKKK HOG dráhy  
 Ste3 – feromonový receptor  
 Ste4 – protein feromonové signalisace *S. cerevisiae*  
 Ste11/12/20 – proteiny feromonové signalizace *C. neoformans*  
 Ste18 – protein feromonové signalisace *S. cerevisiae*  
 STL1 – sugar transporter like protein  
 Stp1 – protein SREB dráhy  
 Swi6 – protein regulace buněčného cyklu  
 TAO3 – gen pro scaffold protein RAM dráhy  
 Tco1 – histidinová kinasa SREB dráhy  
 Tor1 – protein kinasa TOR dráhy  
 Tuf1 – elongační faktor v syntéze mitochondriálních proteinů  
 UGD1 – gen pro enzym syntézy UDP-glukuronové kyseliny  
 UGE1 – gen pro enzym syntézy UDP-galaktosy  
 Usv101 – transkripční faktor, možný klíčový regulátor virulence  
 UXS1 – gen pro enzym syntézy UDP-xylosy  
 Vad1 – DEAD-box RNA helikasa  
 WOR1 – gen kontrolující fenotypové přepínání u *Candida albicans*

# 1 ÚVOD

*Cryptococcus neoformans* je kvasinková houba ze třídy Tremellomycetes patřící do kmene Basidiomycota (Blackwell, Vilgalys et al. 2012). Je primárně volně žijící kvasinka běžně nacházená na ptačích, a zejména holubích, exkrementech nebo v jejich hnízdech. Ve svém přirozeném prostředí se setkává se svými přirozenými predátory, kterými mohou být *Acanthamoeba castellani* (Steenbergen, Shuman et al. 2001) nebo *Dictiostelium discoideum* (Steenbergen, Nosanchuk et al. 2003). Selekcí tlak vyvolaný prostředím a těmito predátory umožnil vývoj různých přizpůsobení, která kvasinice *C. neoformans* umožnila začít využívat novou niku, prostředí hostitele. Těmito faktory jsou polysacharidová kapsule obalující buněčnou stěnu (BS), melanizace BS a schopnost růstu při zvýšené teplotě. U kvasinky *C. neoformans* se také vyvinuly mikroevoluční mechanismy, které jí umožňují se rychle a efektivně přizpůsobit měnícímu se prostředí pomocí regulace faktorů virulence.

U *C. neoformans* tedy lze pozorovat několik buněčných forem s rozdílnou fitness v různých prostředích. Jsou jimi kvasinkové buňky, hyfy, pseudohyfy, staré nedělící se buňky, titánské buňky a mikro buňky a několik buněčných forem v rámci fenotypového přepínání. Některé tyto formy ukazuje Obrázek 1.



Obrázek 1 - Vzhled některých buněčných forem pozorovaných u *C. neoformans*; buňky izolované z plic nakažené myši, barvení pomocí India Ink; převzato z (Zaragoza 2011)

U většiny zdravých hostitelů je infekce kvasinkou *C. neoformans* typicky potlačena činností imunitního systému, pokud však hostitel trpí nějakou z forem imunodeficiency, v současnosti nejčastěji AIDS, může se šířit po těle a způsobit závažnou kryptokokovou meningoencefalitidu (CME). Šíření z plic do mozku je zprostředkováno makrofágy, které kvasinku fagocytují a pak přecházejí do krevního oběhu (Miyazato 2016). Výše zmíněné faktory virulence totiž *C. neoformans* umožní uvnitř makrofága přežít a nechat se jím zanést do kapilár zásobujících mozek, kde kvasinka makrofága opustí a následně překonává hematoencefalickou bariéru.

K infikování dochází převážně vdechnutím bazidiospor vznikajících na bazidiích. Molekulární mechanismy řídící hyfový růst a tvorbu spor jsou velmi dobře popsány jinde (viz přehledy (Fu, Sun et al. 2015) nebo (Hull and Heitman 2002)) a nejsou předmětem této práce. Vyklíčené spory se pak v hostiteli množí asexuálně za vzniku klonálních populací, sexuální rozmnožování a hyfový růst v hostiteli neprobíhá.

Fenotypové přepínání je fenoménem poprvé objeveným u *Candida albicans*. V populacích *in vitro* i *in vivo* dochází u některých buněk ke spontánním změnám ve fenotypu. Tyto změny však nastávají s frekvencí vyšší, než je předpokládaná frekvence vzniku mutací. Jsou dědičné, ale s obdobnou frekvencí dochází i k jejich reverzi. Mimo to je počet různých pozorovaných fenotypů malý. Seleční tlak pak může vést k převládnutí subpopulace s přepnutým fenotypem. V případě přepínání fenotypů u kvasinky *C. albicans* jde o trimorfní white-gray-opaque systém (Bommanavar, Gugwad et al. 2017), který je řízený zpětnovazebnou transkripční smyčkou tvořenou transkripčními faktory EFG1 a WOR1 (Noble, Gianetti et al. 2016).

Systém fenotypového přepínání *C. neoformans* zahrnuje pět fenotypů (smooth, mucoid, wrinkled, serrated, pseudohyphal) rozlišených vnějším a/nebo vnitřním vzhledem kolonie. Mechanismy řídící fenotypové přepínání u *C. neoformans* jsou stále z velké části neznámé, ač jsou možné podobnosti se systémy přepínání jiných kvasinek. Dále tedy v rámci fenotypového přepínání bude věnována pozornost hlavně kvalitativnímu popisu některých lépe poznaných fenotypů, tedy mukoidního a pseudohyfálního.

Titánské buňky jsou nedávno objeveným buněčným morfotypem, o kterém bylo záhy zjištěno, že je velmi významný při chronické infekci. Tím se dostal do centra pozornosti ve výzkumu životního cyklu a patogenicity *C. neoformans*. Mimo to byly pozorovány také „mikro buňky“ (Zaragoza 2011), ty však v této práci popsány nebudou.

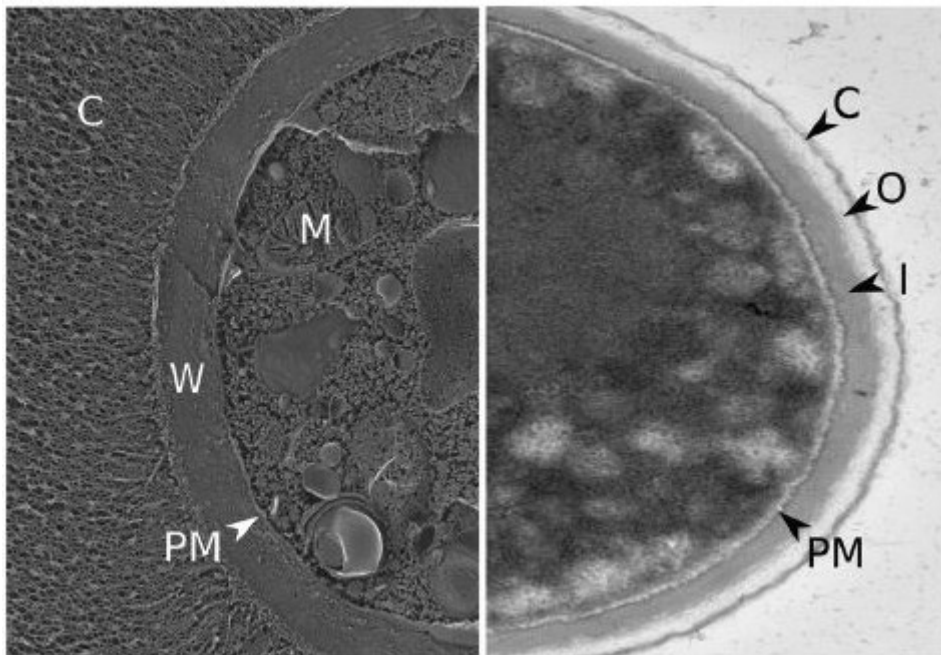


V dalších kapitolách bude nejprve popsána morfologie buněk, dále pak změny v rámci různých morfotypů a molekulární mechanismy, které by za těmito změnami mohly stát. Tato poznání jsou důležitá jednak pro poznání *C. neoformans* jako takového a jednak pro vývoj nových účinnějších léčiv pro pacienty trpící CME, mezi kterými je stále velmi vysoká mortalita.

Cílem této práce je tedy nabídnout současný přehled znalostí o regulaci fenotypového přepínání a diferenciaci buněk kvasinky *C. neoformans*.

## 2 FAKTORY VIRULENCE

Jako faktory virulence zde budou označovány buněčné struktury, jež svými vlastnostmi umožňují infekci hostitele (kapsule a buněčná stěna, která je pro kapsuli nezbytná) a mechanismy, které je regulují v nepříznivých podmínkách (například udržení integrity BS při zvýšené teplotě nebo jiném stresu).



Obrázek 2 – Vnější obaly *C. neoformans*. C – kapsule; O – vnější vrstva BS; I – vnitřní vrstva BS; PM – plasmatická membrána, M – mitochondrie, W – buněčná stěna; vpravo v podmínkách neindukujících kapsuli, vlevo v podmínkách indukujících kapsuli; převzato a citováno z (Agustinho, Miller et al. 2018)

## 2.1 Buněčná stěna

Buněčná stěna (BS) se běžně jako faktor virulence neuznává, pro potřeby této práce a z důvodu její nezbytnosti pro manifestaci kapsule však bude mezi faktory virulence zařazena.

Buněčná stěna *C. neoformans* je rozlišena na vnitřní vrstvu (skládající se z  $\beta$ -glukanů, chitinu a chitosanu) a vnější vrstvu (obsahující hlavně  $\beta$ - a  $\alpha$ -glukany). Mimo to se v obou vrstvách nachází i glykoproteiny a pigment melanin. (Agustinho, Miller et al. 2018)

Majoritním polysacharidem celé BS je lineární  $\beta(1,3)$ -glukan prokřížovaný kratšími jednotkami  $\beta(1,6)$ -glukanu.  $\beta(1,6)$ -glukan se váže i na chitin nebo glykoproteiny. Glykoproteiny jsou na povrch transportovány ukotvené v membráně pomocí GPI-kotvy a až později přeneseny na polysacharid (Agustinho, Miller et al. 2018). Mezi tyto glykoproteiny patří například  $\beta$ -glukanasa (Gas1) (Eigenheer, Jin Lee et al. 2007) nebo fosfolipasa B1 (Plb1) (Maruvada, Zhu et al. 2012). Hrají důležitou roli v sestavování a remodelaci BS, některé dokonce modifikují odpověď T-buněk hostitelského imunitního systému (Specht and Levitz 2006). Třetím typem polysacharidu BS je  $\alpha(1,3)$ -glukan, který slouží k připojení polysacharidů kapsule (Agustinho, Miller et al. 2018).

Syntéza  $\alpha(1,3)$ -glukanů je zajištěna  $\alpha$ -glukan-syntasou (Ags1) z jednotek UDP-glukosy.  $\beta(1,3)$ -glukan je syntetizován  $\beta$ -glukan syntasou Fks1. Syntézu  $\beta(1,6)$ -glukanu by mohly zajišťovat syntasy Kre6 a Skn1 (Agustinho, Miller et al. 2018).

Syntézu chitinu z UDP-N-acetylglukosaminu zajišťuje chitin syntasa (např. Chs3) ve spolupráci se svým regulátorem Csr2. Chitosan pak vzniká deacetylací chitinu pomocí chitin deacetylas (Cda1, Cda2, Cda3) (Doering 2009).

## 2.2 Kapsule

Kapsule je velmi důležitým faktorem virulence – přichází do kontaktu s prostředím hostitele a její polysacharidy mohou být značně imunogenní. Dále ovlivňuje, v jaké míře jsou buňky *C. neoformans* fagocytovány makrofágy, a zamezuje lyzi buňky, která by nastala v důsledku činnosti komplementového systému (Zaragoza, Rodrigues et al. 2009). Kapsule zároveň prochází významnými změnami při přechodu mezi různými fenotypy.

Kapsule je tvořena polysacharidem glukuronoxylomananem (GXM, 90-95 %), minoritním polysacharidem galaktoxyloomananem (GXMGal) (Turner, Cherniak et al. 1984), v menším množství obsahuje manoproteiny (Cherniak, Reiss et al. 1980). Majoritní GXM tvoří variabilně větvený polymer  $\alpha(1,3)$ -manosy (Cordero, Frases et al. 2011), na který jsou

v pravidelných intervalech substituovány jednotky glukuronové kyseliny ( $\beta(1,3)$ ) nebo xylosy ( $\beta(1,2)$  nebo  $\beta(1,4)$ ). Manosa může být také 6-O-acetylovaná (Zaragoza, Rodrigues et al. 2009).

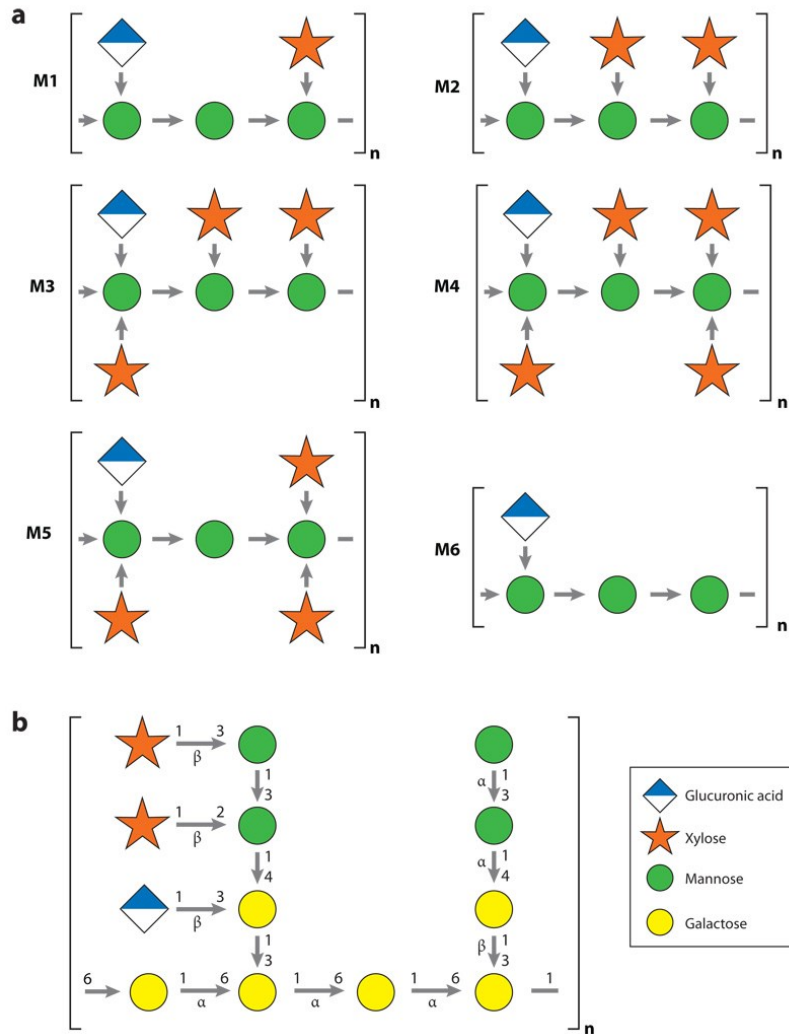
Syntéza prekurzorových oligosacharidů vyžaduje aktivované monosacharidy – GDP-manosu, UDP-galaktosu, UDP-glukuronovou kyselinu a UDP-xylosu. Syntézu aktivovaných monosacharidů zajišťují enzymy uvedené v Tabulce 1.

Aktivovaný monosacharid	Asociovaný gen	Zdroj
GDP-manosa	MAN1	(Wills, Roberts et al. 2001)
UDP-galaktosa	UGE1	(Moyrand, Lafontaine et al. 2008)
UDP-glukuronová kyselina	UGD1	(Ankel, Ankel et al. 1966)
UDP-xylosa	UXS1	(Ankel and Feingold 1966)

Tabulka 1 - Enzymy účastníci se syntézy NDP-sacharidů pro syntézu prekurzorů kapsule

Tyto látky jsou syntetizovány v cytosolu a následně transportovány do endoplasmatického retikula (ER) nebo Golgiho aparátu (GA) (Hadley, Maggioni et al. 2014), kde jsou pomocí glykosyltransferas spojovány do oligosacharidových prekurzorů. Tyto prekurzory jsou označovány jako SRG (Structural Reported Groups) a v současnosti je rozpoznáno šest takových skupin lišících se v místech substitucí na manosové kostře (viz Obrázek 3).

U *C. neoformans* byla identifikována  $\beta(1,2)$ -xylosyltransferasa (Cxt1) (Klutts and Doering 2008) lokalizovaná v GA nezbytná pro úplnou xylosylaci ( $\beta(1,2)$  i  $\beta(1,3)$ ) GXMGal a částečnou xylosylaci GMX, ale další předpokládané glykosyltransferasy zatím potvrzeny nebyly. Z GA jsou poté prekurzory transportovány sekrečními vāčky na povrch buňky (Agustinho, Miller et al. 2018) (Doering 2009).



Obrázek 3 - a) Struktura šesti SRG podle Cherniak, Valafar et al. 1998  
 b) strukturální jednotka GMXGal podle Heiss, Klutts et al. 2009  
 Převzato a citováno z (Doering 2009)

Mechanismus, kterým jsou extracelulárně sestavovány polymery, jejichž molekulová hmotnost může dosahovat až 7000 kDa (McFadden, De Jesus et al. 2006), není přesně znám a zdá se, že by k sestavování mohlo docházet na vnitřní (Cordero, Bergman et al. 2013) i vnější (Zaragoza, Telzak et al. 2006) straně kapsule. Za 6-O-acetylaci je zodpovědný enzym Cas1. Přehled genů asociovaných s tvorbou kapsule je v Tabulce 2 a Tabulce 3.

Geny účastníci se biosyntézy	Předpokládaná funkce
CAP64	Podobný CMT1
CAP59	Regulace sekrece PS
CAP10	Podobný CXT1
MAN1	Syntéza manosy
GMT1	Transport manosy
UGD1	Syntéza UDP-glukuronové kyseliny
UXS1	Syntéza UDP-xylosy
CMT1	Manosyltransferasa
CAS1/2/3	6-O-acetyltransferasa
CXT1	Xylosyltransferasa
UGE1	Syntéza UDP-galaktosy

Tabulka 2 - Geny biosyntézy kapsule; převzato z (Zaragoza, Rodrigues et al. 2009)

Geny regulující kapsuli	Předpokládaná funkce
CAP60	Podobný CEL1 ( <i>Agaricus bisporus</i> )
CIR1	Receptor Fe
GPA1	Alfa podjednotka trimerního G-proteinu
GPR4/5	GPCR vnímající AA/glukosu
PKA1	Katalytická podjednotka PKA
PKR1	Regulační podjednotka PKA
PDE1	Nizkoafinitní fosfodiesteráza
CAC1	Adenylát cyklasa
ACA1	Protein asociovaný s CAC1
CAN2	Karbon anhydrasa; vnímání CO <sub>2</sub>
NRG1	Transkripční faktor
GAT201	Transkripční faktor
RIM101	Transkripční faktor

Tabulka 3 - Geny regulující biosyntézu kapsule; převzato z (Zaragoza, Rodrigues et al. 2009)

Kapsule je variabilní v odpovědi na extracelulární signály, vnitřní vývojové signály nebo fenotypové přepínání; může se měnit její velikost, chemická struktura nebo fyzikální vlastnosti (Zaragoza, Rodrigues et al. 2009)

Z vnějších podmínek indukují tvorbu a zvětšování kapsule zvýšená koncentrace CO<sub>2</sub>, nízká koncentrace živin, nedostatek železa nebo lehce zvýšené pH (Zaragoza, Rodrigues et al. 2009). Všechny tyto podmínky najdeme v prostředí plic hostitele.

Kapsule obaluje pravděpodobně také spory (Botts, Giles et al. 2009).

## 2.3 Melanizace

Melanizace je proces ukládání melaninu mezi polymery buněčné stěny. Melanin chrání buňku před účinky oxidačních činidel v hostiteli a UV zářením ve vnějším prostředí. Kromě toho také snižuje propustnost kapsule a BS, čímž může zpomalit difuzi léčiv do cílových míst a zvýšit resistenci *C. neoformans* k tomuto léčivu. Melanizované buňky jsou díky tomu značně persistentní. Výrazná melanizace kapsule a BS je tedy také významným faktorem virulence, nezbytným například pro odolnost titánských buněk.

Melanin je polymerní pigment vzniklý oxidací a polymerací látek ze skupiny katecholaminů. U *C. neoformans* ho najdeme uložený v BS navázaný na chitin (Agustinho, Miller et al. 2018), kde buňku chrání primárně před škodlivými účinky UV záření, sekundárně pak před oxidativním a nitrosativním stresem, který využívají makrofágy imunitního systému případného hostitele.

Melanin je syntetizován z katecholaminů extracelulárními měď vázajícími enzymy Lac1 a Lac2 (Williamson 1997, Pukkila-Worley, Gerrald et al. 2005). Jejich aktivita je regulována stresovou signalizací (viz kapitoly 5.2.2 a 5.2.3), pH signalizací i nízkou koncentrací živin (viz kapitola 5.1). Dostupnost nezbytných měďnatých iontů je zajišťována transportéry Ctr1/4 (O'Meara, Xu et al. 2014, Gish, Maier et al. 2016).

## 3 FENOTYPOVÉ PŘEPÍNÁNÍ

Fenotypové přepínání je proces spontánního vzniku buněk odlišného fenotypu v mateřských koloniích o frekvenci vyšší, než je předpokládaná frekvence mutací. Pokládá se za typ mikroevoluce umožňující rychlou adaptaci na změny podmínek (Fries, Goldman et al. 2002).

Průměrná kvasinková buňka *C. neoformans* má průměr asi 5  $\mu\text{m}$ , asi 0,1  $\mu\text{m}$  tlustou BS a asi 1  $\mu\text{m}$  tlustou kapsuli (odvozeno z pozorovaných hodnot u prací na fenotypovém přepínání (Fries, Goldman et al. 1999) a titánských buňkách (Zaragoza and Nielsen 2013, Hommel, Mukaremera et al. 2018)). Různé morfotypy se pak mohou lišit jak ve velikosti nebo tvaru buňky, tak ve tloušťce kapsule či složení buněčné stěny.

U *C. neoformans* kmenů SB4, J32 a dvou variant kmene ATCC 24067 (ATCC 24067A a RC-2) bylo popsáno několik takových fenotypů podle vnějšího vzhledu kolonie založené buňkou odpovídajícího typu – hladký (smooth – SM), mukoidní (mucoïd – MC), zvrásněný (wrinkled – WR), pilovitý (serrated – C) a pseudohyfální (pseudohyphal – PH) (Fries, Goldman et al. 2002). Fenotypové přepínání se ale objevuje i u jiných kmenů *C. neoformans* a bylo pozorováno i u *C. gatii* (například MC → SM u kmene NP1) (Jain and Fries 2008). Přehled fenotypů u jednotlivých kmenů ukazuje Tabulka 4.

Nejčastěji pozorované jsou fenotypy SM (ve většině případů považován za mateřský), MC (často se objevuje v klinických izolátech) a PH (pozorovaný v asociaci s přirozenými predátory). Ostatní fenotypy jsou poměrně vzácné a v klinických izolátech se běžně nevyskytují (Jain, Wickes et al. 2005).

Kmen	Fenotyp	Srovnání virulence fenotypů
SB-4	SM, C, WR	WR > SM > C
J32	SM, MC	–
24067A	SM, PH, WR	WR > SM > PH
RC-2	SM, MC	MC > SM
NP1 ( <i>C. gatii</i> )	SM, MC	MC > SM

Tabulka 4 - Fenotypy pozorované u jednotlivých studovaných kmenů. Převzato z (Jain, Guerrero et al. 2006)

Buňky kolonií odvozeného fenotypu vykazují oproti rodičovskému rozdílné vlastnosti, jako jsou delší doba zdvojení či odlišná velikost kapsule (Jain and Fries 2008). Buňky MC typu mají kapsuli vždy výrazně větší, a jejich kolonie vykazují zvýšenou sensitivitu k lyzujícímu enzymu a osmotickému stresu (Jain and Fries 2008). Další změny zahrnují expresi různých povrchových molekul včetně imunogenních epitopů nebo rozdílnou acetylaci GXM. Dochází ke změně v zastoupení jednotlivých SRG. Změna v SRG u přepínání na WR (24067A) a C (SB4) fenotypy (respektive syntéza SRG M3 a M5, viz Obrázek 3) vyžaduje činnost speciálního enzymu, který připojuje xylosu vazbou  $\beta$ -(1,4) místo obvyklé  $\beta$ -(1,2) vazby (Fries, Goldman et al. 1999).

Nedochází vždy ke změně melanizace, ale může se měnit schopnost tvorby biofilmu. Zároveň mají buňky v biofilmu změněnou frekvenci fenotypového přepínání (Martinez, Ibom et al. 2008).

Zdá se, že mateřské fenotypy mají zvýšenou schopnost adheze k substrátu a formace biofilmu, ve kterém následně dochází k mírnému zvýšení frekvence fenotypového přepínání. Při chronické infekci tak může docházet k mikroevoluci (Martinez, Ibom et al. 2008). Frekvence fenotypového přepínání se také zvyšuje s replikativním a chronologickým

stárnutím buňky, avšak z dosud neznámých příčin. Z toho důvodu zde nebude senescentním buňkám věnována pozornost, tato problematika u *C. neoformans* je zpracována například v pracích (Bouklas and Fries 2015) nebo (Bouklas, Jain et al. 2017). Dále se budu věnovat změnám, ke kterým dochází u vybraných morfortypů lišících se svou virulencí.

### 3.1 Mukoidní morfortyp

Mukoidní kolonie byly poprvé popsány u kmene ATCC 24067 varianty RC-2, u které dochází k přepínání mezi mateřským smooth (SM) a odvozeným mukoidním (MC) fenotypem (Fries, Goldman et al. 2002). Kolonie založené buňkami MC fenotypu mají vnitřní architekturu velmi podobnou jako kolonie mateřské, liší se však nadprodukcí kapsulárních exopolysacharidů (Fries, Goldman et al. 2002). Kapsule je z toho důvodu výrazně zvětšená, kapsulární polysacharidy jsou kratší, méně větvené, ve větší míře se z kapsule uvolňují a jsou viskóznější. To může mít původ v rozmístění GlcA (Glukopyranosyluronová kyselina) na manosové kostře (Jain and Fries 2008). Z klinického hlediska jde o nejvýznamnější fenotypové přepínání, MC buňky jsou totiž výrazně virulentnější.

V poslední době je pozornost soustředěná na gen Allergen 1 (All1), který reguluje strukturu polysacharidu kapsule a hraje důležitou úlohu v manifestaci MC fenotypu. (Jain, Li et al. 2009). Významné jsou geny pro proteiny účastníci se homeostáze železa a geny pro proteiny transportu sacharidů, které mají u *all1Δ* mutanta zvýšenou expresi. U tohoto mutanta bylo zajímavé také pozitivní ovlivnění exprese cytokin indukujícího proteinu Cig1. (Jain, Cordero et al. 2013).

Změny v aktivitě All1 nevysvětlují všechny charakteristiky tohoto fenotypu. Shora je tento gen negativně regulován dalším TF nazvaným Vad1 (Panepinto, Liu et al. 2005), který je paralelou TOR signalizace (Park, Jarvis et al. 2018). Důležitou úlohu zde pravděpodobně hraje také TF Nrg1, který je efektořem cAMP/PKA signalizace (viz kapitola 5.1) a reguluje expresi genů kapsule i BS. Velikost kapsule také v určité míře závisí na mitochondriální aktivitě (Trevijano-Contador, Rossi et al. 2017), která je z velké části také regulována Vad1 (viz kapitola 5.4).

Podobně regulovaný je také později objevený homolog ALL1 nazvaný ALL2, který by mohl hrát roli v udržování pH v cytoplasmě (Jain, Bouklas et al. 2016).



## 3.2 Pseudohyfální morfortyp

Pseudohyfální morfologie buněk byla původně pozorována u několika kmenů sérotypu A i D. Je spojována s adaptací na fagocytózu přirozeným predátorem a vzniká v odpovědi na sníženou koncentraci amoniaku přes receptory Amt1/Amt2 (Lee, Phadke et al. 2012).

Buňky jsou charakteristické protaženým tvarem a adhezí dceřiných buněk k mateřským. Kolonie PH buněk je zvrásněná a povrch vypadá suchý. Tyto buňky jsou typické zhoršenou schopností růstu při 37 °C a jsou náchylnější k inhibici kalcineurinu, jsou však v menší míře fagocytovány amoebou a vykazují invazivní růst. (Lee, Phadke et al. 2012)

V práci Magditch, Liu et al. (2012) bylo zjištěno, že pseudohyfální růst vykazují buňky s mutací v některém z genů pro proteiny RAM signalizace (viz kapitola 5.3). Ve spontánně vzniklých pseudohyfálních koloniích je nejčastější mutace v genu TAO3, v menší míře i v ostatních komponentech dráhy. Tyto mutace způsobily vznik STOP-kodonu uprostřed genu a tím znemožnily transdukci signálu v RAM signalizaci.

Výsledkem je tedy potlačení RAM signalizace, což vyústí v PH fenotyp. Návrat k wild-type fenotypu probíhá a je možný pravděpodobně díky zpětným mutacím. (Magditch, Liu et al. 2012).

Zároveň jsou nezbytné permeasy amonných iontů Amt1 a Amt2, respektive alespoň jedna z nich, skrze které nedostatek amonných iontů indukuje pseudohyfální růst (Lee, Phadke et al. 2012).

Byly tedy pozorovány kmeny *C. neoformans* (A a D) vykazující PH růst a mající mutaci v některém z komponentu RAM dráhy. Ty produkují PH potomstvo, ale u některých může dojít k reverzi v mateřský fenotyp. Pak byly pozorovány kmeny (A i D) vykazující PH růst po indukci sníženou koncentrací amoniaku v prostředí. Ty po zvýšení koncentrace amoniaku začnou produkovat potomstvo hladkého fenotypu (Lee, Phadke et al. 2012). Pseudohyfální morfologie se tedy objevuje jako odpověď na sníženou koncentraci amoniaku pomocí Amt1/2 a zároveň jako důsledek poškození aktivity RAM dráhy. Jsou možné dva způsoby propojení, jeden přes změnu intracelulárního pH, na kterou zareaguje cytoplasmatický pH sensor, nebo situace, kdy Amt permeasy fungují jako aktivátory PKA signalizace (Rutherford, Bahn et al. 2019).

## 4 TITÁNSKÉ BUŇKY

Jako titánské buňky jsou označovány výrazně větší buňky, 10x až 20x větší než buňky normální, dosahující velikosti dokonce až 100  $\mu\text{m}$  (Zaragoza and Nielsen 2013). Mají silnější buněčnou stěnu (Zaragoza, García-Rodas et al. 2010) a pozměněnou strukturou obdobně zvětšené kapsule (Cruickshank, Cavill et al. 1973). Také jsou výrazně melanizovány (Hommel, Mukaremera et al. 2018). Změna morfortypu z normální buňky na titánskou bude dále označována také jako titanizace.

O titánských buňkách se *in vitro* mluví od velikosti větší než 15  $\mu\text{m}$  (Zaragoza and Nielsen 2013). Oproti starým buňkám, které také dosahují větší velikosti, se tyto objevují v kolonii brzy a převážně z buněk přítomných v počátečním inokulu (Hommel, Mukaremera et al. 2018).

Tyto buňky jsou polyploidní (až 64n) a produkují haploidní potomstvo normální velikosti, jak bylo pozorováno v práci Gerstein, Fu et al. (2015) (citováno ze Zaragoza and Nielsen, 2013).

Titanizace je pravděpodobně řízena cAMP/PKA signalizací (Okagaki, Wang et al. 2011) přes TF Rim101 (viz kapitola 5.5.1) a/nebo SREB (odpověď na hypoxii) (Hommel, Mukaremera et al. 2018). Dále se zvyšuje po feromonové signalizaci přes Ste3a feromonový receptor u **a** párovacího typu. Signalizace přes Ste3a zvyšuje tvorbu zastoupení titánských buněk v populaci při koinfekcích oběma párovacími typy (**a/a**), není však pro titanizaci nezbytná (Okagaki, Strain et al. 2010). Pro výraznou melanizaci pak mohou být důležité dráhy PKC/Mpk1 a HOG (viz kapitola 5.2).

Delece genu pro výše zmíněný Rim101 minimalizuje tvorbu titánských buněk, což naznačuje jeho úlohu jako centrálního TF indukujícího tvorbu tohoto morfortypu (Okagaki, Wang et al. 2011).

Titanizace byla pozorována jako odpověď na prostředí savčích plic, při kultivaci s makrofágy, ale také jako odpověď na purifikovaný fosfatidylcholin (Zaragoza and Nielsen 2013).

Zastoupení titánských buněk v populaci je také určeno hustotou populace – infekce inokulem o cca  $5 \times 10^4$  buněk vyústila v jejich 30% zastoupení, kdežto při infekci inokulem o velikosti cca  $5 \times 10^6$  buněk tvořily titánské buňky jen 15 % populace (Okagaki, Strain et al. 2010, Zaragoza, García-Rodas et al. 2010).

Quorum sensing (proces vnímání hustoty populace) je zajišťován molekulami pantotenové kyseliny (PA) nebo proteinem Qsp1. PA mírně zvyšuje zasoupení titánských buněk v populaci, Qsp1 negativně ovlivňuje jak velikost, tak podíl v populaci. Titanizace tedy není jen pouhou odpovědí na signály prostředí, ale je také výsledkem mezibuněčné komunikace (Hommel, Mukaremera et al. 2018).

Dále byly pozorovány tři geny, jejichž delece také významně ovlivnila titanizaci – LMP1, SGF29 a SRE1 (SREBP) (Hommel, Mukaremera et al. 2018).

Sre1 je produktem genu SREBP a účastní se buněčné odpovědi na hypoxii. Sre1 $\Delta$  mutanti mají sníženou indukci titánských buněk, což naznačuje pozitivní úlohu proteinu v jejich indukci. Hypoxické prostředí tedy indukuje titanizaci signalizací přes Sre1 (Hommel, Mukaremera et al. 2018).

Jsou uvažovány ještě další dva geny – TSP2 a UVS101. Tsp2 ovlivňuje titanizaci negativně (pozitivně interaguje s cAMP/PKA dráhou), Uvs101 $\Delta$  mutant vykazuje zvýšený podíl titánských buněk, zároveň však také větší velikost buněk (Hommel, Mukaremera et al. 2018).

Byly identifikovány i další proteiny zajišťující zvětšování buňky, například Rho-GTPasy (Okagaki, Wang et al. 2011).

## **5 SIGNALIZACE SPOJENÉ SE ZMĚNAMI FENOTYPU**

Jednotlivé morfotypy se odlišují v manifestaci virulenčních faktorů. Těmito faktory jsou kapsule, schopnost růst při zvýšené teplotě (integrita buněčné stěny) a melanizace. V této kapitole bude popsána regulace těchto faktorů. Představa je taková, že zásadní změny v těchto regulacích v odpovědi na signály z prostředí pak vyústí ve změnu fenotypu.

Kapsule je ovlivňována dráhami cAMP/PKA, HOG (MAPK), TOR nebo Fe-vnímající kaskádou, které se účastní protein Cir1 (GATA-TF) hrající roli v odpovědi na nízké koncentrace železa (Jung, Sham et al. 2006).

Integrita buněčné stěny je řízena hlavně PKC/Mpk1 (MAPK) signalizací a dráhami HOG a RAM.

Melanizace je řízena především pH responzivní Pal/Rim dráhou (popsáno v rámci kapitoly 5.5.1) a cAMP/PKA, dále pak HOG, PKC/Mpk1 a TF Cir1 (Kronstad, Saikia et al. 2012).

U přepínání mezi SM a PH fenotypem zřejmě hraje úlohu RAM signalizace, u přepínání mezi SM a MC fenotypem by to pak mohly být TOR signalizace, signalizace při nedostatku železa (Cir1) a cAMP/PKA/Nrg1 signalizace. MAPK dráhy, cAMP/PKA/Rim101 a SREB (Sp1) jsou důležité pro indukci titánských buněk.

Dále popsány budou pouze obecně významné dráhy (cAMP/PKA, MAPK) a RAM a TOR dráhy, které se objevují v systému fenotypového přepínání. Dráha stojící v centru adaptace na hypoxii (SREB), zmíněna v souvislosti s titánskými buňkami, je bohužel u *C. neoformans* málo poznaná, proto bude krátce popsána pouze zde.

Součástí SREB dráhy jsou proteiny Sre1, Stp1, Scp1 a Tco1. (Moranova, Kawamoto et al. 2009), kde Tco1 je histidinová kinasa stojící na začátku dráhy a Sre1 je transkripční faktor. Jedním z cílů této dráhy je CRZ1/SP1-like protein (CNAG\_00156), který je za optimálních podmínek regulován kalcineurinem a v odpovědi na hypoxii zpomaluje progresi buněčného cyklu (G2 arrest) (Moranova, Virtudazo et al. 2014).

Na konci kapitoly budou krátce shrnuty funkce TF Rim101 a Usv101 pro lepší porozumění jejich rolím v indukci titánských buněk.

## 5.1 cAMP/PKA signalizace

cAMP/PKA dráha se vyskytuje u všech známých organismů, u kterých reguluje například energetický metabolismus nebo proliferaci.

U *C. neoformans* tato dráha mimo výše zmíněné procesy reguluje výstavbu buněčné stěny a kapsule a melanizaci, to vše v odpovědi na množství živin, množství CO<sub>2</sub> nebo oxidativní a nitrosativní stres. Velikost kapsule je touto dráhou regulována pozitivně. (Kozubowski, Lee et al. 2009).

Centrálním komponentem této dráhy je heterotetramer protein-kinasy A (Pka1/Pka2/Pkr1/Pkr1, dále PKA) aktivovaný zvýšenou hladinou cAMP. cAMP je druhý posel produkovaný adenylát-cyklasou. Ta je v genomu *C. neoformans* kódována genem CAC1. (Alspaugh, Pukkila-Worley et al. 2002) Upstream od Cac1 figuruje GPCR (G-Protein Coupled Receptor) spřažený s trimerním G-proteinem (Kozubowski, Lee et al. 2009).

Gpr4 je jedním z těchto GPCR a může být aktivován nízkou koncentrací aminokyselin, zvláště methioninu (Xue, Bahn et al. 2006). Dalším receptorem je Gpr5, který se aktivuje při nízkých koncentracích glukózy (Rutherford, Bahn et al. 2019). Tyto dva receptory aktivují

trimerní G-protein s alfa podjednotkou Gpa1 a beta podjednotkou Gpb1 (Kozubowski, Lee et al. 2009). V genomu *C. neoformans* jsou kódovány i další alfa podjednotky, Gpa2 a Gpa3, asociující s Gpb1 ve feromonové signalizaci, tyto další podjednotky jsou však pro virulenci méně důležité (Li, Shen et al. 2007). Aktivita alfa podjednotek je regulována pomocí GAP (GTPase-Activating Protein) proteinů Crg1/2/3, přičemž pro virulenci je nejdůležitější Crg2, který reguluje Gpa1, Gpa2 i Gpa3 (Li, Shen et al. 2007).

Aktivovaná Gpa1 může aktivovat adenylát-cyklasu (Cac1) (Kronstad, Hu et al. 2011), jejíž produkt (cAMP) pak aktivuje PKA, která fosforylací aktivuje cílové proteiny.

Druhým aktivátorem Cac1 je  $\text{HCO}_3^-$  tvořený z  $\text{CO}_2$  enzymem Can2.  $\text{CO}_2$  přítomný ve velkém množství v plicích hostitele difunduje skrze plasmatickou membránu, v cytoplasmě je pomocí Can2 hydratován na hydrogenuhličitan, který se může přímo vázat na Cac1 a aktivovat ji (Bahn, Cox et al. 2005, Mogensen, Janbon et al. 2006).

Lac1/2 (Pukkila-Worley, Gerrald et al. 2005) a TF Nrg1 (Cramer, Gerrald et al. 2006) jsou jedny z proteinů, jejichž aktivita je regulovaná touto dráhou. V podmínkách nízké koncentrace glukosy (0,1 %) Nrg1 reguluje expresi genů kódujících proteiny metabolismu sacharidů a jiných uhlovodíků (Cramer, Gerrald et al. 2006). Také dosud neznámým způsobem ovlivňuje u buněk míru flokulace. Je možné, že by podobně mohla být ovlivněna i adheze k epitelu při infekci. Dalšími regulovanými proteiny jsou TF Gat201 (Gish, Maier et al. 2016) nebo Rim101 (viz kapitola 5.5.1).

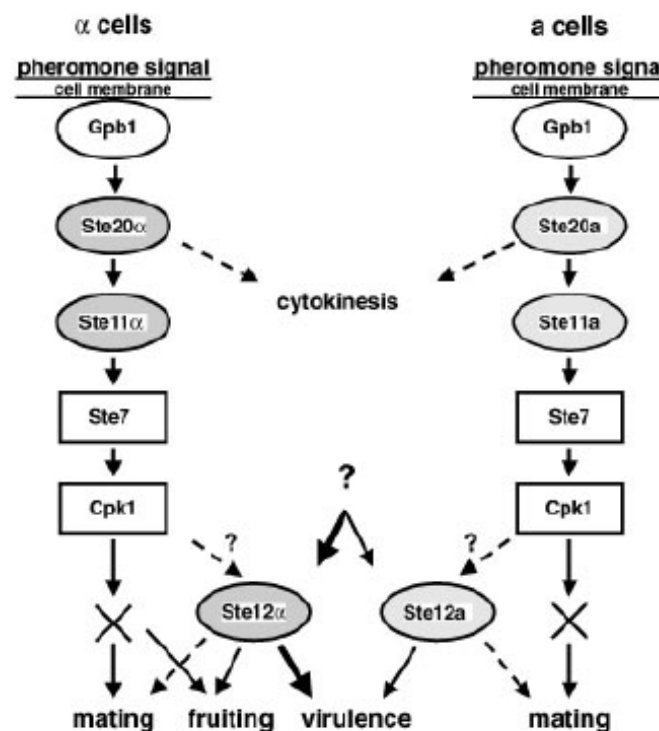
Do kontroly regulace kapsule je také zapojena UPP (Ubiquitin Proteasome Pathway), která je PKA inhibovaná (Geddes, Caza et al. 2016).

## 5.2 Signalizace spojené s MAP-kinasami

### 5.2.1 Feromonová signalizace

Tato dráha je důležitá pro párování a hyfální růst, kontroluje však také některé faktory virulence. Spouští ji vazba ligandu na Ste3 receptor (GPCR), kdy ligandem je feromon opačného párovacího typu. Downstream od Ste3 figuruje trimerní G-protein, přičemž aktivační roli v této dráze hraje beta/gama podjednotka. U *S. cerevisiae* jde o Ste4/Ste18 heterodimer, u *C. neoformans* je beta podjednotka kódována genem GPB1 (Hull and Heitman 2002), alfa podjednotky se zde objevují dvě a jsou kódovány geny GPA2 a GPA3 (Li, Shen et al. 2007).

Některé komponenty MAPK dráhy (Ste20/11/12) jsou umístěny v MTL, **a** a **α** párovací typy tedy nesou odlišné alely. Ste12 je předpokládaným spojením mezi MAPK a PKA dráhou (viz Obrázek 4). Na jeho N-konci nalezneme homeodoménu, na C-konci pak Zn-finger doménu. Oproti homolognímu Ste12 *S. cerevisiae* tento neobsahuje Dig1/2-vazebnou doménu. U *S. cerevisiae* Dig1/2 funguje jako inhibitor, regulace Ste12 u *C. neoformans* tedy probíhá pravděpodobně cestou cAMP/PKA. Převzato z (Hull and Heitman 2002).



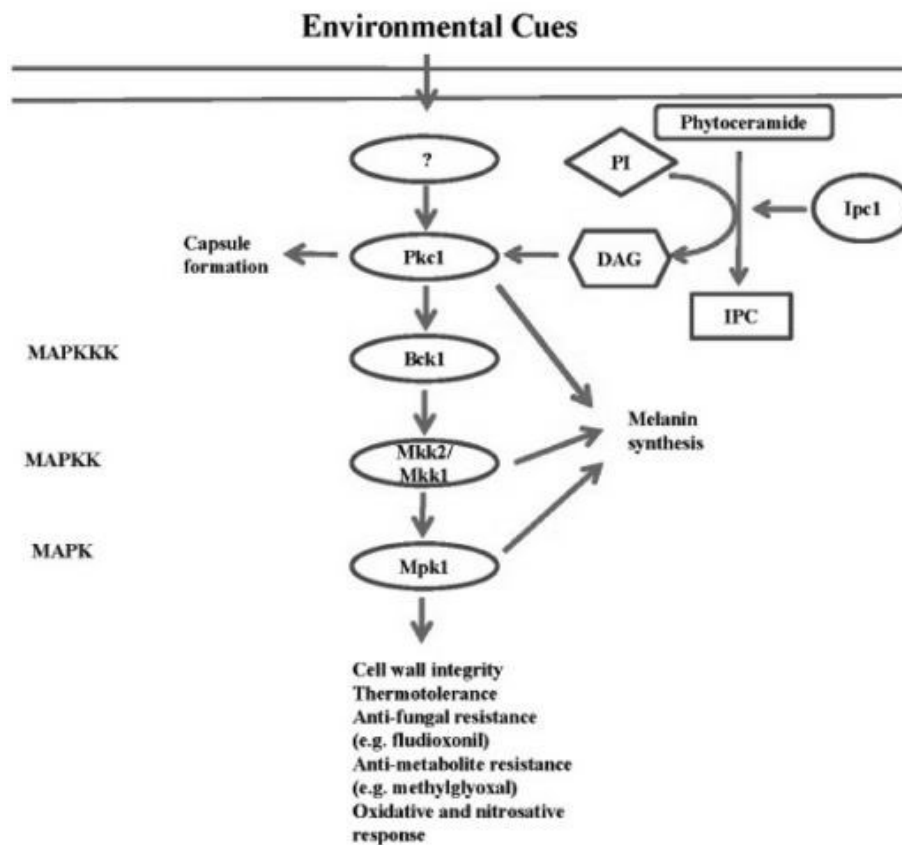
Obrázek 4 - Feromonová signalizace *C. neoformans*; převzato z (Hull and Heitman 2002)

## 5.2.2 PKC/Mpk1 – Teplotní sensitivita

Signalizace pomocí PKC/Mpk1 odpovídá na extracelulární signály jako jsou osmotický stres, oxidativní a nitrosativní stres nebo na porušení integrity buněčné stěny. Ve velké míře kooperuje s PLC/kalcineurin signalizací. Z virulenních faktorů PKC negativně ovlivňuje velikost kapsule, pozitivně ovlivňuje melanizaci a schopnost růst při zvýšené teplotě, tedy integritu BS (Jung and Bahn 2009).

Tato signalizace je dobře popsána u *S. cerevisiae* a u *C. neoformans* je velmi podobná (Kraus, Fox et al. 2003). Centrální kinázou v této signalizaci je MAPK Mpk1, od ní upstream figurují MAPKK Mkk1/Mkk2, MAPKKK Bck1 a PKC (Jung Bahn 2009) (viz Obrázek 5).

Mpk1 pak zvyšuje aktivitu například Fks1, která přímo udržuje integritu BS při růstu za zvýšené teploty (Jung Bahn 2009).



Obrázek 5 - PKC/Mpk1 signalizace *C. neoformans*; převzato z (Jung and Bahn 2009)

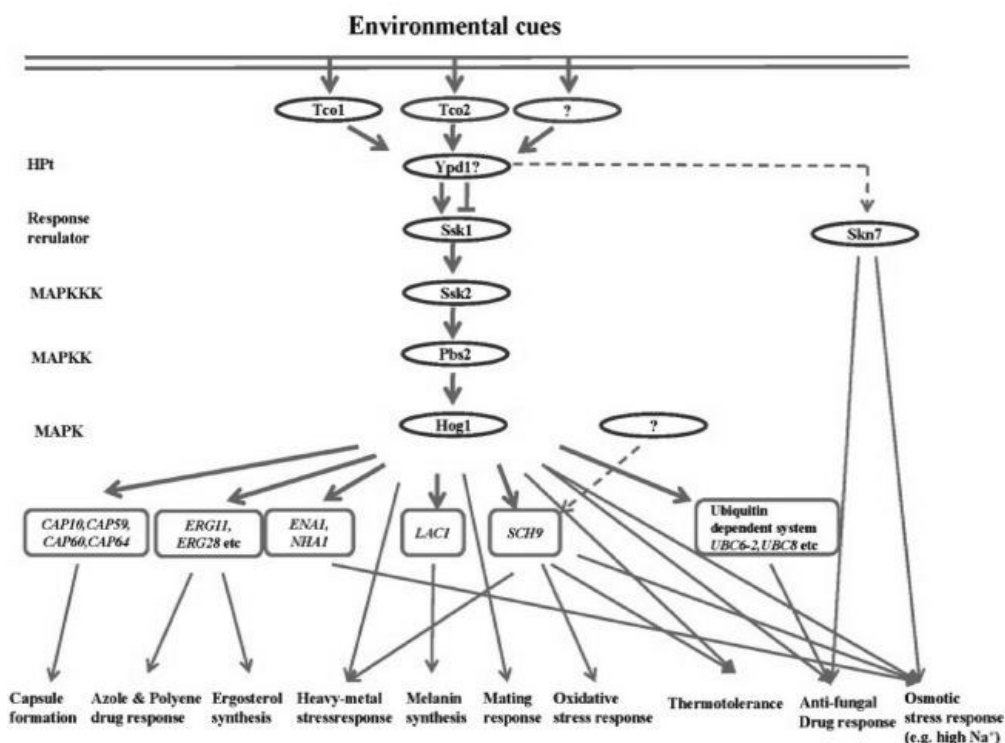
### 5.2.3 HOG – osmotický stres

Tato dráha odpovídá na osmotický stres a je opět velmi dobře popsána u *S. cerevisiae*. Centrální MAPK je Hog1 (Jung and Bahn 2009), jehož homolog se nachází i v genomu *C. neoformans* a může být aktivován dvěma cestami. Upstream od MAPK Hog1 figurují MAPKK Pbs2 a MAPKKK Ssk2 nebo Ste11 (Jung and Bahn 2009).

Jedna cesta zahrnuje aktivaci Ssk2 pomocí membránového osmosensorického komplexu Sln1/Ypd1/Ssk1, který aktivuje Ssk2 (za normálních podmínek je Ssk1 inhibovaný) (Jung and Bahn 2009). Druhá cesta zahrnuje membránový sensor Sho1 a PAK Ste20, který aktivuje Ste11. (Jung and Bahn 2009)

Obě cesty se sbíhají na MAPKK Pbs2 (Jung and Bahn 2009). Pbs2 přímo aktivuje Hog1, který je translokován do jádra, kde funguje jako TF (Kraus, Fox et al. 2003).

U *C. neoformans* sérotypu D je dráha velmi podobná modelové, u sérotypu A došlo k modifikaci významné pro regulaci virulence (Bahn, Geunes-Boyer et al. 2007). Hog1 je v tomto případě za normálních podmínek konstitutivně fosforylovaný a v odpovědi na osmotický stres je defosforylovaný. Ssk2 je klíčový faktor regulace virulence touto cestou (Jung and Bahn 2009). Shora by dráha mohla být aktivována histidinovými kinasami Tco1/2 nebo Msb2/Sho1 (Rutherford, Bahn et al. 2019). Regulace faktorů virulence touto drahou je znázorněna na Obrázku 6.



Obrázek 6 - HOG dráha *C. neoformans*; převzato z (Jung and Bahn 2009)



### 5.3 RAM signalizace

Tato signalizace je pozorována v rámci celé skupiny Fungi a je nejlépe prozkoumána u *S. cerevisiae* a *C. albicans* (Saputo, Chabrier-Rosello et al. 2012). U *S. cerevisiae* v této signalizaci figurují kinasy Kic1 a Cbk1 a jejich scaffold protein Tao3. Hym1 a Sog2 jsou proteiny asociující s Kic1, protein Mob2 asociuje s Cbk1. Signál je přijímán kinasou Kic1, která fosforyluje, a tím aktivuje, kinasu Cbk1. Ta pak fosforyluje své cílové proteiny. U *S. cerevisiae* může cílovým proteinem být TF Ace2. Typickým důsledkem aktivní RAM signalizace je například polarizovaný růst.

U *C. neoformans* došlo k poměrně významným změnám – mutanti s poškozenou RAM dráhou mají podpořený polarizovaný růst (Walton, Heitman et al. 2006) a jsou citlivější k látkám inhibujícím kalcineurin (kalcineurin i RAM dráha mají společný efektor, viz CRZ1/SP1-like protein dále). Ztráta RAM signalizace také vede ke ztrátě kapsule.

Z klasických komponentů této dráhy chybí u *C. neoformans* protein Kic1 asociující s Hym1, Cbk1 homolog je zde nazván Orb6 a zároveň nebyl nalezen homolog proteinu Ace2. Místo toho byl u *C. neoformans* nalezen gen podobný TF CRZ1/SP1 (Walton, Heitman et al. 2006, Moranova, Virtudazo et al. 2014), nejčastěji nazýván SP1. Orb6/SP1 reguluje například expresi enzymů výstavby BS (Chow, Clancey et al. 2017).

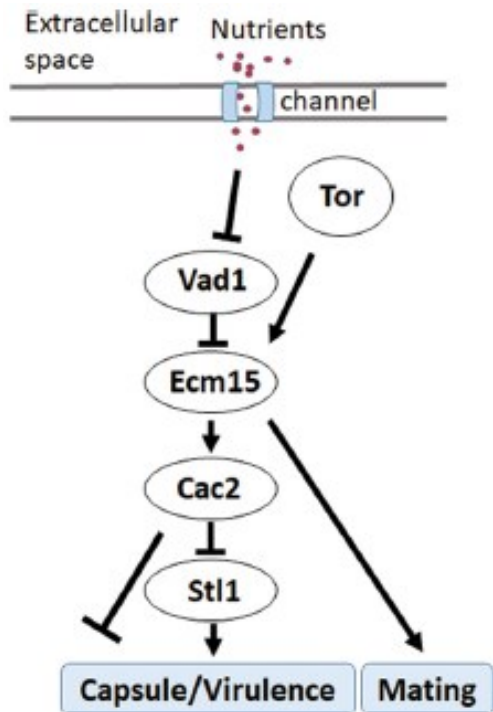
### 5.4 TOR signalizace

PI-3-K TOR1 je aktivována v podmínkách dostatku živin. Za těchto podmínek aktivuje Chromatin Assembly Complex 2 (Cac2), který funguje jako transkripční represor množství genů v subtelomerických oblastech (Kaufman, Kobayashi et al. 1997). Mechanismy transdukce signálu z vnějšího prostředí k Cac2 jsou prozatím málo známé (Rutherford, Bahn et al. 2019).

Významným cílem Cac2 je gen Sugar Transporter Like 1 (STL1), jenž se však v subtelomerické oblasti nenachází. Exprese STL1 vede k utilizaci alternativních zdrojů uhlíku a ke změnám v kapsuli. (Park, Jarvis et al. 2018)

Vad1 je DEAD-box RNA helikasa negativně ovlivňující genovou expresi na úrovni stability mRNA (Panepinto, Liu et al. 2005). Není členem lineární kaskády TOR signalizace, ale funguje paralelně s Tor1, přesto bude popsán na tomto místě. Při dostatku živin je Vad1 inhibovaný a jeho efekt na Cac2 je inhibiční (Park, Jarvis et al. 2018). Dalšími cíli Vad1 jsou mRNA proteinů Pck1 (fosfoenolpyruvát kinasa), Tuf1 (elongační faktor účastnící se syntézy

mitochondriálních proteinů), Mpf3 (GPI-protein stimulující T-buňky) nebo Not1 (globální represor transkripce) (Panepinto, Liu et al. 2005).



Obrázek 7 - Dráha Tor/Vad1 ve virulenci *C. neoformans*; převzato z (Park, Jarvis et al. 2018)

## 5.5 Efektory signálních drah

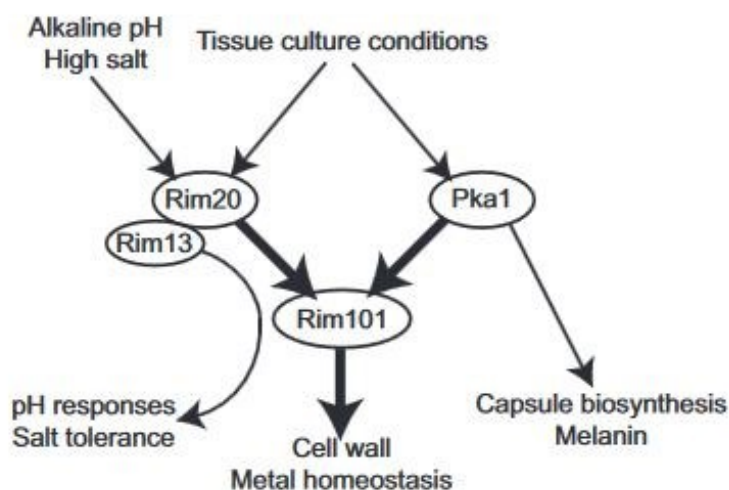
V této kapitole bude věnována větší pozornost dvěma transkripčním faktorům, které hrají důležitou roli v indukci titánských buněk během infekce. Rim101 řídí formaci titánských buněk v odpovědi na nedostatek živin přes cAMP/PKA dráhu a nejspíš i přes pH responsivní Pal/Rim dráhu.

Usv101 je druhý TF, u kterého je možná důležitá role v indukci titánských buněk.

### 5.5.1 Transkripční faktor Rim101

Produkce melaninu, tvorba kapsule a indukce titánských buněk jsou alespoň do nějaké míry ovlivňovány TF Rim101 (Okagaki, Wang et al. 2011, Kronstad, Saikia et al. 2012).

Konzervovaná Pal/Rim dráha je aktivována mírně zvýšeným pH (Selvig and Alspaugh 2011).



Obrázek 8 - Dvě cesty aktivace Rim101 u *C. neoformans*; převzato z (Selvig and Alspaugh 2011)

Zároveň však je Rim101 přímo regulován také PKA (O'Meara, Norton et al. 2010). Tento typ regulace se u Rim101 homologů nevyskytuje (Selvig and Alspaugh 2011). Řídí adhezi kapsule k BS (Ags1) a indukci titánských buněk (viz kapitola 4) (Hommel, Mukaremera et al. 2018). Geny cílené Rim101 jsou uvedené v Tabulkách 5 a 6.

Gen	Funkce
CCK1	Kasein kinasa
CDC24	Rho-GTPasa
CFT1	Transport Fe
CIR1	Fe-responsivní TF
CTR4	Transport Cu
HAPX	Fe-responsivní TF
RIM9	pH-responsivní protein
SP1	CRZ1/SP1-like TF
SSK2	MAPKKK HOG dráhy

Tabulka 2 - Geny pozitivně regulované Rim101; podle (O'Meara, Xu et al. 2014).

Gen	Funkce
FKS1	$\beta$ -glukan syntasa
AGS1	$\alpha$ -glukan syntasa
CHS1/5/6/8	Chitin syntasa
CDA3	Chitin deacetylase
CHI22	Chitinasa
SKN1	Protein syntézy $\beta$ -glukanu
KRE61	Protein syntézy $\beta$ -glukanu

Tabulka 3 - Geny syntézy BS pozitivně regulované Rim101; převzato z (O'Meara, Xu et al. 2014)

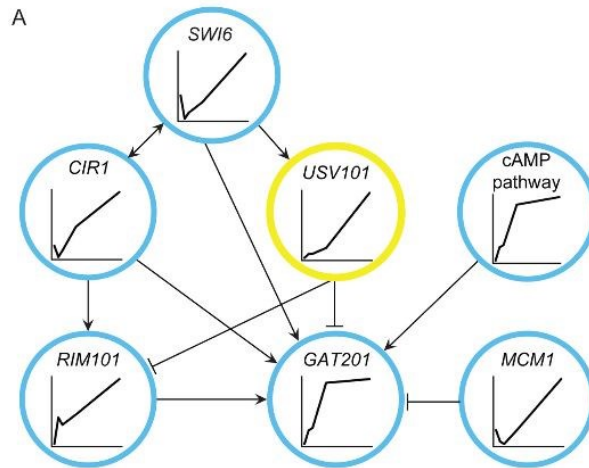
### 5.5.2 Transkripční faktor Usv101

Usv101 je transkripčním faktorem a důležitým regulátorem virulence u *C. neoformans*. Shora je kontrolován výhradně Swi6 (Gish, Maier et al. 2016), který je součástí regulace buněčného cyklu (Kelliher, Leman et al. 2016). Negativně ovlivňuje expresi transkripčních faktorů SP1, RIM101, paralelně s cAMP/PKA inhibuje expresi GATA-transkripčních faktorů GAT201 a ADA2 (Maier, Haynes et al. 2015). Dále také negativně reguluje další geny účastníci se výstavby BS nebo kapsule či geny nezbytné pro melanizaci (viz Tabulka 7) (Gish, Maier et al. 2016). Je negativním regulátorem titanizace (Dambuza, Drake et al. 2018). Usv101 by také mohl ovlivňovat cAMPK/PKA signalizaci interakcí s Gpa1 (Dambuza, Drake et al. 2018).

Na Obrázku 9 jsou počítačem predikované interakce Usv101 s dalšími důležitými regulátory.

Gen	Funkce
ADA2	SAGA acetyltransferasa
CTR1	Transport Cu
UXS1	UDP-Xyl syntasa
AGS1	$\alpha$ -glukan syntasa
CHS5	Chitin syntasa
SKN1	$\beta$ -glukan syntasa
CNAG_02773	Transporter hexos podobný STL1 <i>S. c.</i>
CNAG_02479	Transporter hexos podobný STL1 <i>S. c.</i>
CNAG_05387	Transporter galaktosy podobný HXT5 <i>S. c.</i>

Tabulka 4- Geny upregulované u *usv101* $\Delta$ ; převzato z (Gish, Maier et al. 2016) (*S. c.* – *Saccharomyces cerevisiae*)



Obrázek 9 – Počítačem predikované interakce, pouze pro ilustraci možných interakcí; převzato z (Gish, Maier et al. 2016)

## 6 ZÁVĚR

Buňky mukoidního fenotypu se od hladkého fenotypu liší abnormálně velikou kapsulí, respektive nadprodukcí pozměněných exopolysacharidů. Aktivita Vad1 by mohla vysvětlit většinu ne-li všechny požadavky na abnormální zvětšení kapsule a manifestaci mukoidního fenotypu – inhibuje translaci All1, dále ovlivňuje činnost mitochondrií (Tuf1), glukoneogenezi (Pck1) a pravděpodobně ovlivňuje míru fagocytózy hostitelskými makrofágy (Mpf3). Dále snížením translace Cac2 může aktivovat translaci mnoha genů v subtelomerických oblastech. To by mohlo vyústit ve zvýšení dodávky hexos pro výstavbu kapsule a v přizpůsobení se nedostatku železa. Zvýšení exprese STL1 dále podpoří glukoneogenezi nebo energetický metabolismus v podmínkách nedostatku hexos.

Pseudohyální buňky se oproti mateřskému fenotypu liší protaženým tvarem a porušenou cytokinezi po mitóze a suchým, zvrásněným vzhledem kolonie. Suchý vzhled kolonie je dán absencí kapsule, která chybí nejspíše z důvodu změněné struktury BS. Protažený tvar a porušená cytokineze u *C. neoformans* je důsledkem ztráty RAM signalizace. Zajímavé bylo zjištění, že pro pseudohyální fenotyp u *S. cerevisiae* je funkční RAM signalizace naopak nezbytná.

Zásadní úlohu v indukci titánských buněk má cAMP/PKA signalizace. Vliv na indukci titánských buněk má i fosfatidylcholin. To naznačuje, že by indukce tvorby titánských buněk mohla být obecnou odpovědí na přítomnost membránových fosfolipidů. Mohlo by jít o vnímání hostitelských fosfolipidů, konkrétně tedy fosfatidylcholinu, možná i dalších

fosfolipidů, což by mohlo spustit cAMP/PKA/Rim101 signalizaci. V kombinaci se zastavením buněčného cyklu v důsledku hypoxie pomocí Sp1 a vzájemné signalizace mezi kvasinkovými buňkami pomocí PA nebo Qsp1 by tedy mohlo dojít k indukci titanizace u části populace.

Rim101, který byl navržen jako důležitý regulátor titanizace, zvyšuje expresi genů důležitých pro integritu BS a gen SSK2. SSK2 je součástí HOG dráhy, jež ovlivňuje BS, melanizaci i výstavbu kapsule. K charakteristickému zvětšení buňky by mohlo docházet v důsledku polyploidizace nebo regulace Rho-GTPas. Zvýšená genová doze v důsledku polyploidizace by pak mohla také přispět ke zvětšení kapsule (která poměrem k velikosti buňky odpovídá „normálnímu stavu“) nebo BS. K inhibici Usv101, který inhibuje titanizaci, by mohlo dojít v důsledku zastavení buněčného cyklu, protože je aktivovaný proteinem Swi6. Usv101 sám inhibuje expresi Rim101 a alespoň některých genů syntézy BS a kapsule. Na základě informace o pravděpodobné interakci Usv101 s Gpa1 by se dalo usoudit, že tato regulace je negativní a touto cestou probíhá regulace Rim101.

Cílem této práce bylo nabídnout současný přehled regulace přepínání fenotypů a diferenciaci buněk u *Cryptococcus neoformans*. Pozornost byla věnována změnám, k jakým dochází u vybraných morfotypů lišících se svou virulencí.

Bohužel v této práci nebyl prostor pro prozkoumání vztahu mezi permeasami amonných iontů Amt1/2 a RAM signalizací. Dále by tedy mohlo být zajímavé se na tuto interakci zaměřit.

Proteiny důležitými pro manifestaci MC fenotypu tedy jsou All1 a All2 a jejich možné regulátory Vad1, Nrg1 a Cir1. Hierarchie jejich interakcí je však stále předmětem výzkumu a její poznání bude nezbytné pro pochopení problematiky tohoto systému fenotypového přepínání.

V dalších pracích zabývajících se studiem titanizace u *C. neoformans* by mohla být předmětem kontrola buněčného cyklu v závislosti na stresové signalizaci a jak díky tomu dochází i k několikanásobné polyploidizaci. Dále by mohlo být předmětem hlubší prozkoumání role Rim101 a Usv101 v manifestaci tohoto morfotypu nebo význam lipidové signalizace.

I přes pokrok výzkumu tedy stále zůstává spousta málo prozkoumaných oblastí, jejichž další výzkum by mohl vést ke zlepšení našich schopností léčby pacientů trpících chronickou CME.

## 7 ZDROJE

- Agustinho, D. P., L. C. Miller, L. X. Li and T. L. Doering (2018). "Peeling the onion: the outer layers of *Cryptococcus neoformans*." Memorias do Instituto Oswaldo Cruz **113**(7): e180040-e180040.
- Alspaugh, J. A., R. Pukkila-Worley, T. Harashima, L. M. Cavallo, D. Funnell, G. M. Cox, J. R. Perfect, J. W. Kronstad and J. Heitman (2002). "Adenylyl cyclase functions downstream of the Galpha protein Gpa1 and controls mating and pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*." Eukaryotic cell **1**(1): 75-84.
- Ankel, H., E. Ankel and D. S. Feingold (1966). "Biosynthesis of uridine diphosphate D-xylose. 3. Uridine diphosphate D-glucose dehydrogenase of *Cryptococcus laurentii*." Biochemistry **5**(6): 1864-1869.
- Ankel, H. and D. S. Feingold (1966). "Biosynthesis of uridine diphosphate D-xylose. II. Uridine diphosphate D-glucuronate carboxy-lyase of *Cryptococcus laurentii*." Biochemistry **5**(1): 182-189.
- Bahn, Y.-S., G. M. Cox, J. R. Perfect and J. Heitman (2005). "Carbonic Anhydrase and CO<sub>2</sub> Sensing during *Cryptococcus neoformans* Growth, Differentiation, and Virulence." Current Biology **15**(22): 2013-2020.
- Bahn, Y.-S., S. Geunes-Boyer and J. Heitman (2007). "Ssk2 Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase Governs Divergent Patterns of the Stress-Activated Hog1 Signaling Pathway in *Cryptococcus neoformans*." Eukaryotic Cell **6**(12): 2278-2289.
- Blackwell, M., R. Vilgalys, T. Y. James and J. W. Taylor. (2012, 30 January). "Fungi. Eumycota: mushrooms, sac fungi, yeast, molds, rusts, smuts, etc." Retrieved 6 May 2019, from <http://tolweb.org/Fungi/2377/2012.01.30>.
- Bommanavar, S. B., S. Gugwad and N. Malik (2017). "Phenotypic switch: The enigmatic white-gray-opaque transition system of *Candida albicans*." Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP **21**(1): 82-86.
- Botts, M. R., S. S. Giles, M. A. Gates, T. R. Kozel and C. M. Hull (2009). "Isolation and Characterization of *Cryptococcus neoformans* Spores Reveal a Critical Role for Capsule Biosynthesis Genes in Spore Biogenesis." Eukaryotic Cell **8**(4): 595-605.
- Bouklas, T. and B. C. Fries (2015). "Aging as an emergent factor that contributes to phenotypic variation in *Cryptococcus neoformans*." Fungal Genetics and Biology **78**: 59-64.
- Bouklas, T., N. Jain and B. C. Fries (2017). "Modulation of Replicative Lifespan in *Cryptococcus neoformans*: Implications for Virulence." Frontiers in Microbiology **8**(98).
- Cordero, R. J. B., A. Bergman and A. Casadevall (2013). "Temporal Behavior of Capsule Enlargement by *Cryptococcus neoformans*." Eukaryotic Cell **12**(10): 1383-1388.
- Cordero, R. J. B., S. Frases, A. J. Guimarães, J. Rivera and A. Casadevall (2011). "Evidence for branching in cryptococcal capsular polysaccharides and consequences on its biological activity." Molecular Microbiology **79**(4): 1101-1117.

- Cramer, K. L., Q. D. Gerrald, C. B. Nichols, M. S. Price and J. A. Alspaugh (2006). "Transcription Factor Nrg1 Mediates Capsule Formation, Stress Response, and Pathogenesis in *Cryptococcus neoformans*." *Eukaryotic Cell* **5**(7): 1147-1156.
- Cruickshank, J. G., R. Cavill and M. Jelbert (1973). "Cryptococcus neoformans of Unusual Morphology." *Applied Microbiology* **25**(2): 309-312.
- Dambuza, I. M., T. Drake, A. Chapuis, X. Zhou, J. Correia, L. Taylor-Smith, N. LeGrave, T. Rasmussen, M. C. Fisher, T. Bicanic, T. S. Harrison, M. Jaspars, R. C. May, G. D. Brown, R. Yucecel, D. M. MacCallum and E. R. Ballou (2018). "The *Cryptococcus neoformans* Titan cell is an inducible and regulated morphotype underlying pathogenesis." *PLOS Pathogens* **14**(5): e1006978.
- Doering, T. L. (2009). "How sweet it is! Cell wall biogenesis and polysaccharide capsule formation in *Cryptococcus neoformans*." *Annual review of microbiology* **63**: 223-247.
- Eigenheer, R. A., Y. Jin Lee, E. Blumwald, B. S. Phinney and A. Gelli (2007). "Extracellular glycosylphosphatidylinositol-anchored mannoproteins and proteases of *Cryptococcus neoformans*." *FEMS Yeast Res* **7**(4): 499-510.
- Fries, B. C., D. L. Goldman and A. Casadevall (2002). "Phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans*." *Microbes and Infection* **4**(13): 1345-1352.
- Fries, B. C., D. L. Goldman, R. Cherniak, R. Ju and A. Casadevall (1999). "Phenotypic Switching in *Cryptococcus neoformans* Results in Changes in Cellular Morphology and Glucuronoxylomannan Structure." *Infection and Immunity* **67**(11): 6076-6083.
- Fu, C., S. Sun, R. B. Billmyre, K. C. Roach and J. Heitman (2015). "Unisexual versus bisexual mating in *Cryptococcus neoformans*: Consequences and biological impacts." *Fungal genetics and biology : FG & B* **78**: 65-75.
- Geddes, J. M. H., M. Caza, D. Croll, N. Stoykov, L. J. Foster and J. W. Kronstad (2016). "Analysis of the Protein Kinase A-Regulated Proteome of *Cryptococcus neoformans* Identifies a Role for the Ubiquitin-Proteasome Pathway in Capsule Formation." *mBio* **7**(1): e01862-01815.
- Gish, S. R., E. J. Maier, B. C. Haynes, F. H. Santiago-Tirado, D. L. Srikanta, C. Z. Ma, L. X. Li, M. Williams, E. C. Crouch, S. A. Khader, M. R. Brent and T. L. Doering (2016). "Computational Analysis Reveals a Key Regulator of Cryptococcal Virulence and Determinant of Host Response." *mBio* **7**(2): e00313-00316.
- Hadley, B., A. Maggioni, A. Ashikov, C. J. Day, T. Haselhorst and J. Tiralongo (2014). "Structure and function of nucleotide sugar transporters: Current progress." *Computational and Structural Biotechnology Journal* **10**(16): 23-32.
- Hommel, B., L. Mukaremera, R. J. B. Cordero, C. Coelho, C. A. Desjardins, A. Sturny-Leclère, G. Janbon, J. R. Perfect, J. A. Fraser, A. Casadevall, C. A. Cuomo, F. Dromer, K. Nielsen and A. Alanio (2018). "Titan cells formation in *Cryptococcus neoformans* is finely tuned by environmental conditions and modulated by positive and negative genetic regulators." *PLOS Pathogens* **14**(5): e1006982.
- Hull, C. M. and J. Heitman (2002). "Genetics of *Cryptococcus neoformans*." *Annual Review of Genetics* **36**(1): 557-615.
- Cherniak, R., E. Reiss, M. E. Slodki, R. D. Plattner and S. O. Blumer (1980). "Structure and antigenic activity of the capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* serotype A." *Molecular Immunology* **17**(8): 1025-1032.



- Chow, E. W. L., S. A. Clancey, R. B. Billmyre, A. F. Averette, J. A. Granek, P. Mieczkowski, M. E. Cardenas and J. Heitman (2017). "Elucidation of the calcineurin-Crz1 stress response transcriptional network in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*." *PLOS Genetics* **13**(4): e1006667.
- Jain, N., T. Bouklas, A. Gupta, A. K. Varshney, E. P. Orner and B. C. Fries (2016). "ALL2, a Homologue of ALL1, Has a Distinct Role in Regulating pH Homeostasis in the Pathogen *Cryptococcus neoformans*." *Infection and Immunity* **84**(2): 439-451.
- Jain, N., R. J. B. Cordero, A. Casadevall and B. C. Fries (2013). "Allergen1 regulates polysaccharide structure in *Cryptococcus neoformans*." *Molecular Microbiology* **88**(4): 713-727.
- Jain, N. and B. C. Fries (2008). "Phenotypic Switching of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*." *Mycopathologia* **166**(4): 181.
- Jain, N., A. Guerrero and B. C. Fries (2006). "Phenotypic switching and its implications for the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*." *FEMS Yeast Research* **6**(4): 480-488.
- Jain, N., L. Li, Y.-P. Hsueh, A. Guerrero, J. Heitman, D. L. Goldman and B. C. Fries (2009). "Loss of Allergen 1 Confers a Hypervirulent Phenotype That Resembles Mucoïd Switch Variants of *Cryptococcus neoformans*." *Infection and Immunity* **77**(1): 128-140.
- Jain, N., B. L. Wickes, S. M. Keller, J. Fu, A. Casadevall, P. Jain, M. A. Ragan, U. Banerjee and B. C. Fries (2005). "Molecular Epidemiology of Clinical *Cryptococcus neoformans* Strains from India." *Journal of Clinical Microbiology* **43**(11): 5733-5742.
- Jung, K.-W. and Y.-S. Bahn (2009). "The Stress-Activated Signaling (SAS) Pathways of a Human Fungal Pathogen, *Cryptococcus neoformans*." *Mycobiology* **37**(3): 161-170.
- Jung, W. H., A. Sham, R. White and J. W. Kronstad (2006). "Iron regulation of the major virulence factors in the AIDS-associated pathogen *Cryptococcus neoformans*." *PLoS biology* **4**(12): e410-e410.
- Kaufman, P. D., R. Kobayashi and B. Stillman (1997). "Ultraviolet radiation sensitivity and reduction of telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae* cells lacking chromatin assembly factor-I." *Genes Dev* **11**(3): 345-357.
- Kelliher, C. M., A. R. Leman, C. S. Sierra and S. B. Haase (2016). "Investigating Conservation of the Cell-Cycle-Regulated Transcriptional Program in the Fungal Pathogen, *Cryptococcus neoformans*." *PLoS genetics* **12**(12): e1006453-e1006453.
- Klutts, J. S. and T. L. Doering (2008). "Cryptococcal Xylosyltransferase 1 (Cxt1p) from *Cryptococcus neoformans* Plays a Direct Role in the Synthesis of Capsule Polysaccharides." *Journal of Biological Chemistry* **283**(21): 14327-14334.
- Kozubowski, L., S. C. Lee and J. Heitman (2009). "Signalling pathways in the pathogenesis of *Cryptococcus*." *Cellular Microbiology* **11**(3): 370-380.
- Kraus, P. R., D. S. Fox, G. M. Cox and J. Heitman (2003). "The *Cryptococcus neoformans* MAP kinase Mpk1 regulates cell integrity in response to antifungal drugs and loss of calcineurin function." *Molecular microbiology* **48**(5): 1377-1387.
- Kronstad, J., S. Saikia, E. D. Nielson, M. Kretschmer, W. Jung, G. Hu, J. M. H. Geddes, E. J. Griffiths, J. Choi, B. Cadieux, M. Caza and R. Attarian (2012). "Adaptation of *Cryptococcus neoformans* to mammalian hosts: integrated regulation of metabolism and virulence." *Eukaryotic cell* **11**(2): 109-118.

- Kronstad, J. W., G. Hu and J. Choi (2011). "The cAMP/Protein Kinase A Pathway and Virulence in *Cryptococcus neoformans*." *Mycobiology* **39**(3): 143-150.
- Lee, S. C., S. Phadke, S. Sun and J. Heitman (2012). "Pseudohyphal Growth of *Cryptococcus neoformans* Is a Reversible Dimorphic Transition in Response to Ammonium That Requires Amt1 and Amt2 Ammonium Permeases." *Eukaryotic Cell* **11**(11): 1391-1398.
- Li, L., G. Shen, Z.-G. Zhang, Y.-L. Wang, J. K. Thompson and P. Wang (2007). "Canonical heterotrimeric G proteins regulating mating and virulence of *Cryptococcus neoformans*." *Molecular biology of the cell* **18**(11): 4201-4209.
- Magditch, D. A., T.-B. Liu, C. Xue and A. Idnurm (2012). "DNA Mutations Mediate Microevolution between Host-Adapted Forms of the Pathogenic Fungus *Cryptococcus neoformans*." *PLOS Pathogens* **8**(10): e1002936.
- Maier, E. J., B. C. Haynes, S. R. Gish, Z. A. Wang, M. L. Skowrya, A. L. Marulli, T. L. Doering and M. R. Brent (2015). "Model-driven mapping of transcriptional networks reveals the circuitry and dynamics of virulence regulation." *Genome research* **25**(5): 690-700.
- Martinez, L. R., D. C. Ibom, A. Casadevall and B. C. Fries (2008). "Characterization of Phenotypic Switching in *Cryptococcus neoformans* Biofilms." *Mycopathologia* **166**(4): 175-180.
- Maruvada, R., L. Zhu, D. Pearce, Y. Zheng, J. Perfect, K. J. Kwon-Chung and K. S. Kim (2012). "*Cryptococcus neoformans* phospholipase B1 activates host cell Rac1 for traversal across the blood–brain barrier." *Cellular Microbiology* **14**(10): 1544-1553.
- McFadden, D. C., M. De Jesus and A. Casadevall (2006). "The Physical Properties of the Capsular Polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* Suggest Features for Capsule Construction." *Journal of Biological Chemistry* **281**(4): 1868-1875.
- Miyazato, A. (2016). "Mechanism of *Cryptococcus* Meningoencephalitis." *Medical Mycology Journal* **57**(1): J27-J32.
- Mogensen, E. G., G. Janbon, J. Chaloupka, C. Steegborn, M. S. Fu, F. Moyrand, T. Klengel, D. S. Pearson, M. A. Geeves, J. Buck, L. R. Levin and F. A. Mühlischlegel (2006). "*Cryptococcus neoformans* Senses CO<sub>2</sub> through the Carbonic Anhydrase Can2 and the Adenylyl Cyclase Cac1." *Eukaryotic Cell* **5**(1): 103-111.
- Moranova, Z., S. Kawamoto and V. Raclavsky (2009). "Hypoxia sensing in *cryptococcus neoformans*: biofilm-like adaptation for dormancy?" *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* **153**(3): 189-193.
- Moranova, Z., E. Virtudazo, K. Hricova, M. Ohkusu, S. Kawamoto, V. Husickova and V. Raclavsky (2014). "The CRZ1/SP1-like gene links survival under limited aeration, cell integrity and biofilm formation in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*." *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* **158**(2): 212-220.
- Moyrand, F., I. Lafontaine, T. Fontaine and G. Janbon (2008). "UGE1 and UGE2 regulate the UDP-glucose/UDP-galactose equilibrium in *Cryptococcus neoformans*." *Eukaryot Cell* **7**(12): 2069-2077.
- Noble, S. M., B. A. Gianetti and J. N. Witchley (2016). "*Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host." *Nature Reviews Microbiology* **15**: 96.

- O'Meara, T. R., D. Norton, M. S. Price, C. Hay, M. F. Clements, C. B. Nichols and J. A. Alspaugh (2010). "Interaction of *Cryptococcus neoformans* Rim101 and Protein Kinase A Regulates Capsule." *PLOS Pathogens* **6**(2): e1000776.
- O'Meara, T. R., W. Xu, K. M. Selvig, M. J. O'Meara, A. P. Mitchell and J. A. Alspaugh (2014). "The *Cryptococcus neoformans* Rim101 Transcription Factor Directly Regulates Genes Required for Adaptation to the Host." *Molecular and Cellular Biology* **34**(4): 673-684.
- Okagaki, L. H., A. K. Strain, J. N. Nielsen, C. Charlier, N. J. Baltes, F. Chrétien, J. Heitman, F. Dromer and K. Nielsen (2010). "Cryptococcal Cell Morphology Affects Host Cell Interactions and Pathogenicity." *PLOS Pathogens* **6**(6): e1000953.
- Okagaki, L. H., Y. Wang, E. R. Ballou, T. R. Meara, Y.-S. Bahn, J. A. Alspaugh, C. Xue and K. Nielsen (2011). "Cryptococcal Titan Cell Formation Is Regulated by G-Protein Signaling in Response to Multiple Stimuli." *Eukaryotic Cell* **10**(10): 1306.
- Okagaki, L. H., Y. Wang, E. R. Ballou, T. R. O'Meara, Y.-S. Bahn, J. A. Alspaugh, C. Xue and K. Nielsen (2011). "Cryptococcal Titan Cell Formation Is Regulated by G-Protein Signaling in Response to Multiple Stimuli." *Eukaryotic Cell* **10**(10): 1306-1316.
- Panepinto, J., L. Liu, J. Ramos, X. Zhu, T. Valyi-Nagy, S. Eksi, J. Fu, H. A. Jaffe, B. Wickes and P. R. Williamson (2005). "The DEAD-box RNA helicase Vad1 regulates multiple virulence-associated genes in *Cryptococcus neoformans*." *The Journal of Clinical Investigation* **115**(3): 632-641.
- Park, Y.-D., J. N. Jarvis, G. Hu, S. E. Davis, J. Qiu, N. Zhang, C. Hollingsworth, A. Loyse, P. J. Gardina, T. Valyi-Nagy, T. G. Myers, T. S. Harrison, T. Bicanic and P. R. Williamson (2018). "Transcriptional Profiling of Patient Isolates Identifies a Novel TOR/Starvation Regulatory Pathway in Cryptococcal Virulence." *mBio* **9**(6): e02353-02318.
- Pukkila-Worley, R., Q. D. Gerrald, P. R. Kraus, M.-J. Boily, M. J. Davis, S. S. Giles, G. M. Cox, J. Heitman and J. A. Alspaugh (2005). "Transcriptional Network of Multiple Capsule and Melanin Genes Governed by the *Cryptococcus neoformans* Cyclic AMP Cascade." *Eukaryotic Cell* **4**(1): 190-201.
- Rutherford, J. C., Y.-S. Bahn, B. van den Berg, J. Heitman and C. Xue (2019). "Nutrient and Stress Sensing in Pathogenic Yeasts." *Frontiers in Microbiology* **10**(442).
- Saputo, S., Y. Chabrier-Rosello, F. C. Luca, A. Kumar and D. J. Krysan (2012). "The RAM Network in Pathogenic Fungi." *Eukaryotic Cell* **11**(6): 708-717.
- Selvig, K. and J. A. Alspaugh (2011). "pH Response Pathways in Fungi: Adapting to Host-derived and Environmental Signals." *Mycobiology* **39**(4): 249-256.
- Specht, C. A. and S. M. Levitz (2006). "The molecular basis for the immunogenicity of *Cryptococcus neoformans* mannoproteins." *FEMS Yeast Research* **6**(4): 513-524.
- Steenbergen, J. N., J. D. Nosanchuk, S. D. Malliaris and A. Casadevall (2003). "*Cryptococcus neoformans* virulence is enhanced after growth in the genetically malleable host *Dictyostelium discoideum*." *Infection and immunity* **71**(9): 4862-4872.
- Steenbergen, J. N., H. A. Shuman and A. Casadevall (2001). "*Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**(26): 15245-15250.

- Trevijano-Contador, N., S. A. Rossi, E. Alves, S. Landín-Ferreiroa and O. Zaragoza (2017). "Capsule Enlargement in *Cryptococcus neoformans* Is Dependent on Mitochondrial Activity." Frontiers in microbiology **8**: 1423-1423.
- Turner, S. H., R. Cherniak and E. Reiss (1984). "Fractionation and characterization of galactoxylomannan from *Cryptococcus neoformans*." Carbohydrate Research **125**(2): 343-349.
- Walton, F. J., J. Heitman and A. Idnurm (2006). "Conserved Elements of the RAM Signaling Pathway Establish Cell Polarity in the Basidiomycete *Cryptococcus neoformans* in a Divergent Fashion from Other Fungi." Molecular Biology of the Cell **17**(9): 3768-3780.
- Williamson, P. R. (1997). "Laccase and melanin in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*." Front Biosci **2**: e99-107.
- Wills, E. A., I. S. Roberts, M. Del Poeta, J. Rivera, A. Casadevall, G. M. Cox and J. R. Perfect (2001). "Identification and characterization of the *Cryptococcus neoformans* phosphomannose isomerase-encoding gene, *MAN1*, and its impact on pathogenicity." Molecular Microbiology **40**(3): 610-620.
- Xue, C., Y.-S. Bahn, G. M. Cox and J. Heitman (2006). "G protein-coupled receptor Gpr4 senses amino acids and activates the cAMP-PKA pathway in *Cryptococcus neoformans*." Molecular biology of the cell **17**(2): 667-679.
- Zaragoza, O. (2011). "Multiple Disguises for the Same Party: The Concepts of Morphogenesis and Phenotypic Variations in *Cryptococcus neoformans*†." Frontiers in Microbiology **2**(181).
- Zaragoza, O., R. García-Rodas, J. D. Nosanchuk, M. Cuenca-Estrella, J. L. Rodríguez-Tudela and A. Casadevall (2010). "Fungal Cell Gigantism during Mammalian Infection." PLOS Pathogens **6**(6): e1000945.
- Zaragoza, O. and K. Nielsen (2013). "Titan cells in *Cryptococcus neoformans*: cells with a giant impact." Current Opinion in Microbiology **16**(4): 409-413.
- Zaragoza, O., M. L. Rodrigues, M. De Jesus, S. Frases, E. Dadachova and A. Casadevall (2009). "The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*." Advances in applied microbiology **68**: 133-216.
- Zaragoza, O., A. Telzak, R. A. Bryan, E. Dadachova and A. Casadevall (2006). "The polysaccharide capsule of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* enlarges by distal growth and is rearranged during budding." Molecular Microbiology **59**(1): 67-83.