

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

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Martin Bauer**

Faktory virulence u kvasinky *Cryptococcus neoformans*

*Cryptococcus neoformans* virulence factors

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.

## **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 16. 8. 2019

Podpis

## ABSTRAKT

*Cryptococcus neoformans* je oportunně patogenní kvasinkou zapříčiňující kolem 600 000 úmrtí ročně. Její schopnost vyvolat infekci je dána faktory virulence, mezi které patří schopnost růstu při zvýšené teplotě, polysacharidová kapsule, tolerance oxidativního stresu a exprese povrchových proteinů. Lze mezi ně zařadit i neobvyklé resistantní titánské buňky vznikající v procesu titanizace a proces fenotypového přepínání. I přes intenzivní výzkum však stále nejsou tyto faktory virulence prozkoumané do detailu. Titánské buňky mají známé indukující faktory a účastníci se signální dráhy, úplný model titanizace však dosud neexistuje. Mechanismus řídicí fenotypové přepínání je také zatím neznámý. V této práci jsou představeny a shrnuty současné znalosti o faktorech virulence *C. neoformans*.

**Klíčová slova:** *Cryptococcus neoformans*, faktory virulence, přepínání fenotypů, mukoidní fenotyp, titánské buňky

## ABSTRACT

*Cryptococcus neoformans* is an opportunistic pathogenic yeast causing around 600 000 deaths annually. Its ability to cause a chronic infection is given by multiple virulence factors, which include the ability to grow in high temperature, polysaccharide capsule, oxidative stress tolerance and the expression of surface proteins. Unusual and resistant titan cells, which develop through the process of titanization, and the process of phenotypic switching can also be included. Despite intensive research, these virulence factors are yet to be fully described. Inducing factors of titan cells and participating signalling pathways are known. However, a complete model of titanization does not yet exist. So far, the mechanism of phenotypic switching is also unknown. In this work the current knowledge of virulence factors of *C. neoformans* is presented and summarised.

**Keywords:** *Cryptococcus neoformans*, virulence factors, phenotypic switching, mucoid phenotype, titan cells

# OBSAH

<b>SEZNAM ZKRATEK.....</b>	<b>V</b>
<b>1 ÚVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2 ŽIVOTNÍ CYKLUS, ROZMNOŽOVÁNÍ A VLIV NA VIRULENCI .....</b>	<b>3</b>
<b>3 FAKTORY VIRULENCE .....</b>	<b>7</b>
3.1 Buněčná stěna.....	7
3.2 Adaptace na zvýšenou teplotu.....	8
3.3 Kapsule.....	9
3.4 Oxidativní stres.....	12
3.5 Povrchové proteiny.....	13
3.6 Fenotypové přepínání .....	15
3.6.1 Mukoidní fenotyp .....	16
3.7 Titánské buňky .....	17
<b>4 ZÁVĚR .....</b>	<b>19</b>
<b>5 ZDROJE .....</b>	<b>24</b>

## **SEZNAM ZKRATEK**

BHI – Brain Heart Infusion broth (kultivační médium)

BS – buněčná stěna

CME – kryptokoková meningoencefalitida

CNS – centrální nervová soustava

GXM – glukuronoxylomanan

GXMGal – galaktooxylomanan

HEB – hematoencefalická bariéra

HOG – High Osmolarity Glycerol, signální dráha

MAPK – Mitogenem Aktivovaná Proteinkinasa

MC – mukoidní

MAT – mating type

PA – pantotenová kyselina

PH – pseudohyální

PKA/PKC – Protein Kinasa A/Protein Kinasa C

PLB/PLC – Fosfolipasa B/Fosfolipasa C

PS – polysacharid

ROS – reactive oxygen species

RNS – reactive nitrogen species

SM – hladký

SRG – Structural Reported Groups

TF – transkripční faktor

UDP – uridin difosfát

WR – zvrásněný

# 1 ÚVOD

*Cryptococcus neoformans* je kvasinka patřící do kmene Basidiomycota. Poprvé byla identifikovaná v roce 1894 (Busse 1894) a později byla na základě imunologických vlastností kapsulárních polysacharidů (PS) rozdělena na několik sérotypů (Evans 1950, Wilson, Bennett et al. 1968) náležících dvěma původním variantám, var. *neoformans* a var. *gattii* (Kwon-Chung, Bennett et al. 1982). Od té doby prošlo dělení druhu *C. neoformans* několika změnami (Tabulka 1).

Druh	Varianta	Sérotyp
<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> (Franzot, Salkin et al. 1999)	A
	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> (Franzot, Salkin et al. 1999)	D
<i>Cryptococcus gattii</i> (Kwon-Chung, Boekhout et al. 2002)	–	B
		C

Tabulka 1 – Současné dělení původního druhu *C. neoformans*. Původní *C. neoformans* var. *gattii* a var. *neoformans* byly povýšeny na druh. Takto nově vzniklý druh *C. neoformans* byl dále rozdělen na varianty *neoformans* a *grubii*. V této práci bude pozornost věnována *C. neoformans* var. *grubii* a var. *neoformans*. *C. neoformans* ohrožuje imunokompromitované jedince, *C. gattii* je hrozbou pro imunokompetentní jedince.

*C. neoformans* je primárně volně žijící obligátně aerobní kvasinka běžně se nacházející na ptačích, zejména holubích, exkrementech nebo v jejich hnízdech. V tomto prostředí se setkává se svými přirozenými predátory, kterými mohou být *Acanthamoeba castellanii* (Steenbergen, Shuman et al. 2001) nebo *Dictiostelium discoideum* (Steenbergen, Nosanchuk et al. 2003). Seleční tlak vyvolaný prostředím a těmito predátory umožnil vývoj různých faktorů, které kvasince *C. neoformans* umožnily začít využívat novou niku, prostředí hostitele. Mezi tyto faktory patří zejména schopnost růstu při zvýšené teplotě pomocí udržování integrity buněčné stěny, dále polysacharidová kapsule, melanizace buněčné stěny, schopnost zneškodnit oxidativní a nitrosativní činidla a exprese různých povrchových proteinů.

*C. neoformans* také umí navodit změny ve fenotypu a v morfologii buňky, které dále mění jeho virulenci nebo resistenci. Změny ve fenotypu jsou dány procesem fenotypového přepínání (Goldman, Fries et al. 1998), které bylo popsáno i u jiných patogenů, například fenotypové přepínání povrchových lipoproteinů u *Mycoplasma bovis* (Lysnyansky, Rosengarten et al. 1996), antigenní variace u rodu *Trypanosoma* (Myler, Allison et al. 1984), fázová variace u rodu *Salmonella* (Silverman, Zieg et al. 1979) nebo přepínání kapsule u *Neisseria meningitidis* (Swartley, Marfin et al. 1997). Změny v morfologii typicky pozorujeme při přechodu z kvasinkové formy na formu hyfální během sexuálního rozmnožování. Narozdíl od kvasinky *Candida albicans*, jednoho z nejznámějších houbových patogenů, však *C. neoformans* hyfy během infekce netvoří. Morfologické změny během infekce *C. neoformans* zahrnují dramatické zvětšení buňky, kapsule a buněčné stěny a několik dalších fenoménů. Zvětšením buňky, kapsule a buněčné stěny vznikne resistantní buněčný typ nazývaný titánské buňky (Zaragoza, García-Rodas et al. 2010). Dalším z fenoménů jsou změny u stárnoucích buněk (Cordero, Pontes et al. 2011). Změny v morfologii a fenotypu jsou doprovázeny změnami v resistenci a virulenci buněk a dále zvyšují virulenci nebo persistenci v hostiteli.

Díky výše zmíněným faktorům se *C. neoformans* stal velmi persistentním patogenem schopným odolávat širokému spektru terapií.

Seznam možných hostitelů této kvasinky je velmi obsáhlý. Mohou jimi být výše zmíněné amoeby (Chrisman, Albuquerque et al. 2011), bezobratlí (např. *Galleria mellonella* (García-Rodas, Casadevall et al. 2011), savci (Lester, Kowalewich et al. 2004) včetně delfinů (Venn-Watson, Daniels et al. 2012) nebo koal (Kido, Makimura et al. 2012), dále ptáci (Lester, Kowalewich et al. 2004) a dokonce i rostliny (Warpeha, Park et al. 2013).

S kvasinkou *C. neoformans* přijde během života do kontaktu velká část lidí náhodným vdechnutím bazidiospor nebo vysušených buněk, které se usadí v plicích. Zde se setkávají s alveolárními makrofágy, které hrají důležitou roli v imunitní odpovědi a celkovém průběhu infekce (Shao, Mednick et al. 2005). Většina takových případů je asymptomatická a kvasinka je odstraněna činností imunitního systému nebo se stává dormantní v granulomech či uvnitř fagosomu makrofágů (Baker 1976, Feldmesser, Kress et al. 2000, Alanio, Vernel-Pauillac et al. 2015). V případech utlumené imunity je však schopná se množit a šířit se dále po těle volně i v makrofázích do většiny nebo všech orgánů, přičemž ale preferuje centrální nervovou soustavu (CNS). Do CNS proniká přes hematoencefalickou bariéru (HEB) a vyvolává zde závažnou kryptokokovou meningoencefalitidu (CME).

*C. neoformans* je také schopný z makrofágů unikat, a to lyzí hostitelské buňky nebo procesem nonlytické exocytózy (vomocytóza), která makrofágy nepoškodí (Alvarez and Casadevall 2006, Ma, Croudace et al. 2006, Watkins, Andrews et al. 2018). Téma lidské nákazy touto kvasinkou (kryptokokóza) dobře pokrývá souhrnná práce „Cryptococcosis“ (Maziarz and Perfect 2016).

Cílem mé práce je představit a shrnout současné znalosti o faktorech virulence u kvasinky *C. neoformans*, což pomůže lepšímu pochopení její patogeneze.

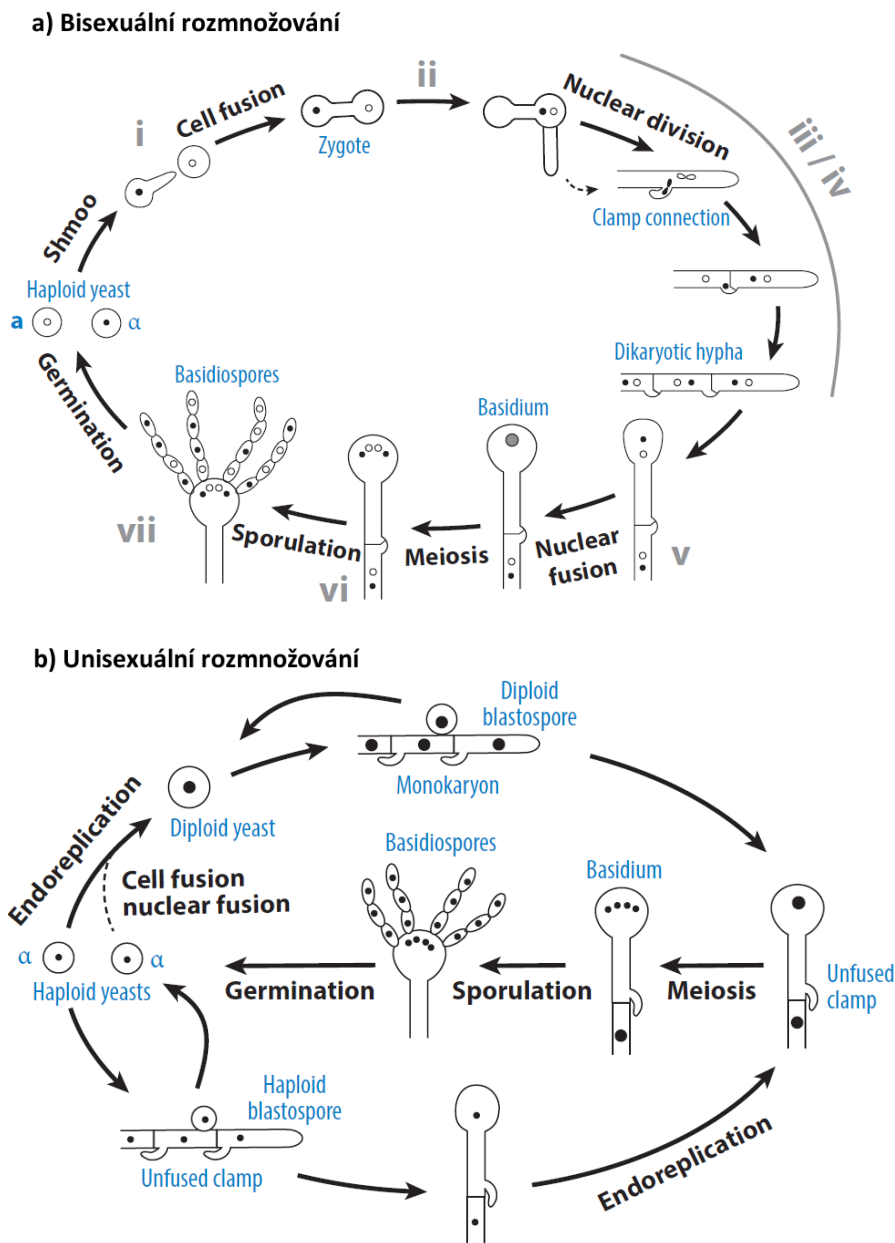
## **2 ŽIVOTNÍ CYKLUS, ROZMNOŽOVÁNÍ A VLIV NA VIRULENCI**

Životní cyklus *C. neoformans* zahrnuje asexuální stadium pučící kvasinky a sexuální stadia, ve kterých probíhá meióza a tvorba bazidiospor. Sexuální stadia se vyznačují hyfovým růstem a hyfy jsou pozorovány při bisexuálním (Kwon-Chung 1975) nebo unisexuálním rozmnožování (Lin, Hull et al. 2005). Unisexuální rozmnožování zahrnuje i haploidní pučení (Wickes, Mayorga et al. 1996).

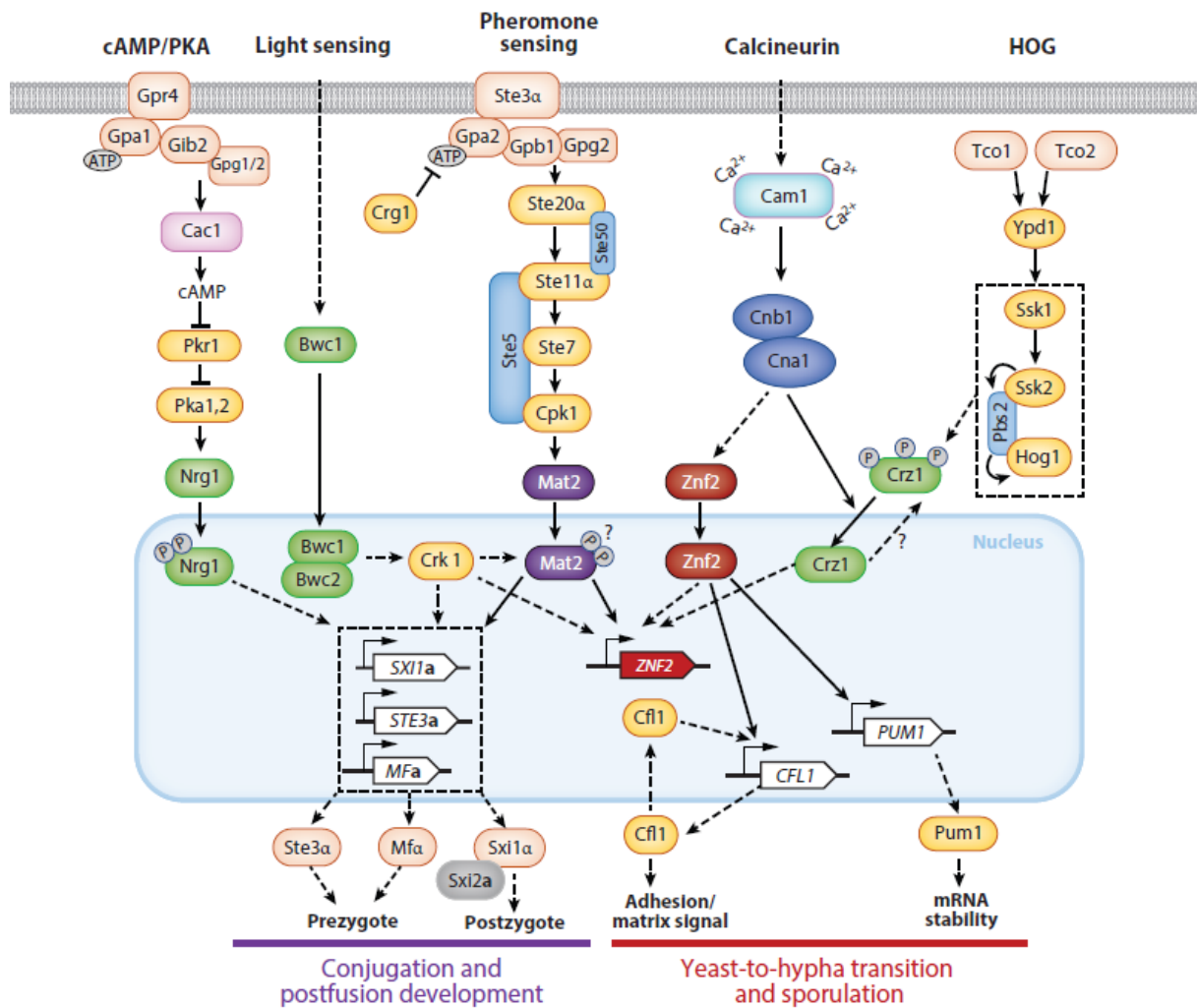
*C. neoformans* má dva párovací typy (mating type), **a** a  $\alpha$ , s odpovídajícími MAT**a** a MAT $\alpha$  lokusy. Unisexuální rozmnožování se vyskytuje zejména u  $\alpha$  párovacích typů (Wickes, Mayorga et al. 1996, Lin, Huang et al. 2006). Při haploidním pučení nedochází k setkávání dvou partnerů a vzniku dikaryotických buněk, a tedy ani k fúzi jader. Diploidního stavu je dosaženo pomocí endoreplikace. Průběh bisexuálního a unisexuálního rozmnožování ukazuje Obrázek 1.

Filamentace je regulována vlivem signálů z vnějšího prostředí. Tyto signály jsou vnímány známými drahami (HOG (Bahn, Kojima et al. 2005) nebo cAMP/PKA (D'Souza, Alspaugh et al. 2001)). Následná produkce feromonů, které jsou vnímány feromonovým receptorem (Ste3) partnera, spouští filamentaci přes feromonovou MAPK signální dráhu aktivací transkripčních faktorů Mat2 a Znf2 (Davidson, Nichols et al. 2003) (viz Obrázek 2).





Obrázek 1 - Znáornění průběhu bisexuálního a unisexuálního rozmnožování a tvorby hyf u *C. neoformans*.  
 a) Bisexuální rozmnožování s partnery opačného párovacího typu. Nejprve dochází k fúzi buněk a vzniku zygoty. Následuje migrace jader a vznik hyf s přehrádkami a přezkami. Na apexu se diferencuje bazidium, ve kterém probíhá meióza. Nakonec dochází ke sporulaci a vzniku bazidiospor.  
 b) Dvě možné cesty unisexuálního rozmnožování. Horní cesta zobrazuje unisexuální rozmnožování dvou partnerů  $\alpha$  typu. Při něm opět dochází k fúzi buněk i jader. Spodní cesta zobrazuje haploidní pučení. Hyfy při něm vznikají pouze z jedné haploidní buňky, která později prochází endoreplikací. Přezky vznikají, ty ale nepropojují sousední buňky. Na apexu se diferencuje bazidium, proběhne meióza, dojde ke sporulaci a vzniku bazidiospor. Existuje ještě možnost, že k endoreplikaci dojde už ve stadiu kvasinky (b), horní cesta), v tomto případě se hyfa vyvíjí také jen z jedné buňky. Převzato a upraveno podle Zhao, Lin et al. (2019)



Obrázek 2 – Současná představa genetické regulace pohlavního rozmnožování. Přerušované šipky značí potenciální regulace, otazníky značí nepotvrzené charakteristiky. Na regulaci se podílí (zleva) cAMPK/PKA dráha vnímající koncentraci živin, světlo vnímající dráha, feromonová dráha, kalcineurin a osmosensitivní HOG dráha. Tyto dráhy předávají signál konečným transkripčním faktorům, kterými jsou Mat2, Sxi1a/Sxi2a a Znf2, které regulují sexuální vývoj a morfogenezi. Převzato ze Zhao, Lin et al. (2019)

MAT lokus *C. neoformans* je unikátní svou velikostí (přes 100 kbp) a obsahuje více než 20 genů, mezi nimiž jsou homeodoménové geny, geny pro feromonové receptory, feromony a některé další komponenty feromonové signální dráhy (Lengeler, Fox et al. 2002). Některé z produktů těchto genů jsou důležité pro virulenci, například feromonový receptor Ste3 (viz kapitola 3.7 a Chang, Miller et al. (2003)), Ste12, (regulace kapsule a melanizace) (Chang, Wickes et al. 2000, Chang, Penoyer et al. 2001) nebo Ste20 (růst při zvýšené teplotě) (Wang, Nichols et al. 2002).

Pozorovaný poměr mezi  $\alpha$  a  $\alpha$  typy v klinických i přírodních izolátech je dramaticky ve prospěch  $\alpha$  typu (Kwon-Chung (1978), citováno podle Zhao, Lin et al. (2019)), proto byla zajímavá otázka, proč tomu tak je. Možností mohla být i skutečnost, že je  $\alpha$  typ virulentnější.

První práce svědčily ve prospěch této hypotézy (Kwon-Chung, Edman et al. 1992), avšak pozdější výzkumy obecné posílení virulence u  $\alpha$  párovacích typů nepotvrzují (Chang, Penoyer et al. 2001, Nielsen, Cox et al. 2003, Nielsen, Cox et al. 2005, Zhai, Zhu et al. 2013). Rozdíl ve virulenci mezi párovacími typy nebyl pozorován ani u příbuzného *Cryptococcus gattii* (Zhu, Zhai et al. 2013).

Další studie zabývající se možnými rozdíly ve virulenci párovacích typů ukazovala na lepší schopnost  $\alpha$  párovacího typu šířit se do CNS (neurotropismus) během koinfekce oběma párovacími typy kmene H99 (sérotyp A) (Nielsen, Cox et al. 2005). Jiná studie, provedená na kmene sérotypu D, však rozdíly v neurotropismu nepozoruje (Zhai, Zhu et al. 2013), pouze naznačuje vliv míry exprese *ZNF2*. Nepoměr výskytu párovacích typů se tedy zdá být spíše výsledkem unisexuálního rozmnožování, které je asociováno s  $\alpha$  párovacím typem.

### 3 FAKTORY VIRULENCE

Faktorem virulence se rozumí cokoli, co patogenu umožňuje infikovat a poškozovat hostitele, tedy co umožňuje patogenu být patogenem. Buněčná stěna typicky faktorem virulence není, ale z důvodu, že obsahuje melanin a je důležitá pro růst při zvýšené teplotě, se jí zde budu také věnovat.

Faktory virulence *C. neoformans* jsou tedy melanizace buněčné stěny, růst při zvýšené teplotě, polysacharidová kapsule, schopnost vydržet oxidativní a nitrosativní stres ve fagosomu makrofágů, několik povrchových proteinů důležitých v různých fázích infekce, fenotypové přepínání a tvorba titánských buněk.

#### 3.1 Buněčná stěna

Buněčná stěna (BS) je polysacharidovou strukturou ležící vně plasmatické membrány. Zajišťuje tvar buňky, dodává jí mechanickou ochranu a tvoří bariéru proti difuzi různých molekul.

Majoritním polysacharidem buněčné stěny je lineární  $\beta(1,3)$ -glukan prokřížovaný kratšími jednotkami  $\beta(1,6)$ -glukanu.  $\alpha(1,3)$ -glukan je dalším polysacharidem BS, který je důležitý pro udržení kapsule (Reese and Doering 2003). Dále se zde nachází chitin, jehož značná část je deacetylovaná na chitosan (Banks, Specht et al. 2005). Chitin a chitosan jsou důležité pro integritu BS a virulenci (Baker, Specht et al. 2007, Baker, Specht et al. 2011).

V buněčné stěně se také nachází množství proteinů (Eigenheer, Lee et al. 2007), z nichž mnoho je důležitých pro virulenci, například enzymy syntetizující polysacharidy BS (např. chitin deacetylasy, viz níže), fosfolipasa B (Plb1) (Maruvada, Zhu et al. 2012) a proteasy (viz kapitola 3.5).

Syntéza  $\alpha(1,3)$ -glukanu je zajištěna  $\alpha$ -glukan-syntasou Ags1 z jednotek UDP-glukosy (Reese and Doering 2003).  $\beta(1,3)$ -glukan je syntetizován  $\beta$ -glukan syntasou Fks1 (Thompson, Douglas et al. 1999).  $\beta(1,6)$ -glukan je syntetizován pomocí Kre5, Kre6 a Skn1 (Gilbert, Donlin et al. 2010). Syntézu chitinu zajišťují chitin syntasy (například Chs3) (Banks, Specht et al. 2005), deacetylaci na chitosan provádějí chitin deacetylasy (Cda1, Cda2, Cda3) (Baker, Specht et al. 2007). Remodelace BS pomocí těchto enzymů je nezbytná pro udržení její integrity ve zvýšené teplotě (viz kapitola 3.2) a je tedy nezbytným virulenčním faktorem.

Mezi polymery buněčné stěny se ukládá také pigment melanin. Melanin chrání buňku před škodlivými účinky UV záření ve vnějším prostředí, v hostiteli pak před oxidativním a nitrosativním stresem, který využívají hostitelské makrofágy (Wang and Casadevall 1994). Kromě toho poskytuje ochranu proti množství dalších faktorů, například zlepšuje termotoleranci nebo chrání buňky před enzymatickou degradací a léčivy (Rosas and Casadevall 2001, van Duin, Casadevall et al. 2002). Melanizované buňky jsou díky tomu značně resistantní. Jde tedy o významný faktor virulence.

Melanin je syntetizován z katecholaminů extracelulárními lakasami Lac1 a Lac2 (Williamson 1997, Pukkila-Worley, Gerrald et al. 2005), které jsou pod kontrolou cAMP/PKA signalizace (Pukkila-Worley, Gerrald et al. 2005).

### **3.2 Adaptace na zvýšenou teplotu**

Schopnost růst při tělesné teplotě je základním předpokladem pro to, aby mikroorganismus mohl být pro člověka patogenní. U kvasinek je tato schopnost zajištěna aktivní remodelací a udržováním integrity buněčné stěny (viz například souhrnné práce o udržování integrity buněčné stěny u *Saccharomyces cerevisiae* (Heinisch, Lorberg et al. 1999, Klis, Mol et al. 2002)), přičemž zde hraje centrální roli stresová signalizace pomocí PKC/MAPK dráhy.

PKC/MAPK dráha udržuje integritu buněčné stěny i u *C. neoformans*. MAP kinasa byla nazvaná Mpk1 a byla identifikována v roli pro udržení integrity BS ve zvýšené teplotě v roce 2003 (Kraus, Fox et al. 2003). Mpk1 podléhá fosforylaci v odpovědi na porušení integrity buněčné stěny a ovlivňuje expresi genu pro  $\beta(1,3)$ -glukan syntasu (*FKS1*). Zároveň bylo v této práci zjištěno, že k udržování integrity buněčné stěny přispívá i činnost kalcineurinu.

Kalcineurin udržuje integritu buněčné stěny interakcí s transkripčním faktorem Crz1 (také označován jako Sp1), který je v odpovědi na zvýšenou teplotu, vápenaté ionty a poškození BS lokalizován do jádra, kde indukuje expresi chitin syntasy (Lev, Desmarini et al. 2012). Crz1 řídí integritu buněčné stěny také v závislosti na PKC při nedostatku živin (Adler, Park et al. 2011).

Reakce na zvýšenou teplotu však nezahrnuje pouze změnu exprese genů pro enzymy buněčné stěny, ale dochází ke změně exprese široké škály genů kódujících například proteiny translace, enzymy chránící před oxidativním stresem (oxidoreduktasy) nebo chaperonové a heat-shock proteiny.

Kromě Mpk1, Crz1 a kalcineurinu je také delší dobu známo několik proteinů hrajících roli při růstu ve zvýšené teplotě – GTPasa Ras1 (Alspaugh, Cavallo et al. 2000), p21-aktivovaná kinasa Ste20, která je součástí MAT lokusu (Wang, Nichols et al. 2002), fosfolipidy vázající protein Cts1 (Calcineurin Temperature Suppressor 1), který odpovídá na aktivitu kalcineurinu (Fox, Cox et al. 2003), vakuolární ATPasa Vph1 (Erickson, Liu et al. 2001) a trehalosa syntasa (Petzold, Himmelreich et al. 2006).

Ve dvou případech byla analyzována exprese při adaptaci na zvýšenou teplotu. Byla pozorována indukce genů pro proteiny důležité pro translaci (ribosomální proteiny, tEF1 $\alpha$  a tIF3), chaperon BiP a heat-shock proteiny, mitochondriální proteiny a oxidoreduktasy (Steen, Lian et al. 2002). V druhém případě byla mimo jiné pozorována indukce genů pro chitin syntasu (*CHS6*), protein kinasu asociovanou se syntézou trehalosy (*RIM15*) a indukce genu *MGA2* (biosyntéza mastných kyselin, filamentace) (Kraus, Boily et al. 2004).

Nedávná práce zkoumá regulační roli protein kinasu Sch9 a transkripčního faktoru Hsf1 (Heat Shock Factor 1) v termotoleranci a odpovědi na oxidativní stres (Yang, Jung et al. 2017). Sch9 se zdá regulovat expresi řady genů důležitých v odpovědi na zvýšenou teplotu přímo i pomocí regulace exprese *HSF1* a/nebo posttranslační regulace Hsf1. Hsf1 pak reguluje expresi genů pro heat-shock proteiny, chaperony a pro enzymy odpovídající na oxidativní stres, v souhlasu s pracemi zkoumajícími expresi v závislosti na teplotě (Steen, Lian et al. 2002, Kraus, Boily et al. 2004).

### **3.3 Kapsule**

Kapsule je velmi důležitým faktorem virulence. Přichází do kontaktu s prostředím hostitele a její polysacharidy mohou do značné míry ovlivňovat, jakým způsobem na kvasinku zareaguje imunitní systém hostitele (tomuto obšírnému tématu se věnuje například souhrnná práce od Vecchiarelli, Pericolini et al. (2013)). Kapsule také inhibuje fagocytózu (Kozel and Gotschlich 1982) a chrání proti oxidačním činidlům (Zaragoza, Chrisman et al. 2008). Nejnovější výzkum popisuje schopnost kapsulárních polysacharidů pufovat pH fagosomu díky přítomnosti glukuronové kyseliny (De Leon-Rodriguez, Fu et al. 2018). Kapsule obaluje pravděpodobně také spory (Botts, Giles et al. 2009).

Kapsule je tvořena polysacharidem glukuronoxylomananem (GXM, 90-95 %) a minoritním polysacharidem galaktoxyloomananem (GXMGal) (Turner, Cherniak et al. 1984). Tyto polysacharidy mohou mít molekulovou hmotnost až 7 MDa (McFadden, De Jesus et al. 2006). Manosová kostra GXM může na některých pozicích podléhat O-acetylaci (Previato, Vinogradov et al. 2017), která má význam při interakci s imunitním systémem (Ellerbroek, Lefeber et al. 2004).

Polysacharidy kapsule jsou tvořeny opakujícími se skupinami, které jsou označovány jako SRG (Structural Reported Groups). V současnosti je známo šest takových skupin lišících se v místech substitucí na manosové kostře (viz Obrázek 3).

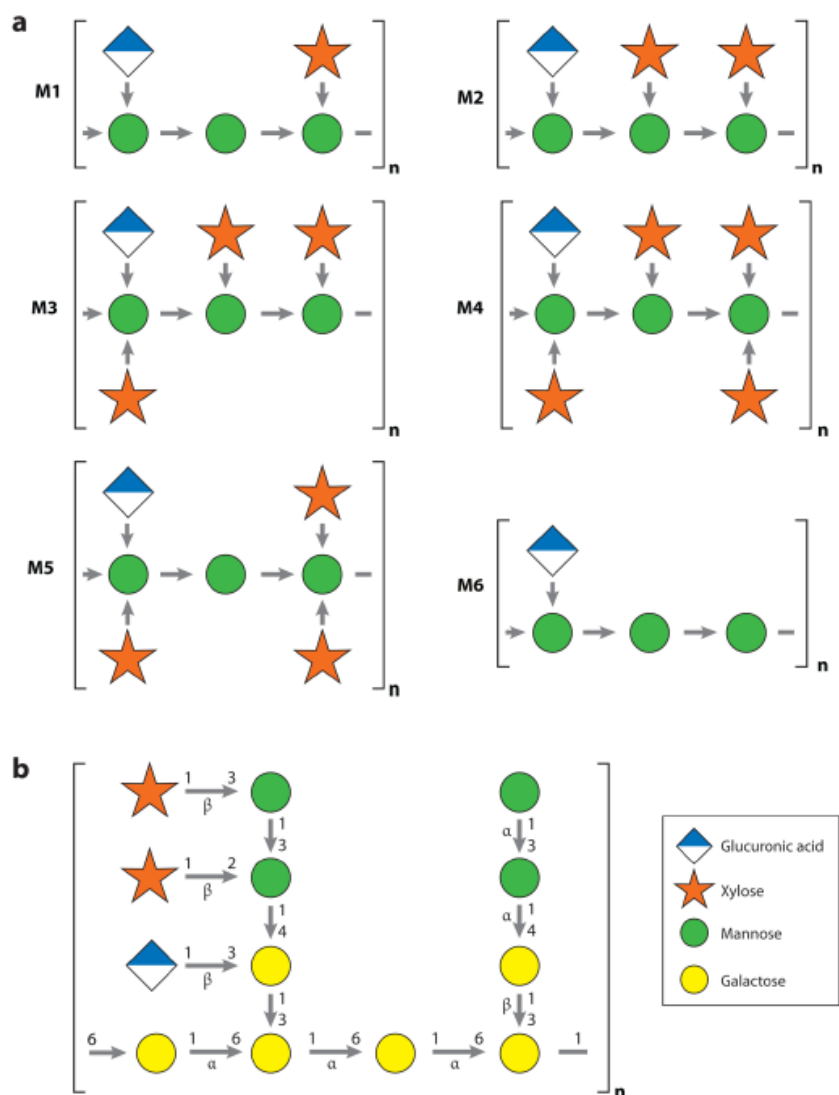
Kapsule je variabilní v odpovědi na extracelulární signály a vnitřní vývojové signály; může se měnit její velikost, chemická struktura nebo fyzikální vlastnosti.

Z vnějších podmínek indukují zvětšování kapsule zvýšená koncentrace CO<sub>2</sub> (Granger, Perfect et al. 1985), nízká koncentrace živin (Zaragoza and Casadevall 2004) nedostatek železa (Vartivarian, Anaissie et al. 1993) nebo savčí sérum (Zaragoza, Fries et al. 2003). Tyto podmínky ukazují na to, že k indukci zvětšení kapsule dochází při kontaktu s prostředím plíc hostitele.

Hlavní signální dráhou, která v závislosti na těchto signálech reguluje velikost kapsule, je cAMP/PKA (D'Souza, Alspaugh et al. 2001, Geddes, Caza et al. 2016) pomocí transkripčního faktoru Nrg1 (Cramer, Gerrald et al. 2006).

Úloha kapsule jako virulenčního faktoru je nezpochybnitelná, otázka vlivu velikosti kapsule na virulenci je složitější. Studií o vlivu velikosti kapsule na závažnost infekce bylo provedeno několik. Ve dvou případech byla infekce závažnější u hyperkapsulárních kvasinek (Robertson, Najjuka et al. 2014, Bojarczuk, Miller et al. 2016), v dalším případě byla závažnější infekce hypokapsulárními kvasinkami (Sabiiti, Robertson et al. 2014) a v jednom případě byly méně virulentní kvasinky hypo- i hyperkapsulární (Pool, Lowder et al. 2013).

Někteří autoři (Casadevall, Coelho et al. 2018) navrhují, že by se tyto zdánlivě rozporné výsledky daly vysvětlit buď odlišným vlivem velikosti kapsule v jednotlivých fázích infekce nebo by velikost kapsule mohla odrážet míru adaptace kvasinky na hostitelské podmínky. Kapsule je indukovaná v podmínkách nedostatku železa a živin a malá kapsule by tedy mohla znamenat kvasinku adaptovanou na prostředí hostitele, a tedy schopnou mu více uškodit.



Obrázek 3 – a) Struktura šesti oligosacharidových skupin (SRG) M1-M6, které se liší substitucemi na manosové kostře; (Cherniak, Valafar et al. 1998)

b) strukturální jednotka GMXGal (Heiss, Klutts et al. 2009)

Legenda (shora dolů): glukuronová kyselina, xylosa, manosa, galaktosa.

Převzato z a citováno podle Doering (2009)

Ve vztahu velikosti kapsule a jejího vlivu na virulenci se objevují také práce zkoumající fenotypové přepínání, které popisují zvýšenou virulenci u buněk, u kterých došlo ke zvětšení kapsule (Goldman, Fries et al. 1998, Fries, Goldman et al. 1999, Fries, Taborda et al. 2001). Tyto změny ve virulenci by ale mohly být způsobeny změnami komplexnějšími, než je jen změna ve velikosti kapsule (viz kapitola 3.6.1).

Změny v kapsuli nastávají také během stárnutí buněk (Cordero, Pontes et al. 2011) a bylo potvrzeno, že mají vliv na virulenci. Kapsule starých buněk jsou větší a kompaktnější, což by mohlo přispívat ke zvýšené resistenci těchto buněk vůči léčivům, oxidativnímu stresu vyvolanému peroxidem vodíku nebo fagocytóze (Bouklas, Pechuan et al. 2013).



### 3.4 Oxidativní stres

Během infekce se kvasinka musí adaptovat na oxidativní a nitrosativní stres způsobovaný kyslíkovými (ROS) a dusíkatými (RNS) radikály. ROS a RNS jsou využívány makrofágy ke zneškodnění patogenů. Kvasinka se tedy s nimi dostává do kontaktu ve fagosomu.

Je známo, že kvasinka ke zneškodnění ROS a RNS během infekce využívá peroxiredoxin (Tsa1, Tsa3) (Missall, Pusateri et al. 2004), thioredoxin (Trx1, Trx2) (Missall and Lodge 2005a) a thioredoxin reduktasu (Trr1) (Missall and Lodge 2005b), superoxid dismutasu Sod1 (Cox, Harrison et al. 2003) a Sod2 (Giles, Batinic-Haberle et al. 2005), alternativní oxidasu (Aox1) (Akhter, McDade et al. 2003) nebo flavohemoglobin denitrosilasu (Fhb1) (de Jesús-Berrios, Liu et al. 2003). Také byl pozorován možný transportér manitolu (Polyol Transporter 1, Ptp1), který byl vysoce exprimovaný v kvasinkách izolovaných z amoeb i makrofágů (Derengowski, Paes et al. 2013).

Byla zkoumána také změna v genové expresi v odpovědi na oxidativní stres u buněk vystavených peroxidu vodíku (Upadhya, Campbell et al. 2013) a u buněk izolovaných z fagosomů makrofágů (Fan, Kraus et al. 2005). Kromě množství enzymů patřících do skupiny oxidoreduktas dochází ke zvýšené expresi genů pro proteiny účastnící se transportu hexos nebo iontů železa, dále genů pro proteiny účastnící se autofágie a metabolismu uhlíku, například enzymy pentosafosfátové dráhy (Upadhya, Campbell et al. 2013).

V práci z roku 2015 byla navržena role vysokoafinitního  $\text{Ca}^{2+}$  kanálu ve snížení oxidativního stresu *in vitro* i v makrofázích. Tento kanál se skládá ze dvou proteinů, Cch1 a Mid1, a jeho roli v odpovědi na oxidativní stres je nutné prozkoumat do detailu. V tuto chvíli bylo pozorováno, že delece pouze Cch1 nebo Mid1 výrazně zhoršuje toleranci oxidativního stresu, zatímco delece obou zároveň má efekt velmi malý (Vu, Bautos et al. 2015).

Nejnovější práce se zaměřila na regulační úlohu dvou komponent kinasového modulu mediátorového komplexu – Cdk8 a Ssn801. Jejich delece negativně ovlivnila mitochondrie, dále zhoršila resistenci k oxidativnímu stresu, schopnost proliferace v makrofázích a virulenci (Chang, Kang et al. 2019).

Resistence k oxidativnímu stresu je dále vyšší u titánských buněk (viz kapitola 3.7) a stárnoucích buněk (Bouklas, Pechuan et al. 2013).

### 3.5 Povrchové proteiny

Přežití uvnitř makrofágů a migrace přes HEB jsou velmi důležitými aspekty patogeneze *C. neoformans*. Různé povrchové proteiny v těchto případech hrají důležitou roli.

Jakým způsobem *C. neoformans* překonává HEB zatím není dopodrobna známo. Několik studií o migraci *C. neoformans* přes HEB bariéru poukazuje na transcelulární migraci (Vu, Tham et al. 2014), dále na migraci paracelulární (Xu, Zhu et al. 2014) a existují i studie popisující migraci mechanismem Trojského koně (Charlier, Nielsen et al. 2009, Santiago-Tirado, Onken et al. 2017).

U několika různých povrchových proteinů bylo pozorováno, že hrají důležitou roli v patogenezi *C. neoformans*. Jsou jimi fosfolipasa B (Cox, McDade et al. 2001), ureasa (Cox, Mukherjee et al. 2000), lakasa (viz kapitola 3.1 a (Qiu, Davis et al. 2012)) a proteasy (viz níže).

Analýza povrchových proteinů *C. neoformans* (Eigenheer, Lee et al. 2007) ukázala na přítomnost několika proteas na povrchu buňky. Kromě serinových a aspartátových proteas se mezi nimi nacházela i v té době blíže nespecifikovaná metaloproteasa CNBJ1810, dříve identifikovaná jako upregulovaná během infekce mozku (Steen, Zuyderduyn et al. 2003).

Další výzkum této proteasy (Vu, Tham et al. 2014), nyní nazvané Mpr1, odhalil, že je nezbytná pro transcelulární migraci přes HEB. Exprese *MPR1* v *S. cerevisiae* byla dostatečná pro migraci kvasinky přes HEB, je tedy otázka, jakým mechanismem migraci umožňuje. Dále je zdůrazněna role Mpr1 v adhezi na epitel a byla pozorována změna morfologie epitelových buněk (lamelipodia a „ruffles“) jako výsledek dynamiky cytoskeletu (Vu, Tham et al. 2014).

Následující výzkum této proteasy se zaměřil na identifikaci hostitelských proteinů, které by mohly s Mpr1 interagovat. To by vedlo k předpokládaným přestavbám cytoskeletu, endocytóze a tedy transcelulární migraci (Na Pombejra, Salemi et al. 2017). Analýzou povrchových proteinů epitelových buněk bylo zjištěno, že jsou to proteiny důležité pro reorganizaci cytoskeletu a pro změnu tvaru membrány během endocytózy. Mezi těmito proteiny se autoři zaměřili na anexin A2 (AnxA2), jenž je nezbytný pro přestavbu cytoskeletu a fúzi membrán při exocytóze. Byla navržena možnost, že anexin A2 hraje roli v pohybu kvasinky v cytosolu a následné exocytóze. To by mohlo znamenat, že *C. neoformans* skutečně využívá Mpr1 k transcelulární migraci přes HEB díky dosud dopodrobna nevysvětlené interakci s AnxA2.

V paracelulární migraci pak byla pozorována serinová proteasa (Xu, Zhu et al. 2014). Kvasinka v tomto modelu využívá serinovou proteasu ke zvýšení permeability HEB, detailní mechanismus je ale zatím neznámý.

Uvnitř makrofágů jsou povrchové proteiny *C. neoformans* důležité pro získávání některých živin, upravování pH fagosomu a pro únik z makrofágů.

Ureasa je enzym katalyzující hydrolyzu močoviny na oxid uhličitý a amoniak a je virulenčním faktorem v patogenezi *C. neoformans*. Ureasa může sloužit k získávání dusíku uvnitř fagosomu a zároveň zde využívat uvolněný amoniak na pufování pH. Bylo pozorováno, že *C. neoformans* velmi dobře roste (má optimum růstu) při pH 4-6. Činnost ureasy pak dokáže zvýšit pH fagosomu přibližně o 0,4 (Fu, Coelho et al. 2018). Napomáhá tedy k vytvoření optimálního prostředí uvnitř kyselého a na živiny chudého fagosomu. Ureasa také hraje roli při migraci přes HEB (Olszewski, Noverr et al. 2004, Shi, Li et al. 2010). Migrace by v tomto případě mohla být umožněna permeabilizací kapiláry díky produkci amoniaku, který je pro endotelové buňky kapilár toxický. Jde tedy o model paracelulární migrace.

Fosfolipasa B (PLB) je dalším povrchovým proteinem a virulenčním faktorem důležitým v interakci s makrofágy. Hraje roli při usazení a přežití v plicích, šíření mimo plíce (Santangelo, Zoellner et al. 2004) i v transcelulární migraci přes HEB (Maruvada, Zhu et al. 2012). Šíření mimo plíce a migrace přes HEB jsou z části zprostředkovány makrofágy, role PLB v tomto jevu by tedy mohla spočívat ve zlepšení přežití a replikace uvnitř makrofágů (Evans, Li et al. 2015). Ve stejné studii byla naznačena možnost, že by PLB mohla hrát roli i ve formaci titánských buněk, jelikož bylo pozorováno zvětšení buněk a zvýšení ploidie u *Plb1Δ* mutantů uvnitř makrofágů.

PLB je důležitá také pro vomocytózu (Chayakulkeeree, Johnston et al. 2011). Jiná studie pak ukazuje roli PLB v permeabilizaci membrány fagosomu a úlohu této permeabilizace v podpoření lytické exocytózy (De Leon-Rodriguez, Rossi et al. 2018).

U lakasy bylo pozorováno, že hraje důležitou roli v šíření kvasinky po těle a invazi do CNS (Qiu, Davis et al. 2012, Sabiiti, Robertson et al. 2014), pravděpodobně z důvodu zvýšení resistance uvnitř makrofágů.

### 3.6 Fenotypové přepínání

Fenotypové přepínání je proces, kdy 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. Selektční tlak pak může vést k převládnutí subpopulace s přepnutým fenotypem.

V případě kvasinek bylo poprvé objeveno u *Candida albicans*. U této kvasinky jde o dobře poznaný 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).

U *C. neoformans* bylo fenotypové přepínání popsáno poprvé u několika kmenů – SB4 a J32 (sérotyp A) a 24067 (sérotyp D) (Goldman, Fries et al. 1998). Podle těchto autorů dochází během fenotypového přepínání ke změnám ve virulenci. Dále byly odhaleny změny v morfologii, ve struktuře kapsulárního polysacharidu a velikosti kapsule a virulenci při přepínání mezi hladkou (smooth, SM) morfologií kolonie, zvrásněnou (wrinkled, WR) morfologií kolonie a koloniemi s pseudohyfálními buňkami (pseudohyphal, PH) (Fries, Goldman et al. 1999). Změny ve virulenci byly pozorované i u varianty kmene 24067 (RC-2), která přepíná mezi hladkou a mukoidní (mucoid, MC) morfologií kolonie (Fries, Taborda et al. 2001). Buňky mukoidních kolonií jsou typické výrazně zvětšenou kapsulí. Další změny zahrnují expresi různých povrchových molekul včetně imunogenních epitopů nebo rozdílnou acetylaci GXM. Dochází ke změně v zastoupení jednotlivých SRG (Fries, Goldman et al. 1999).

Fenotypové přepínání bylo pozorováno i u *C. gattii* (například přepínání z mukoidních kolonií na hladké u kmene NP1) (Jain, Li et al. 2006).

Adheze na epitel a následná tvorba biofilmu jsou dalšími faktory hrajícími roli v patogenezi *C. neoformans* (toto téma shrnuje například práce od Aslanyan, Sanchez et al. (2017)). Adheze na epitel je prvním krokem v procesu tvorby biofilmu a při migraci přes HEB. Buňky rostoucí v biofilmu mají změněnou frekvenci fenotypového přepínání a jednotlivé fenotypy mohou mít různou schopnost adheze na povrch (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.

Frekvence přepínání zpět na mateřský fenotyp (hladký, SM) pak byla pozorovaná vyšší u planktonních buněk (Martinez, Ibom et al. 2008).

Frekvence fenotypového přepínání se také zvyšuje s chronologickým stárnutím buňky (pokusy byly prováděny *in vitro*), avšak z dosud neznámých příčin (Jain, Cook et al. 2009). Jako jeden z možných mechanismů zvýšení frekvence fenotypového přepínání autoři uvádějí nižší stabilitu genomu a častější případy rekombinace u starých buněk.

### **3.6.1 Mukoidní fenotyp**

Mukoidní kolonie byly poprvé popsány u kmene 24067 varianty RC-2, u které dochází k přepínání mezi mateřským SM a odvozeným MC fenotypem (Fries, Taborda et al. 2001). Kolonie založené buňkami MC fenotypu mají vnitřní architekturu velmi podobnou jako kolonie mateřské, liší se však nadprodukcí kapsulárních polysacharidů (Fries, Taborda et al. 2001). Kapsule je z toho důvodu výrazně zvětšená, kapsulární polysacharidy jsou kratší, méně větvené, ve větší míře se z kapsule uvolňují a jsou viskóznější. Z klinického hlediska jde o významný fenotyp, buňky mukoidních kolonií jsou totiž výrazně virulentnější.

Bylo pozorováno, že manipulací s genem nazvaným *ALLI* lze navodit buňky připomínající buňky mukoidních kolonií (Jain, Li et al. 2009). Gen *ALLI* by tedy mohl hrát roli ve fenotypovém přepínání. Dalším zkoumáním účinků tohoto genu bylo zjištěno, že ovlivňuje expresi genů pro proteiny účastnící se homeostáze železa a geny pro proteiny transportující sacharidy (Jain, Cordero et al. 2013). Kapsulární polysacharidy u buněk s nefunkčním *ALLI* měly pozměněnou strukturu, byly kratší a méně větvené a docházelo k jejich odvrhování (Jain, Cordero et al. 2013). Nadprodukce a odvrhování viskózních polysacharidů je dáváno do souvislosti se zvýšeným nitrolebečním tlakem pacientů (Fernandes, Brockway et al. 2018).

### 3.7 Titánské buňky

Titánské buňky byly poprvé pozorovány v izolátu buněk *C. neoformans* z léze z plic nemocné dívky v roce 1973 (Cruickshank, Cavill et al. 1973). Dlouho o jejich výzkum nebyl příliš velký zájem a do centra pozornosti se dostaly teprve nedávno (Okagaki, Strain et al. 2010, Zaragoza, García-Rodas et al. 2010). Dnes jsou známé jako buněčný typ významný při chronické infekci, přispívající k odolnosti *C. neoformans* proti léčivům a k šíření po těle.

Izolované buňky se různily ve velikosti, přičemž většina jich měřila 40 až 50  $\mu\text{m}$  v průměru. Tyto obří buňky měly nadto ještě zvětšenou kapsuli a BS. Po vysetí na médium a inkubaci při zvýšené teplotě měly buňky nových kolonií normální kapsuli, BS i velikost. O pár let později byly obdobně velké buňky kvasinky *C. neoformans* pozorovány v izolátu z mozku (Love, Boyd et al. 1985). Některé dosahovaly velikosti až 60  $\mu\text{m}$  v průměru. Bylo zjištěno, že v laboratorních podmínkách lze indukovat zvětšení buněk kultivací na BHI (Brain Heart Infusion broth) při zvýšené teplotě, ale ne každý kmen byl toho schopen (Love, Boyd et al. 1985).

Pozdější výzkum těchto buněk ukázal, že bez kapsule mohou dosahovat až 100  $\mu\text{m}$  v průměru, jsou jednojaderné, polyploidní, množí se pučením a jsou odolné vůči fagocytóze a oxidativnímu a nitrosativnímu stresu (Okagaki, Strain et al. 2010). Buněčná stěna může dosahovat až třicetinásobku své obvyklé tloušťky a kapsule je kompaktnější (Zaragoza, García-Rodas et al. 2010). Buněčná stěna titánských buněk obsahuje více chitinu a je výrazněji melanizovaná (Hommel, Mukaremera et al. 2018).

Také bylo pozorováno, že pokud jsou v hostiteli přítomny oba párovací typy, dochází u typu **a** ke zvýšení podílu titánských buněk. Tento efekt byl ve stejné práci přisouzen signalizaci přes Ste3a feromonový receptor (Okagaki, Strain et al. 2010). Podíl titánských buněk se mění také s hustotou buněk v plicích (Hommel, Mukaremera et al. 2018), s koncentrací živin a s teplotou (Okagaki, Strain et al. 2010). Titanizace (přeměna normálních kvasinkových buněk na titánské) byla dále pozorována jako odpověď na prostředí savčích plic, při kultivaci s makrofágy a také jako odpověď na purifikovaný fosfatidylcholin (Okagaki, Strain et al. 2010, Zaragoza, García-Rodas et al. 2010, Chrisman, Albuquerque et al. 2011).

Signalizace v závislosti na koncentraci živin se u *C. neoformans* děje přes cAMP/PKA signalizační dráhu (Xue, Bahn et al. 2006). cAMPK/PKA signalizace je skutečně nezbytná pro titanizaci (Zaragoza, García-Rodas et al. 2010) a děje se tak aktivací transkripčního faktoru Rim101 (Okagaki, Wang et al. 2011). Vliv cAMPK/PKA signalizace na titanizaci byl později několikrát znovu potvrzen (Dambuza, Drake et al. 2018, Hommel, Mukaremera et al. 2018).

Proces vnímání hustoty populace (quorum sensing) je u *C. neoformans* zajišťován molekulami pantotenové kyseliny (PA) (Albuquerque, Nicola et al. 2014) nebo proteinem Qsp1 (Homer, Summers et al. 2016). Několikrát bylo pozorováno, že PA podíl titánských buněk v populaci ovlivňuje mírně pozitivně, zatímco Qsp1 negativně ovlivňuje jak velikost, tak podíl v populaci (Hommel, Mukaremera et al. 2018, Trevijano-Contador, de Oliveira et al. 2018).

Bylo pozorováno, že také PKC signalizace má na titanizaci pozitivní vliv (Trevijano-Contador, de Oliveira et al. 2018). Podle pozorovaného vlivu séra a lipidů na titanizaci (Chrisman, Albuquerque et al. 2011) pak autoři spekulují o vlivu fosfolipasy C (PLC) produkující diacylglycerol, který aktivuje PKC.

Ve dvou různých pracích byl pozorovaný negativní vliv pleiotropního transkripčního faktoru Usv101 na titanizaci (Dambuza, Drake et al. 2018, Hommel, Mukaremera et al. 2018). Usv101 hraje roli ve virulenci, ovlivňuje velikost kapsule, odvrhování kapsulárních polysacharidů a melanizaci (Gish, Maier et al. 2016). Dále řídí expresi několika dalších TF včetně Rim101 nebo Crz1 (Sp1) (Gish, Maier et al. 2016). Delece genu *USV101* vyústí ve sníženou virulenci a tvorbu výrazně vyššího podílu titánských buněk (Dambuza, Drake et al. 2018). Také je možné, že transkripce Usv101 je ovlivňována buněčným cyklem (Kelliher, Leman et al. 2016), konkrétně regulátorem buněčného cyklu Swi6 (Gish, Maier et al. 2016).

## 4 ZÁVĚR

Kvasinka *Cryptococcus neoformans* je příležitostným patogenem, který disponuje faktory typickými pro patogenní kvasinky, jako je například schopnost růstu při zvýšené teplotě nebo výskyt řady povrchových proteinů. Má k dispozici také faktory mezi kvasinkami neobvyklé nebo unikátní. Jedná se například o schopnost titanizace nebo tvorbu polysacharidové kapsule. Tato kvasinka je tedy velmi dobře vybavena ke dlouhodobému přežívání uvnitř hostitele, kdy vytváří chronickou či latentní infekci s buňkami nejčastěji lokalizovanými v plicích nebo uvnitř makrofágů, i k akutnímu šíření po těle do CNS, které často vyústí ve smrt hostitele.

Jedinečnost této kvasinky podtrhuje i současná podoba a předpokládaná historie jejího rozmnožovacího systému (Lengeler, Fox et al. 2002). Z původně tetrapolárního systému s více párovacími typy se stal systém bipolární s dvěma párovacími typy (**a**/**α**) (Hsueh, Fraser et al. 2008). V současné podobě má MAT lokus délku přes 100 kbp a obsahuje mnoho genů (ve srovnání s MAT lokusy klasických bipolárních kvasinek, které mají délku jen několik tisíc párů bází) (Lengeler, Fox et al. 2002).

Rozmnožovací systém, respektive geny MAT lokusu, mají svou roli ve virulenci. Zaprvé, díky unisexuálnímu a haploidnímu rozmnožování obecně existuje mnohem více buněk *C. neoformans* **α** párovacího typu, o kterém se spekuluje, že je obecně virulentnější, než **a** typ. Zadruhé, MAT lokus *C. neoformans* obsahuje řadu genů důležitých ve virulenci (viz kapitola 2).

Výsledky zkoumání vyšší virulence u **α** typu však nejsou jednoznačně v souladu se spekulacemi. Byla-li v některých případech pozorována vyšší virulence pro **α** párovací typ, zdá se, že jde pouze o speciální případy a obecně je virulence geneticky shodných **a** a **α** párovacích typů podobná (viz kapitola 3.3). Varianta feromonového receptoru **Ste3a** má dokonce pozitivní vliv na indukcii titánských buněk (viz kapitola 3.7).

Pro latentní infekci, šíření po těle a částečně pro migraci přes HEB se musí část populace nacházet ve fagosomech buněk imunitního systému hostitele (Feldmesser, Kress et al. 2000). Ve fagosomech se kvasinka musí vyrovnat s nedostatkem živin, oxidativním stresem a sníženým pH. Adaptace na prostředí fagosomu tak zahrnuje přechod z glykolýzy na glukoneogenezi a katabolismus mastných kyselin. Zvyšuje se míra autofágie a dochází k indukci genů pro peroxisomální enzymy (Fan, Kraus et al. 2005, Derengowski, Paes et al. 2013).



Dále byla pozorována represe u genů pro proteiny účastnící se translace (Fan, Kraus et al. 2005). Na základě dat získaných o indukovaných genech autoři soudí, že adaptace na prostředí fagosomu je řízená cAMP/PKA signalizací (Fan, Kraus et al. 2005). Nízké pH fagosomu může kvasinka upravit pomocí enzymu ureasy (viz kapitola 3.5), přežití ve fagosomu napomáhá také kapsule a melanizovaná buněčná stěna (Zaragoza, Chrisman et al. 2008, De Leon-Rodriguez, Fu et al. 2018). Aktivita fosfolipasy B napomáhá replikaci uvnitř fagosomu a hraje roli v úniku z fagosomu buď procesem lytické exocytózy nebo vomocytózy (viz. kapitola 3.5).

*C. neoformans* má také schopnost uvnitř makrofágů migrovat přes HEB do mozku (Trojský kůň, viz kapitola 3.5). Mimo to byly pozorovány i dva další možné mechanismy migrace, transcelulární a paracelulární. Zdá se, že by se migrace přes HEB mohla dít skutečně všemi třemi mechanismy. Každý z nich by mohl být výhodný za jiných podmínek a možnost využívat všechny najednou by tedy mohla zvyšovat virulenci.

V interakcích s makrofágy, které jsou důležité při šíření i migraci přes HEB, hraje důležitou roli kapsule. Nelze říci, že je pro vyšší virulenci obecně výhodná větší či menší kapsule. Velká kapsule by mohla být výhodná pro latentní chronickou infekci díky jejím imunomodulačním účinkům, schopnosti pufrovat pH fagosomu nebo inhibici fagocytózy (viz kapitola 3.3). Tyto faktory by ve výsledku vedly k pozorování nižší virulence, a tedy k nižší úmrtnosti, zatímco kvasinka persistuje v hostiteli. Velká kapsule je pozorovaná při kolonizaci plic (Feldmesser, Kress et al. 2001) a v makrofázích (De Leon-Rodriguez, Rossi et al. 2018).

Menší kapsule se pak zdá být výhodná při invazi do mozku díky zvýšené míře fagocytózy (a tedy šíření po těle díky makrofágům) a možná kvůli nezbytnosti povrchových proteinů pro migraci přes HEB, které by příliš velká kapsule mohla krýt. Důležitá je tedy regulace velikosti kapsule během infekce. Tomu napovídá i případ ve zkoumání vlivu velikosti kapsule na virulenci (Pool, Lowder et al. 2013), ve kterém měl, ve srovnání s rodičovským kmenem, hyper- i hypokapsulární mutant nižší virulenci. Mutanti byli vytvořeni poškozením genů *CAP59* (hypokapsulární) a *PKRI* (hyperkapsulární), které jsou důležité v regulaci velikosti kapsule během infekce (D'Souza, Alspaugh et al. 2001, Grijpstra, Gerwig et al. 2009).

Zdánlivé rozpory pak lze nalézt i ve výhodnosti jednotlivých funkcí kapsule. Například velikost kapsule má vliv na míru inhibice fagocytózy (Kozel and Gotschlich 1982), kterou využívají makrofágy ke zneškodnění kvasinky. Na obranu proti makrofágům je tedy lepší kapsule větší. Na druhou stranu, šíření mechanismem Trojského koně po těle i do CNS se zdá být pro patogenezí významné a vyžaduje fagocytózu (Charlier, Nielsen et al. 2009), v tomto pohledu by tedy nejspíš byla výhodnější kapsule menší. Heterogenita ve velikosti kapsule by tedy také měla hrát důležitou roli ve virulenci.

Pro patogenezí *C. neoformans* se tedy zdá být zásadní regulace velikosti kapsule v jednotlivých fázích infekce a heterogenita ve velikosti a složení kapsule v populaci (část populace s průměrně větší kapsulí bude lépe unikat obranným mechanismům hostitele a část s kapsulí průměrně menší se bude více šířit do CNS). Heterogenitu v kapsuli zvyšuje fenotypové přepínání a stárnutí buněk.

Stárnoucí buňky jsou dalším širokým tématem v patogenezí *C. neoformans* (viz například práce od Bouklas and Fries (2015)) a zvyšují heterogenitu v populaci. Vlastnosti pozorované u stárnoucích buněk, jako zvětšení buňky, změny struktury i velikosti kapsule a pozorovaná zvýšená resistence, spolu s potenciální akumulací během infekce a zvýšenou frekvencí fenotypového přepínání, ukazují, že hrají důležitou roli v chronické infekci (Jain, Cook et al. 2009, Cordero, Pontes et al. 2011, Bouklas, Pechuan et al. 2013). Staré buňky by tedy mohly při infekci tvořit resistantní latentní rezervoár buněk se zvýšenou frekvencí fenotypového přepínání. To by pak mohlo v příhodných podmínkách vyústit v náhlé zvýšení virulence přepnutím na virulentnější fenotyp následované šířením po těle.

Fenotypové přepínání a titanizace během infekce nabízí další možnost zvýšení heterogenity populace.

U buněk mukoidních kolonií dochází k indukci exprese genů pro proteiny účastnící se homeostáze železa a geny pro proteiny transportující sacharidy (Jain, Cordero et al. 2013). Spolu se zvětšením kapsule to ukazuje na komplexnější adaptaci na prostředí hostitele, kde se kvasinka setkává s nízkou koncentrací železa a živin a je napadána imunitním systémem. Změny ve struktuře kapsule během fenotypového přepínání by pak mohly pomáhat úniku před rozpoznáním imunitním systémem hostitele.

Titánské buňky jsou neobvykle velké polyploidní buňky se zvýšenou resistencí vůči stresu, které se objevují zejména, ale ne pouze, v plicích brzy po kolonizaci (Feldmesser, Kress et al. 2001) a převážně z buněk přítomných v původním inokulu (Hommel, Mukaremera et al. 2018). Slouží k persistenci v tkáních, kde díky produkci normálně velikých haploidních, diploidních nebo aneuploidních dceřiných buněk vybavených zvýšenou resistencí vůči stresu (Gerstein, Fu et al. 2015) napomáhají šíření kvasinkových buněk po těle.

Titanizace je stimulována různými faktory typickými pro prostředí hostitele. Dosud byly identifikovány dva transkripční faktory (Rim101 a Usv101) a dvě signalizační dráhy (cAMP/PKA a PKC), které dramaticky ovlivňují titanizaci. Dále titanizaci ovlivňují signalizace přes feromonový receptor u **a** párovacího typu (Ste3**a**), signalizace hustoty populace (PA a Qsp1) a možná některé regulátory buněčného cyklu (Swi6) (viz kapitola 3.7). Spekuluje se, že titánské buňky vznikají procesem endoreplikace (Okagaki, Strain et al. 2010, Zaragoza, García-Rodas et al. 2010). Titanizace tedy není jen pouhou odpovědí na signály prostředí, ale je také výsledkem mezibuněčné komunikace.

Kvasinka *C. neoformans* disponuje klasickými faktory virulence, jako jsou schopnost růstu při zvýšené teplotě, povrchové proteiny a enzymy chránící před buněčnou imunitou, které jí umožňují být patogenem. Aktivní regulace faktorů virulence a heterogenita populace uvnitř hostitele jsou zásadními mechanismy patogeneze této kvasinky.

Klasické virulenční faktory jsou v současné době poměrně dobře prozkoumané. Remodelace BS při zvýšené teplotě až na malé rozdíly odpovídá modelu u *S. cerevisiae* a zbývá identifikovat jednotlivé komponenty signálních drah. Termotoleranci u *C. neoformans* řídí dráhy PKC/MAPK (Kraus, Fox et al. 2003), signalizace pomocí kalcineurinu (Lev, Desmarini et al. 2012) a objevuje se zde otázka regulační role protein kinasy Sch9 v termotoleranci a odpověď na oxidativní stres (Yang, Jung et al. 2017).

Povrchové proteiny *C. neoformans* jsou známé, včetně jejich role ve virulenci, pouze u některých z nich (např. Mpr1 nebo Plb1) je třeba detailně popsat jejich funkci. Výzkum Mpr1 je v tomto ohledu nejdále (Na Pombejra, Jamklang et al. 2018).

Je známo, které enzymy kvasinka využívá pro boj s ROS a RNS využívané buňkami imunitního systému k boji s patogeny (viz kapitola 3.4), ale regulace zatím popsána není, pouze bylo pozorováno několik proteinů, např. Cdk8 a Ssn801 (Chang, Kang et al. 2019), které by se jí mohly účastnit.

Z hlediska kapsule je velmi dopodrobna popsáno její složení a fyzikální vlastnosti a množství dílčích rolí, které kapsule hraje v patogenezí. Ve velké míře je prozkoumána i syntéza kapsule, která byla shrnutá v nedávném review (Wang, Li et al. 2018). Je však třeba vytvořit jasný model regulace kapsule během infekce. Změny v kapsuli nastávají také během fenotypového přepínání a titanizace. Jednotlivé fenotypy, mezi nimiž k přepínání dochází, jsou dobře prozkoumané z hlediska své virulence a byla zjišťována i exprese genů u buněk mukoidních kolonií. Mechanismy fenotypového přepínání a jeho role v patogenezí jsou však prakticky neznámé.

Titánské buňky jsou velmi dobře prozkoumané z hlediska indukujících signálů, o něco méně pak z hlediska uceleného modelu signalizace. Titánské buňky se v současnosti zdají být v centru pozornosti při zkoumání patogeneze kvasinky *Cryptococcus neoformans* a detailní popis signálních drah řídících titanizaci nabízí široké pole pro budoucí výzkum.

## 5 ZDROJE

- Adler, A., Y.-D. Park, P. Larsen, V. Nagarajan, K. Wollenberg, J. Qiu, T. G. Myers and P. R. Williamson (2011). "A Novel Specificity Protein 1 (SP1)-like Gene Regulating Protein Kinase C-1 (Pkc1)-dependent Cell Wall Integrity and Virulence Factors in *Cryptococcus neoformans*." Journal of Biological Chemistry **286**(23): 20977-20990.
- Akhter, S., H. C. McDade, J. M. Gorlach, G. Heinrich, G. M. Cox and J. R. Perfect (2003). "Role of Alternative Oxidase Gene in Pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*." Infection and Immunity **71**(10): 5794.
- Alanio, A., F. Vernel-Pauillac, A. Sturny-Leclère and F. Dromer (2015). "*Cryptococcus neoformans* Host Adaptation: Toward Biological Evidence of Dormancy." mBio **6**(2): e02580-02514.
- Albuquerque, P., A. M. Nicola, E. Nieves, H. C. Paes, P. R. Williamson, I. Silva-Pereira and A. Casadevall (2014). "Quorum Sensing-Mediated, Cell Density-Dependent Regulation of Growth and Virulence in *Cryptococcus neoformans*." mBio **5**(1): e00986-00913.
- Alspaugh, J. A., L. M. Cavallo, J. R. Perfect and J. Heitman (2000). "RAS1 regulates filamentation, mating and growth at high temperature of *Cryptococcus neoformans*." Molecular Microbiology **36**(2): 352-365.
- Alvarez, M. and A. Casadevall (2006). "Phagosome Extrusion and Host-Cell Survival after *Cryptococcus neoformans* Phagocytosis by Macrophages." Current Biology **16**(21): 2161-2165.
- Aslanyan, L., D. A. Sanchez, S. Valdebenito, E. A. Eugenin, R. L. Ramos and L. R. Martinez (2017). "The Crucial Role of Biofilms in *Cryptococcus neoformans* Survival within Macrophages and Colonization of the Central Nervous System." Journal of fungi (Basel, Switzerland) **3**(1): 10.\*
- Bahn, Y.-S., K. Kojima, G. M. Cox and J. Heitman (2005). "Specialization of the HOG Pathway and Its Impact on Differentiation and Virulence of *Cryptococcus neoformans*." Molecular Biology of the Cell **16**(5): 2285-2300.
- Baker, L. G., C. A. Specht, M. J. Donlin and J. K. Lodge (2007). "Chitosan, the deacetylated form of chitin, is necessary for cell wall integrity in *Cryptococcus neoformans*." Eukaryotic cell **6**(5): 855-867.
- Baker, L. G., C. A. Specht and J. K. Lodge (2011). "Cell wall chitosan is necessary for virulence in the opportunistic pathogen *Cryptococcus neoformans*." Eukaryotic cell **10**(9): 1264-1268.
- Baker, R. D. (1976). "The Primary Pulmonary Lymph Node Complex of Cryptococcosis." American Journal of Clinical Pathology **65**(1): 83-92.
- Banks, I. R., C. A. Specht, M. J. Donlin, K. J. Gerik, S. M. Levitz and J. K. Lodge (2005). "A chitin synthase and its regulator protein are critical for chitosan production and growth of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*." Eukaryotic cell **4**(11): 1902-1912.
- Bojarczuk, A., K. A. Miller, R. Hotham, A. Lewis, N. V. Ogryzko, A. A. Kamuyango, H. Frost, R. H. Gibson, E. Stillman, R. C. May, S. A. Renshaw and S. A. Johnston (2016). "*Cryptococcus neoformans* Intracellular Proliferation and Capsule Size Determines Early Macrophage Control of Infection." Scientific reports **6**: 21489-21489.
- 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.

---

\* Jedná se o review

- 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: an emergent phenotypic trait that contributes to the virulence of *Cryptococcus neoformans*." *Future Microbiology* **10**(2): 191-197.\*
- Bouklas, T., X. Pechuan, D. L. Goldman, B. Edelman, A. Bergman and B. C. Fries (2013). "Old *Cryptococcus neoformans* Cells Contribute to Virulence in Chronic Cryptococcosis." *mBio* **4**(4): e00455-00413.
- Busse, O. (1894). "Über parasitäre Zelleinschlüsse und ihre Züchtung." *Zentralblatt Bakteriologie* **16**: 175-180.
- Casadevall, A., C. Coelho, R. J. B. Cordero, Q. Dragotakes, E. Jung, R. Vij and M. P. Wear (2018). "The capsule of *Cryptococcus neoformans*." *Virulence*: 1-10.\*
- Cordero, R. J. B., B. Pontes, A. J. Guimarães, L. R. Martinez, J. Rivera, B. C. Fries, L. Nimrichter, M. L. Rodrigues, N. B. Viana and A. Casadevall (2011). "Chronological Aging Is Associated with Biophysical and Chemical Changes in the Capsule of *Cryptococcus neoformans*." *Infection and Immunity* **79**(12): 4990-5000.
- Cox, G. M., T. S. Harrison, H. C. McDade, C. P. Taborda, G. Heinrich, A. Casadevall and J. R. Perfect (2003). "Superoxide dismutase influences the virulence of *Cryptococcus neoformans* by affecting growth within macrophages." *Infection and immunity* **71**(1): 173-180.
- Cox, G. M., H. C. McDade, S. C. A. Chen, S. C. Tucker, M. Gottfredsson, L. C. Wright, T. C. Sorrell, S. D. Leidich, A. Casadevall, M. A. Ghannoum and J. R. Perfect (2001). "Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*." *Molecular Microbiology* **39**(1): 166-175.
- Cox, G. M., J. Mukherjee, G. T. Cole, A. Casadevall and J. R. Perfect (2000). "Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis." *Infection and immunity* **68**(2): 443-448.
- 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.
- D'Souza, C. A., J. A. Alspaugh, C. Yue, T. Harashima, G. M. Cox, J. R. Perfect and J. Heitman (2001). "Cyclic AMP-dependent protein kinase controls virulence of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*." *Molecular and cellular biology* **21**(9): 3179-3191.
- 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. Yuecel, 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.
- Davidson, R. C., C. B. Nichols, G. M. Cox, J. R. Perfect and J. Heitman (2003). "A MAP kinase cascade composed of cell type specific and non-specific elements controls mating and differentiation of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*." *Molecular Microbiology* **49**(2): 469-485.

---

\* Jedná se o review

- de Jesús-Berrios, M., L. Liu, J. C. Nussbaum, G. M. Cox, J. S. Stamler and J. Heitman (2003). "Enzymes that Counteract Nitrosative Stress Promote Fungal Virulence." Current Biology **13**(22): 1963-1968.
- De Leon-Rodriguez, C. M., M. S. Fu, M. O. Çorbali, R. J. B. Cordero and A. Casadevall (2018). "The Capsule of *Cryptococcus neoformans* Modulates Phagosomal pH through Its Acid-Base Properties." mSphere **3**(5): e00437-00418.
- De Leon-Rodriguez, C. M., D. C. P. Rossi, M. S. Fu, Q. Dragotakes, C. Coelho, I. Guerrero Ros, B. Caballero, S. J. Nolan and A. Casadevall (2018). "The Outcome of the *Cryptococcus neoformans*-Macrophage Interaction Depends on Phagolysosomal Membrane Integrity." Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) **201**(2): 583-603.
- Derengowski, L. d. S., H. C. Paes, P. Albuquerque, A. H. F. P. Tavares, L. Fernandes, I. Silva-Pereira and A. Casadevall (2013). "The transcriptional response of *Cryptococcus neoformans* to ingestion by *Acanthamoeba castellanii* and macrophages provides insights into the evolutionary adaptation to the mammalian host." Eukaryotic cell **12**(5): 761-774.
- 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. J. Lee, E. Blumwald, B. S. Phinney and A. Gelli (2007). "Extracellular glycosylphosphatidylinositol-anchored mannoproteins and proteases of *Cryptococcus neoformans*." FEMS Yeast Research **7**(4): 499-510.
- Ellerbroek, P. M., D. J. Lefeber, R. van Veghel, J. Scharringa, E. Brouwer, G. J. Gerwig, G. Janbon, A. I. M. Hoepelman and F. E. J. Coenjaerts (2004). "Acetylation of Cryptococcal Capsular Glucuronoxylomannan Is Essential for Interference with Neutrophil Migration." The Journal of Immunology **173**(12): 7513.
- Erickson, T., L. Liu, A. Gueyikian, X. Zhu, J. Gibbons and P. R. Williamson (2001). "Multiple virulence factors of *Cryptococcus neoformans* are dependent on VPH1." Molecular Microbiology **42**(4): 1121-1131.
- Evans, E. E. (1950). "The Antigenic Composition of *Cryptococcus neoformans*. I. A Serologic Classification by means of the Capsular and Agglutination Reactions." Journal of Immunology **64**(5): 423-430.
- Evans, R. J., Z. Li, W. S. Hughes, J. T. Djordjevic, K. Nielsen and R. C. May (2015). "Cryptococcal phospholipase B1 is required for intracellular proliferation and control of titan cell morphology during macrophage infection." Infection and immunity **83**(4): 1296-1304.
- Fan, W., P. R. Kraus, M.-J. Boily and J. Heitman (2005). "*Cryptococcus neoformans* Gene Expression during Murine Macrophage Infection." Eukaryotic Cell **4**(8): 1420.
- Feldmesser, M., Y. Kress and A. Casadevall (2001). "Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonary infection." Microbiology **147**(8): 2355-2365.
- Feldmesser, M., Y. Kress, P. Novikoff and A. Casadevall (2000). "*Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection." Infection and immunity **68**(7): 4225-4237.
- Fernandes, K. E., A. Brockway, M. Haverkamp, C. A. Cuomo, F. van Ogtrop, J. R. Perfect and D. A. Carter (2018). "Phenotypic Variability Correlates with Clinical Outcome in *Cryptococcus* Isolates Obtained from Botswanan HIV/AIDS Patients." mBio **9**(5): e02016-02018.

---

\* Jedná se o review

- Fox, D. S., G. M. Cox and J. Heitman (2003). "Phospholipid-binding protein Cts1 controls septation and functions coordinately with calcineurin in *Cryptococcus neoformans*." Eukaryotic cell **2**(5): 1025-1035.
- Franzot, S. P., I. F. Salkin and A. Casadevall (1999). "Cryptococcus neoformans var. Separate Varietal Status for *Cryptococcus neoformans* Serotype A Isolates." Journal of Clinical Microbiology **37**(3): 838.
- 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.
- Fries, B. C., C. P. Taborda, E. Serfass and A. Casadevall (2001). "Phenotypic switching of *Cryptococcus neoformans* occurs in vivo and influences the outcome of infection." The Journal of clinical investigation **108**(11): 1639-1648.
- Fu, M. S., C. Coelho, C. M. De Leon-Rodriguez, D. C. P. Rossi, E. Camacho, E. H. Jung, M. Kulkarni and A. Casadevall (2018). "Cryptococcus neoformans urease affects the outcome of intracellular pathogenesis by modulating phagolysosomal pH." PLoS pathogens **14**(6): e1007144-e1007144.
- García-Rodas, R., A. Casadevall, J. L. Rodríguez-Tudela, M. Cuenca-Estrella and O. Zaragoza (2011). "Cryptococcus neoformans capsular enlargement and cellular gigantism during *Galleria mellonella* infection." PloS one **6**(9): e24485-e24485.
- Geddes, J. M. H., M. Caza, D. Croll, N. Stoyanov, 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.
- Gerstein, A. C., M. S. Fu, L. Mukaremera, Z. Li, K. L. Ormerod, J. A. Fraser, J. Berman and K. Nielsen (2015). "Polyploid Titan Cells Produce Haploid and Aneuploid Progeny To Promote Stress Adaptation." mBio **6**(5): e01340-01315.
- Gilbert, N. M., M. J. Donlin, K. J. Gerik, C. A. Specht, J. T. Djordjevic, C. F. Wilson, T. C. Sorrell and J. K. Lodge (2010). "KRE genes are required for beta-1,6-glucan synthesis, maintenance of capsule architecture and cell wall protein anchoring in *Cryptococcus neoformans*." Molecular microbiology **76**(2): 517-534.
- Giles, S. S., I. Batinic-Haberle, J. R. Perfect and G. M. Cox (2005). "Cryptococcus neoformans mitochondrial superoxide dismutase: an essential link between antioxidant function and high-temperature growth." Eukaryotic cell **4**(1): 46-54.
- 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.
- Goldman, D. L., B. C. Fries, S. P. Franzot, L. Montella and A. Casadevall (1998). "Phenotypic switching in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* is associated with changes in virulence and pulmonary inflammatory response in rodents." Proceedings of the National Academy of Sciences **95**(25): 14967.
- Granger, D. L., J. R. Perfect and D. T. Durack (1985). "Virulence of *Cryptococcus neoformans*. Regulation of capsule synthesis by carbon dioxide." The Journal of clinical investigation **76**(2): 508-516.
- Grijpstra, J., G. J. Gerwig, H. Wösten, J. P. Kamerling and H. de Cock (2009). "Production of Extracellular Polysaccharides by CAP Mutants of *Cryptococcus neoformans*." Eukaryotic Cell **8**(8): 1165.



- Heinisch, J. J., A. Lorberg, H.-P. Schmitz and J. J. Jacoby (1999). "The protein kinase C-mediated MAP kinase pathway involved in the maintenance of cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*." Molecular Microbiology **32**(4): 671-680.\*
- Homer, C. M., D. K. Summers, A. I. Goranov, S. C. Clarke, D. L. Wiesner, J. K. Diedrich, J. J. Moresco, D. Toffaletti, R. Upadhy, I. Caradonna, S. Petnic, V. Pessino, C. A. Cuomo, J. K. Lodge, J. Perfect, J. R. Yates, 3rd, K. Nielsen, C. S. Craik and H. D. Madhani (2016). "Intracellular Action of a Secreted Peptide Required for Fungal Virulence." Cell host & microbe **19**(6): 849-864.
- 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.
- Hsueh, Y.-P., J. A. Fraser and J. Heitman (2008). "Transitions in sexuality: recapitulation of an ancestral tri- and tetrapolar mating system in *Cryptococcus neoformans*." Eukaryotic cell **7**(10): 1847-1855.
- Chang, A. L., Y. Kang and T. L. Doering (2019). "Cdk8 and Ssn801 Regulate Oxidative Stress Resistance and Virulence in *Cryptococcus neoformans*." mBio **10**(1): e02818-02818.
- Chang, Y. C., G. F. Miller and K. J. Kwon-Chung (2003). "Importance of a developmentally regulated pheromone receptor of *Cryptococcus neoformans* for virulence." Infection and immunity **71**(9): 4953-4960.
- Chang, Y. C., L. A. Penoyer and K. J. Kwon-Chung (2001). "The second STE12 homologue of *Cryptococcus neoformans* is MATa-specific and plays an important role in virulence." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(6): 3258-3263.
- Chang, Y. C., B. L. Wickes, G. F. Miller, L. A. Penoyer and K. J. Kwon-Chung (2000). "Cryptococcus neoformans STE12alpha regulates virulence but is not essential for mating." The Journal of experimental medicine **191**(5): 871-882.
- Charlier, C., K. Nielsen, S. Daou, M. Brigitte, F. Chretien and F. Dromer (2009). "Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*." Infection and immunity **77**(1): 120-127.
- Chayakulkeeree, M., S. A. Johnston, J. B. Oei, S. Lev, P. R. Williamson, C. F. Wilson, X. Zuo, A. L. Leal, M. H. Vainstein, W. Meyer, T. C. Sorrell, R. C. May and J. T. Djordjevic (2011). "SEC14 is a specific requirement for secretion of phospholipase B1 and pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*." Molecular microbiology **80**(4): 1088-1101.
- Chrisman, C. J., P. Albuquerque, A. J. Guimaraes, E. Nieves and A. Casadevall (2011). "Phospholipids trigger *Cryptococcus neoformans* capsular enlargement during interactions with amoebae and macrophages." PLoS pathogens **7**(5): e1002047-e1002047.
- Jain, N., E. Cook, I. Xess, F. Hasan, D. Fries and B. C. Fries (2009). "Isolation and Characterization of Senescent *Cryptococcus neoformans* and Implications for Phenotypic Switching and Pathogenesis in Chronic Cryptococcosis." Eukaryotic Cell **8**(6): 858-866.
- 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.

---

\* Jedná se o review

- 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 Mucoid Switch Variants of *Cryptococcus neoformans*." *Infection and Immunity* **77**(1): 128-140.
- Jain, N., L. Li, D. C. McFadden, U. Banarjee, X. Wang, E. Cook and B. C. Fries (2006). "Phenotypic switching in a *Cryptococcus neoformans* variety *gattii* strain is associated with changes in virulence and promotes dissemination to the central nervous system." *Infection and immunity* **74**(2): 896-903.
- 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.
- Kido, N., K. Makimura, C. Kamegaya, I. Shindo, E. Shibata, T. Omiya and Y. Yamamoto (2012). "Long-term surveillance and treatment of subclinical cryptococcosis and nasal colonization by *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* species complex in captive koalas (*Phascolarctes cinereus*)." *Medical Mycology* **50**(3): 291-298.
- Klis, F. M., P. Mol, K. Hellingwerf and S. Brul (2002). "Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*." *FEMS Microbiology Reviews* **26**(3): 239-256.\*
- Kozel, T. R. and E. C. Gotschlich (1982). "The capsule of *cryptococcus neoformans* passively inhibits phagocytosis of the yeast by macrophages." *The Journal of Immunology* **129**(4): 1675.
- Kraus, P. R., M.-J. Boily, S. S. Giles, J. E. Stajich, A. Allen, G. M. Cox, F. S. Dietrich, J. R. Perfect and J. Heitman (2004). "Identification of *Cryptococcus neoformans* temperature-regulated genes with a genomic-DNA microarray." *Eukaryotic cell* **3**(5): 1249-1260.
- 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.
- Kwon-Chung, K. J. (1975). "A New Genus, *Filobasidiella*, The Perfect State of *Cryptococcus Neoformans*." *Mycologia* **67**(6): 1197-1200.
- Kwon-Chung, K. J., J. E. Bennett and J. C. Rhodes (1982). "Taxonomic studies on *Filobasidiella* species and their anamorphs." *Antonie van Leeuwenhoek* **48**(1): 25-38.
- Kwon-Chung, K. J., T. Boekhout, J. W. Fell and M. Diaz (2002). "(1557) Proposal to Conserve the Name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae)." *Taxon* **51**(4): 804-806.
- Kwon-Chung, K. J., J. C. Edman and B. L. Wickes (1992). "Genetic association of mating types and virulence in *Cryptococcus neoformans*." *Infection and immunity* **60**(2): 602-605.
- Lengeler, K. B., D. S. Fox, J. A. Fraser, A. Allen, K. Forrester, F. S. Dietrich and J. Heitman (2002). "Mating-type locus of *Cryptococcus neoformans*: a step in the evolution of sex chromosomes." *Eukaryotic cell* **1**(5): 704-718.
- Lester, S. J., N. J. Kowalewich, K. H. Bartlett, M. B. Krockenberger, T. M. Fairfax and R. Malik (2004). "Clinicopathologic features of an unusual outbreak of cryptococcosis in dogs, cats, ferrets, and a bird: 38 cases (January to July 2003)." *Journal of the American Veterinary Medical Association* **225**(11): 1716-1722.
- Lev, S., D. Desmarini, M. Chayakulkeeree, T. C. Sorrell and J. T. Djordjevic (2012). "The Crz1/Sp1 transcription factor of *Cryptococcus neoformans* is activated by calcineurin and regulates cell wall integrity." *PloS one* **7**(12): e51403-e51403.

---

\* Jedná se o review

- Lin, X., J. C. Huang, T. G. Mitchell and J. Heitman (2006). "Virulence attributes and hyphal growth of *C. neoformans* are quantitative traits and the MAT $\alpha$  allele enhances filamentation." *PLoS genetics* **2**(11): e187-e187.
- Lin, X., C. M. Hull and J. Heitman (2005). "Sexual reproduction between partners of the same mating type in *Cryptococcus neoformans*." *Nature* **434**(7036): 1017-1021.
- Love, G. L., G. D. Boyd and D. L. Greer (1985). "Large *Cryptococcus neoformans* isolated from brain abscess." *Journal of clinical microbiology* **22**(6): 1068-1070.
- Lysnyansky, I., R. Rosengarten and D. Yogev (1996). "Phenotypic switching of variable surface lipoproteins in *Mycoplasma bovis* involves high-frequency chromosomal rearrangements." *Journal of Bacteriology* **178**(18): 5395.
- Ma, H., J. E. Croudace, D. A. Lammas and R. C. May (2006). "Expulsion of Live Pathogenic Yeast by Macrophages." *Current Biology* **16**(21): 2156-2160.
- 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.
- Maziarz, E. K. and J. R. Perfect (2016). "Cryptococcosis." *Infectious disease clinics of North America* **30**(1): 179-206.\*
- 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.
- Missall, T. A. and J. K. Lodge (2005a). "Function of the thioredoxin proteins in *Cryptococcus neoformans* during stress or virulence and regulation by putative transcriptional modulators." *Molecular Microbiology* **57**(3): 847-858.
- Missall, T. A. and J. K. Lodge (2005b). "Thioredoxin reductase is essential for viability in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*." *Eukaryotic cell* **4**(2): 487-489.
- Missall, T. A., M. E. Pusateri and J. K. Lodge (2004). "Thiol peroxidase is critical for virulence and resistance to nitric oxide and peroxide in the fungal pathogen, *Cryptococcus neoformans*." *Molecular Microbiology* **51**(5): 1447-1458.
- Myler, P. J., J. Allison, N. Agabian and K. Stuart (1984). "Antigenic variation in African trypanosomes by gene replacement or activation of alternate telomeres." *Cell* **39**(1): 203-211.
- Na Pombejra, S., M. Jamklang, J. P. Uhrig, K. Vu and A. Gelli (2018). "The structure-function analysis of the Mpr1 metalloprotease determinants of activity during migration of fungal cells across the blood-brain barrier." *PloS one* **13**(8): e0203020-e0203020.
- Na Pombejra, S., M. Salemi, B. S. Phinney and A. Gelli (2017). "The Metalloprotease, Mpr1, Engages AnnexinA2 to Promote the Transcytosis of Fungal Cells across the Blood-Brain Barrier." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **7**(296).
- Nielsen, K., G. M. Cox, A. P. Litvintseva, E. Mylonakis, S. D. Malliaris, D. K. Benjamin, Jr., S. S. Giles, T. G. Mitchell, A. Casadevall, J. R. Perfect and J. Heitman (2005). "Cryptococcus neoformans alpha strains preferentially disseminate to the central nervous system during coinfection." *Infection and immunity* **73**(8): 4922-4933.

---

\* Jedná se o review

- Nielsen, K., G. M. Cox, P. Wang, D. L. Toffaletti, J. R. Perfect and J. Heitman (2003). "Sexual cycle of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and virulence of congenic  $\alpha$  and  $\alpha$  isolates." *Infection and immunity* **71**(9): 4831-4841.
- 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.
- 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. 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.
- Olszewski, M. A., M. C. Noverr, G.-H. Chen, G. B. Toews, G. M. Cox, J. R. Perfect and G. B. Huffnagle (2004). "Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion." *The American journal of pathology* **164**(5): 1761-1771.
- Petzold, E. W., U. Himmelreich, E. Mylonakis, T. Rude, D. Toffaletti, G. M. Cox, J. L. Miller and J. R. Perfect (2006). "Characterization and regulation of the trehalose synthesis pathway and its importance in the pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*." *Infection and Immunity* **74**(10): 5877-5887.
- Pool, A., L. Lowder, Y. Wu, K. Forrester and J. Rumbaugh (2013). "Neurovirulence of *Cryptococcus neoformans* determined by time course of capsule accumulation and total volume of capsule in the brain." *Journal of NeuroVirology* **19**(3): 228-238.
- Previato, J. O., E. Vinogradov, E. Maes, L. M. Fonseca, Y. Guerardel, P. A. V. Oliveira and L. Mendonça-Previato (2017). "Distribution of the O-acetyl groups and  $\beta$ -galactofuranose units in galactoxylomannans of the opportunistic fungus *Cryptococcus neoformans*." *Glycobiology* **27**(6): 582-592.
- 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.
- Qiu, Y., M. J. Davis, J. K. Dayrit, Z. Hadd, D. L. Meister, J. J. Osterholzer, P. R. Williamson and M. A. Olszewski (2012). "Immune modulation mediated by cryptococcal laccase promotes pulmonary growth and brain dissemination of virulent *Cryptococcus neoformans* in mice." *PLoS one* **7**(10): e47853-e47853.
- Reese, A. J. and T. L. Doering (2003). "Cell wall  $\alpha$ -1,3-glucan is required to anchor the *Cryptococcus neoformans* capsule." *Molecular Microbiology* **50**(4): 1401-1409.
- Robertson, E. J., G. Najjuka, M. A. Rolfes, A. Akampurira, N. Jain, J. Anantharanjit, M. von Hohenberg, M. Tassieri, A. Carlsson, D. B. Meya, T. S. Harrison, B. C. Fries, D. R. Boulware and T. Bicanic (2014). "Cryptococcus neoformans ex vivo capsule size is associated with intracranial pressure and host immune response in HIV-associated cryptococcal meningitis." *The Journal of infectious diseases* **209**(1): 74-82.
- Rosas, Á. L. and A. Casadevall (2001). "Melanization decreases the susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to enzymatic degradation." *Mycopathologia* **151**(2): 53-56.
- Sabiiti, W., E. Robertson, M. A. Beale, S. A. Johnston, A. E. Brouwer, A. Loyse, J. N. Jarvis, A. S. Gilbert, M. C. Fisher, T. S. Harrison, R. C. May and T. Bicanic (2014). "Efficient phagocytosis and laccase activity affect the outcome of HIV-associated cryptococcosis." *The Journal of clinical investigation* **124**(5): 2000-2008.

- Santangelo, R., H. Zoellner, T. Sorrell, C. Wilson, C. Donald, J. Djordjevic, Y. Shounan and L. Wright (2004). "Role of extracellular phospholipases and mononuclear phagocytes in dissemination of cryptococcosis in a murine model." Infection and immunity **72**(4): 2229-2239.
- Santiago-Tirado, F. H., M. D. Onken, J. A. Cooper, R. S. Klein and T. L. Doering (2017). "Trojan Horse Transit Contributes to Blood-Brain Barrier Crossing of a Eukaryotic Pathogen." mBio **8**(1): e02183-02116.
- Shao, X., A. Mednick, M. Alvarez, N. van Rooijen, A. Casadevall and D. L. Goldman (2005). "An Innate Immune System Cell Is a Major Determinant of Species-Related Susceptibility Differences to Fungal Pneumonia." The Journal of Immunology **175**(5): 3244.
- Shi, M., S. S. Li, C. Zheng, G. J. Jones, K. S. Kim, H. Zhou, P. Kubes and C. H. Mody (2010). "Real-time imaging of trapping and urease-dependent transmigration of *Cryptococcus neoformans* in mouse brain." The Journal of Clinical Investigation **120**(5): 1683-1693.
- Silverman, M., J. Zieg, M. Hilmen and M. Simon (1979). "Phase variation in *Salmonella*: genetic analysis of a recombinational switch." Proceedings of the National Academy of Sciences **76**(1): 391.
- Steen, B. R., T. Lian, S. Zuyderduyn, W. K. MacDonald, M. Marra, S. J. M. Jones and J. W. Kronstad (2002). "Temperature-regulated transcription in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*." Genome research **12**(9): 1386-1400.
- Steen, B. R., S. Zuyderduyn, D. L. Toffaletti, M. Marra, S. J. M. Jones, J. R. Perfect and J. Kronstad (2003). "*Cryptococcus neoformans* gene expression during experimental cryptococcal meningitis." Eukaryotic cell **2**(6): 1336-1349.
- 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.
- Swartley, J. S., A. A. Marfin, S. Edupuganti, L. J. Liu, P. Cieslak, B. Perkins, J. D. Wenger and D. S. Stephens (1997). "Capsule switching of *Neisseria meningitidis*." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94**(1): 271-276.
- Thompson, J. R., C. M. Douglas, W. Li, C. K. Jue, B. Pramanik, X. Yuan, T. H. Rude, D. L. Toffaletti, J. R. Perfect and M. Kurtz (1999). "A glucan synthase FKS1 homolog in *Cryptococcus neoformans* is single copy and encodes an essential function." Journal of bacteriology **181**(2): 444-453.
- Trevijano-Contador, N., H. C. de Oliveira, R. García-Rodas, S. A. Rossi, I. Llorente, Á. Zaballos, G. Janbon, J. Ariño and Ó. Zaragoza (2018). "*Cryptococcus neoformans* can form titan-like cells in vitro in response to multiple signals." PLOS Pathogens **14**(5): e1007007.
- Turner, S. H., R. Cherniak and E. Reiss (1984). "Fractionation and characterization of galactoxylomannan from *Cryptococcus neoformans*." Carbohydrate Research **125**(2): 343-349.
- Upadhyay, R., L. T. Campbell, M. J. Donlin, R. Aurora and J. K. Lodge (2013). "Global Transcriptome Profile of *Cryptococcus neoformans* during Exposure to Hydrogen Peroxide Induced Oxidative Stress." PLOS ONE **8**(1): e55110.
- van Duin, D., A. Casadevall and J. D. Nosanchuk (2002). "Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin." Antimicrobial agents and chemotherapy **46**(11): 3394-3400.

- Vartivarian, S. E., E. J. Anaissie, R. E. Cowart, H. A. Sprigg, M. J. Tingler and E. S. Jacobson (1993). "Regulation of Cryptococcal Capsular Polysaccharide by Iron." The Journal of Infectious Diseases **167**(1): 186-190.
- Vecchiarelli, A., E. Pericolini, E. Gabrielli, S. Kenno, S. Perito, E. Cenci and C. Monari (2013). "Elucidating the immunological function of the *Cryptococcus neoformans* capsule." Future Microbiology **8**(9): 1107-1116.\*
- Venn-Watson, S., R. Daniels and C. Smith (2012). "Thirty year retrospective evaluation of pneumonia in a bottlenose dolphin *Tursiops truncatus* population." Diseases of Aquatic Organisms **99**(3): 237-242.
- Vu, K., J. M. Bautos and A. Gelli (2015). "The Cch1-Mid1 High-Affinity Calcium Channel Contributes to the Virulence of *Cryptococcus neoformans* by Mitigating Oxidative Stress." Eukaryotic cell **14**(11): 1135-1143.
- Vu, K., R. Tham, J. P. Uhrig, G. R. Thompson, S. Na Pombejra, M. Jamklang, J. M. Bautos and A. Gelli (2014). "Invasion of the Central Nervous System by *Cryptococcus neoformans* Requires a Secreted Fungal Metalloprotease." mBio **5**(3): e01101-01114.
- Wang, P., C. B. Nichols, K. B. Lengeler, M. E. Cardenas, G. M. Cox, J. R. Perfect and J. Heitman (2002). "Mating-type-specific and nonspecific PAK kinases play shared and divergent roles in *Cryptococcus neoformans*." Eukaryotic cell **1**(2): 257-272.
- Wang, Y. and A. Casadevall (1994). "Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen- and oxygen-derived oxidants." Infection and immunity **62**(7): 3004-3007.
- Wang, Z. A., L. X. Li and T. L. Doering (2018). "Unraveling synthesis of the cryptococcal cell wall and capsule." Glycobiology **28**(10): 719-730.\*
- Warpeha, K. M., Y.-D. Park and P. R. Williamson (2013). "Susceptibility of intact germinating *Arabidopsis thaliana* to human fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*." Applied and environmental microbiology **79**(9): 2979-2988.
- Watkins, R. A., A. Andrews, C. Wynn, C. Barisch, J. S. King and S. A. Johnston (2018). "*Cryptococcus neoformans* Escape From *Dictyostelium Amoeba* by Both WASH-Mediated Constitutive Exocytosis and Vomocytosis." Frontiers in cellular and infection microbiology **8**: 108-108.
- Wickes, B. L., M. E. Mayorga, U. Edman and J. C. Edman (1996). "Dimorphism and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*: association with the alpha-mating type." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**(14): 7327-7331.
- Williamson, P. R. (1997). "Laccase and melanin in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*." Front Biosci **2**: e99-107.
- Wilson, D. E., J. E. Bennett and J. W. Bailey (1968). "Serologic Grouping of *Cryptococcus neoformans*." Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine **127**(3): 820-823.
- Xu, C.-Y., H.-M. Zhu, J.-H. Wu, H. Wen and C.-J. Liu (2014). "Increased permeability of blood-brain barrier is mediated by serine protease during *Cryptococcus meningitis*." Journal of International Medical Research **42**(1): 85-92.

---

\* Jedná se o review

- 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.
- Yang, D.-H., K.-W. Jung, S. Bang, J.-W. Lee, M.-H. Song, A. Floyd-Averette, R. A. Festa, G. Ianiri, A. Idnurm, D. J. Thiele, J. Heitman and Y.-S. Bahn (2017). "Rewiring of Signaling Networks Modulating Thermotolerance in the Human Pathogen *Cryptococcus neoformans*." Genetics **205**(1): 201-219.
- Zaragoza, O. and A. Casadevall (2004). "Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*." Biological procedures online **6**: 10-15.
- Zaragoza, O., B. C. Fries and A. Casadevall (2003). "Induction of Capsule Growth in *Cryptococcus neoformans* by Mammalian Serum and CO<sub>2</sub>." Infection and Immunity **71**(11): 6155-6164.
- 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., C. J. Chrisman, M. V. Castelli, S. Frases, M. Cuenca-Estrella, J. L. Rodríguez-Tudela and A. Casadevall (2008). "Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival." Cellular microbiology **10**(10): 2043-2057.
- Zhai, B., P. Zhu, D. Foyle, S. Upadhyay, A. Idnurm and X. Lin (2013). "Congenic strains of the filamentous form of *Cryptococcus neoformans* for studies of fungal morphogenesis and virulence." Infection and immunity **81**(7): 2626-2637.
- Zhao, Y., J. Lin, Y. Fan and X. Lin (2019). "Life Cycle of *Cryptococcus neoformans*." Annual Review of Microbiology.\*
- Zhu, P., B. Zhai, X. Lin and A. Idnurm (2013). "Congenic Strains for Genetic Analysis of Virulence Traits in *Cryptococcus gattii*." Infection and Immunity **81**(7): 2616.

---

\* Jedná se o review