

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2013

Bc. Ivana Horáková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



***In vitro* model kryptokokové hypoxické
adaptace v lidské tkáni**

Diplomová práce

Bc. Ivana Horáková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2013

Vedoucí práce: MUDr. Vladislav Raclavský, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně v průběhu navazujícího studia pod vedením MUDr. V. Raclavského, Ph.D. za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne 26.7. 2013

.....

Ráda bych poděkovala MUDr. Raclavskému, Ph.D. za jeho odborné rady, poskytnuté materiály a jeho čas, který mi věnoval při vypracovávání této diplomové práce. Dále poděkování patří kolegům z Ústavu mikrobiologie LF za jejich cenné rady a pomoc.

Tato práce byla podpořena Integrovanou grantovou agenturou UP Olomouc (LF_2013_012) a infrastrukturní část (Ústav molekulární a translační medicíny) byla podpořena Operačním programem Výzkum a vývoj pro inovace (projekt CZ.1.05/2.1.00/01.0030).

SOUHRN

Ve své diplomové práci jsem se věnovala vlivu složení média na morfoligii buněk *Cryptococcus neoformans* za různých podmínek aerace. Cílem práce bylo napodobit v laboratorních podmínkách různé podmínky růstu v lidské tkáni a korelovat parametry těchto podmínek s orientačním měřítkem hypoxické adaptační reakce, kterým je u *C. neoformans* velikost buněk.

Základním kultivačním médiem bylo médium RPMI 1640, které bylo postupně modifikováno různými koncentracemi glukózy, úpravou PBS, přidavkem železa, přidavkem agaru pro úpravu viskozity média a dále přidavkem hovězího sérového albuminu a lidského séra. Různé stupně aerace byly dány odlišnými objemy kultivačního média a také celkovou dobou kultivace buněk.

Po uplynutí kultivační doby byl z kultivované buněčné suspenze zhotoven mikroskopický preparát, který byl pozorován pod mikroskopem, a následně byly pořízeny fotografie, na kterých byl měřen průměr buněk programem ImageJ pro analýzu dat, získaná data byla statisticky zpracována Studentovým t - testem.

Z výsledků mé práce vyplývá, že statisticky nejvýznamnější vliv na velikost buněk měl přídavek agaru, který výrazně změnil velikost kultivovaných buněk, při kultivaci buněk v médiu s agarem byla velikost buněk výrazně menší než při jiných kultivacích. Z tohoto hlediska byl nejvýznamnější i přídavek železa, který naopak způsobil nárůst průměrných velikostí buněk. Největších velikostí buňky dosahovaly při kultivaci v objemu reprezentujícím stav mírné hypoxie a zároveň při kultivaci v médiu obohaceném o 1% glukózu, která zajišťovala buňkám dostatečnou výživu.

SUMMARY

In my master thesis I focused on the influence of varied composition of culture medium on cellular morphology in *Cryptococcus neoformans* under different conditions of aeration. Aim of the work was to simulate different parameters of cryptococcal growth in human tissue under laboratory conditions and follow morphological changes of *C. neoformans* typical for hypoxia response under these conditions. Cell size was used as a rough measure of hypoxia response.

The basic culture medium was RPMI 1640 medium which was modified by various concentrations of glucose, buffering by PBS, addition of iron, addition of agar medium to adjust the viscosity and also addition of the bovine serum albumin and human serum. Various levels of aeration were achieved by using different volumes of culture medium and cultivation time.

After the end of the culture period cell suspension was observed under photographs were taken and evaluated by ImageJ software for cell diameter measurement, data were statistically analyzed by Student's t - test.

The results of my thesis showed that addition of agar caused the most statistically significant change in cell size, i.e. cells were much smaller than without agar supplement. The significant influence was observed after the addition of iron, which in turn caused an increase in the average size of cells. Largest cell size was reached when cells were cultured in a volume representing the state of mild hypoxia and also when cultivated in a medium supplemented with 1% glucose, which provided better nutrition to the cells.

OBSAH

1 ÚVOD	8
2 CÍLE PRÁCE	9
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
3.1 Obecná charakteristika rodu <i>Cryptococcus</i>	10
3.1.1 <i>Cryptococcus neoformans</i>	12
3.2 Hypoxie	15
3.2.1 Transkripční faktory HIF	16
3.2.1.1 Hypoxia - inducible factor 1.....	16
3.2.1.1.1 Regulace transkripční aktivity HIF - 1	17
3.2.2 Reakce na hypoxii u <i>Cryptococcus neoformans</i>	18
4 MATERIÁL A METODY	22
4.1 Biologický materiál	22
4.2 Seznam použitých chemikálií.....	22
4.3 Seznam použitých roztoků a médií	23
4.4 Seznam použitých laboratorních přístrojů a pomůcek	26
4.5 Metodika a postupy	26
4.5.1 Přesnoční buněčná kultura	26
4.5.2 RPMI 1640 médium	27
4.5.3 Charakterizace odpovědi <i>C. neoformans</i> na hypoxii při různých aerace a složení kultivačního média.....	28
5 VÝSLEDKY	30
5.1 Vyhodnocení kultivace buněk <i>C. neoformans</i> v médiu s 1% a 0,1% glukózou	31
5.2 Vyhodnocení kultivace buněk <i>C. neoformans</i> v médiu s 1% a 0,1% glukózou a pufrované BPS	32
5.3 Vyhodnocení kultivace buněk <i>C. neoformans</i> v médiu s 1% a 0,1% glukózou, pufrované BPS a obohacené železem.....	34
5.4 Vyhodnocení kultivace buněk <i>C. neoformans</i> v médiu s 1% a 0,1% glukózou, pufrované BPS, s přidavkem železem a viskozitou upravenou přidavkem agarů	35

5.5 Vyhodnocení kultivace buněk <i>C. neoformans</i> v médiu s 1% a 0,1% glukózou, pufrované BPS, obohacené o železo, s viskozitou upravenou agarem a s přídatkem hovězího sérového albuminu.....	37
5.6 Vyhodnocení kultivace buněk <i>C. neoformans</i> v médiu s 1% a 0,1% glukózou, pufrované BPS, obohacené o železo, s viskozitou upravenou agarem a s přídatkem hovězího sérového albuminu a lidského séra	39
5.7 Výsledky statistického vyhodnocení dat prostřednictvím Studentova T - testu.....	40
6 DISKUZE	45
7 ZÁVĚR.....	48
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	49
9 POUŽITÁ LITERATURA	51

1 ÚVOD

Zástupci rodu *Cryptococcus* se zařazují mezi bazidiomycety spadající do říše hub (*Fungi*). Rod byl charakterizován v roce 1950 a jedná se o polyfyletické organismy. Někteří zástupci rodu jsou patogeny schopné vyvolávat závažná onemocnění. Napadají zejména centrální nervovou soustavu, vyvolávají také kožní či plicní onemocnění nebo záněty urogenitálního traktu a záněty očí.

Nejznámějším zástupcem rodu je *Cryptococcus neoformans*. Jedná se o patogenní organismus objevený v roce 1894. Tato kvasinka se vyskytuje ve dvou varietách, variety *neoformans* a *gattii*. Obě variety jsou patogenní a vyvolávají onemocnění - kryptokokózy, které napadají centrální nervovou soustavu ve formě meningitidy či meningoencefalitidy. *C. neoformans* var. *neoformans* napadá zejména osoby s oslabenou imunitou, nejnebezpečnější je pro pacienty s HIV, pacienty po transplantacích nebo pro pacienty po prodělané onkologické léčbě. Varieta *gattii* může napadat i osoby s neoslabeným imunitním systémem (imunokompetentní).

Ve své diplomové práci se zaměřuji na schopnost buněk *C. neoformans* adaptovat se na hypoxické podmínky v tkáních, které je prvotním předpokladem pro pozdější hemotogenní rozsev, překonání hematoencefalické bariéry a rozšíření infekce do mozku. Schopnost přizpůsobovat se měnícím se koncentracím kyslíku ve tkáních je důležitou životní strategií patogenního organismu *C. neoformans* a souvisí především s patogenezí. Hypoxické prostředí vyvolává u buněk *C. neoformans* změnu v průběhu buněčného cyklu. V následující práci se zaměřuji zejména na vliv různorodého složení kultivačního média na morfologii a proliferaci buněk *C. neoformans* a na celkový charakter kultivační kultury v podmínkách různého stupně aerace.

2 CÍLE PRÁCE

1. Shromáždit dostupné literární zdroje a vypracovat literární rešerši na dané téma.
2. Otestování vlivu složení média na fenotyp *C. neoformans* v hypoxické kultuře.
3. Otestování vlivu konzistence a třepání média na fenotyp *C. neoformans* v hypoxické kultuře.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Obecná charakteristika rodu *Cryptococcus*

Zástupce rodu *Cryptococcus* zařazujeme mezi eukaryotní organismy spadající do říše hub. Tyto bazidiomycetové organismy jsou celosvětově rozšířené. Lze je nalézt například v půdě, vzduchu či rostlinách. Některé z druhů jsou izolovány také z prostředí bohatého na dusíkaté látky, jako je ptačí trus (Fell *et* Statzell-Tallman, 1998; Renker *et al.*, 2004; Soares *et al.*, 2005).

Podle Phaff *et* Fell (1970) byl rod *Cryptococcus* charakterizován v roce 1950 na základě schopnosti fermentovat sacharidy. Jedná se o polyfyletický rod a neustálá molekulárně biologická analýza přispívá k zpřesnění fylogenetických vztahů mezi jednotlivými druhy (Fell *et* Statzell-Tallman, 1998).

Pro tento rod jsou charakteristické buňky kulovitého či ovoidního tvaru. Rozmnožují se pomocí multilaterálního nebo polárního pučení. Některé druhy mohou vytvářet také telomorfní stádia, například *C. neoformans* (Fell *et* Statzell-Tallman, 1998). Pro svůj růst mají tyto kvasinky minimální požadavky, využívají pouze jednoduché organické sloučeniny. Médium tudíž nemusí být obohacováno o vitamíny (Mitchell *et* Perfect, 1995). Všechny druhy mohou hydrolyzovat škrob, metabolizovat inositol a mohou produkovat ureázy, což je spolu s morfologickými rysy významně odlišuje od jiných kvasinek (Mitchell *et* Perfect, 1995).

Kvasinky z rodu *Cryptococcus* vykazují bazidiomycetový typ buněčného cyklu. Tento typ buněčného cyklu je vysvětlen na příkladu *C. neoformans* jakožto nejvýznamnějším zástupci. Na mateřské buňce vyrůstá pupen, do kterého se před započetím mitotického dělení přesouvá jádro. Jádro je rozděleno dělicím vřeténkem a jedno z dceřiných jader zůstává v pupenu, druhé se vrací do mateřské buňky. Poté dochází k rozdělení buněk (Mochizuki *et al.*, 1987; Mochizuki, 1998; Kopecká *et al.*, 2000). Na povrchu buněčné stěny pučících mateřských buněk lze detekovat jizvy po předchozích pučeních či vchlípeniny plazmatické membrány (Cleare *et* Casadevall, 1999; Faganello *et al.*, 2006; Takeo *et al.*, 1973; 1974). U *C. neoformans* existují dva párovací typy: **a** a **α**. Za specifických podmínek lze navodit i rozmnožování pohlavní. Bazidiomycetový typ buněčného cyklu u *C. neoformans* je zobrazen na obrázku č. 1.

Specifickou charakteristikou rodu je přítomnost partikulí. Nachází se na vnější straně buněčné stěny a jsou velké kolem 20 nm. Díky partikulím mohou kvasinky vytvářet vnější

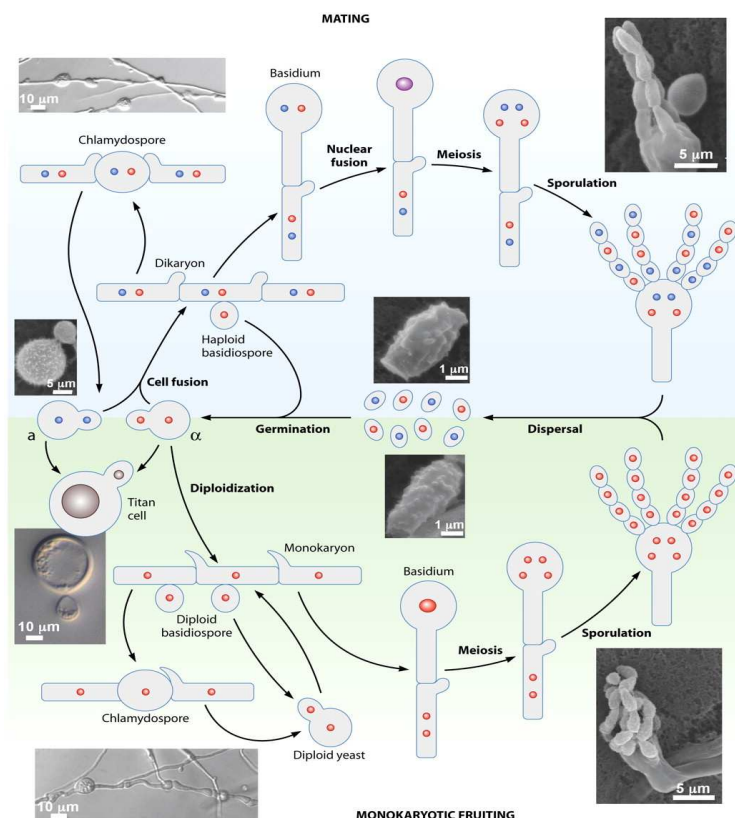
pouzdro nebo vytvářet extracelulární sacharidy. Pouzdro lze vizualizovat pomocí specifických metod pro přípravu mikroskopických preparátů, jedná se o fibrilární strukturu (Edwards *et al.*, 1967; Takeo *et al.*, 1973; Sakaguchi *et al.*, 1993).

Pouzdro, které se skládá z polysacharidů obsahujících manózu a manoproteinu, je považováno za nejvýznamnější faktor virulence (Steenbergen *et Casadevall*, 2003). Pouzdro chrání buňku zejména před fagocytózou makrofágů a před vnějšími nepříznivými vlivy, například ochrana před suchem, dusíkem nebo amébami. Opouzdržené buňky nevystavují na svém povrchu kryptokokové antigeny, čímž nedochází k jejich rozeznání makrofágy a následné fagocytóze. Polysacharidy z pouzdra se částečně uvolňují do krve hostitele a tím zabraňují leukocytům rychle proniknout k místu zánětu (Bulmer *et Sans*, 1968; Kozel *et al.*, 1988; Doering, 2000; Steenbergen *et Casadevall*, 2003).

Dalšími faktory virulence rodu *Cryptococcus* jsou tvorba melaninu a manitolu (Kozel, 1995; Ikeda *et al.*, 2002). Melanin se podílí na vyztužení buněčné stěny, to umožňuje kvasinkám lépe čelit stresovým faktorům a napomáhá odolnosti vůči oxidačním činidlům. Pigment melanin také umožňuje větší odolnost vůči ultrafialovému záření. (Jacobson, 2000; Nosanchuk *et Casadevall*, 2003; Polacheck *et al.*, 1982; Ikeda *et al.*, 2002). Manitol chrání buňky kvasinek před účinkem hydroxylových radikálů. Mutantní kmeny, které produkují manitol v menší míře, jsou více náchylné k teplotnímu šoku či vysokým koncentracím soli, jsou tedy méně virulentní (Kozel, 1995; Buchanan *et Murphy*, 1998).

Onemocnění, která vyvolávají zástupci rodu *Cryptococcus*, se souhrnně nazývají kryptokokózy. Problematická jsou zejména ta onemocnění, na nichž se podílí *C. neoformans*. Nejvíce rizikovou skupinou jsou HIV pozitivní jedinci (Mitchell *et Perfect*, 1995). Kryptokoková infekce způsobuje ročně až 600 000 úmrtí, patří mezi nejčastější příčinu úmrtí v Subsaharské Africe (Zaragoza *et al.*, 2010). Kryptokokóza způsobená *C. neoformans* postihuje centrální nervovou soustavu ve formě meningoencefalitidy nebo meningitidy (Mamidi *et al.*, 2002; Bicanic *et Harrison*, 2004; Friedman *et al.*, 2005).

Rod *Cryptococcus* může dále vyvolávat kožní či plicní onemocnění, onemocnění urogenitálního charakteru nebo záněty očí (Mitchell *et Perfect*, 1995; Drouhet, 1997; Saag *et al.*, 2000).



Obrázek č. 1: Životní cyklus *C. neoformans*

(<http://mmbr.asm.org/content/75/2/213/F10.expansion.html>)

3.1.1 *Cryptococcus neoformans*

Cryptococcus neoformans byl poprvé identifikován a popsán jako patogenní organismus v roce 1894 dvěma německými lékaři, Otto Bussem a Abrahamem Buschkem. Ve stejném roce byl tento organismus objeven také italským vědcem Francesco Sanfelice. Buss a Buschke patogena izolovali ze zánětlivého ložiska na holeni pacientky, Sanfelice jej objevil ve šťávě z broskví (Casadevall *et* Perfect, 1998).

Zařazení a pojmenování této kvasinky se v průběhu let několikrát změnilo. V roce 1894 ji Busse pojmenoval jako *Saccharomycosis homnis*, Sanfelice ve stejné době pojmenoval *C. neoformans* jako *Saccharomyces neoformans*. Francouzský patolog Curtis objevil kvasinkovou infekci centrální nervové soustavy v roce 1896 a izolovanou kvasinku pojmenoval jako *Megalococcus myxoides*. V roce 1901 došlo k přejmenování kvasinky izolované Bussem a Curtisem na *Cryptococcus hominid* a kvasinky získané Sanfelice na *Cryptococcus neoformans* (Casadevall *et* Perfect, 1998).

V současnosti zařazujeme *C. neoformans* následovně:

Říše: Houby (*Fungi*)

Kmen: *Basidiomycota*

Třída: *Tremellomycetes*

Řád: *Filobasidiales*

Rod: *Fillobasidiella*

C. neoformans je rozdělen do dvou variet, a to *C. neoformans* var. *neoformans* a *C. neoformans* var. *gattii*. Toto rozdělení proběhlo na základě odlišných biochemických, epidemiologických, ekologických, patobiologických a zejména genetických vlastností. Díky povrchovým antigenům, jež se nachází na vnějším ochranném polysacharidovém pouzdře kvasinek, byly objeveny čtyři základní sérotypy: A, B, C, D. Varieta *neoformans* obsahuje sérotypy A a D, zatímco varieta *gattii* obsahuje sérotypy B a C (Casadevall et Perfect, 1998).

V letech 1975 - 1976 došlo k popsání sexuálního stádia *C. neoformans*, které bylo nazváno *Fillobasidiella neoformans*. Na základě objevu a popsání teleomorfního stádia kvasinky *C. neoformans*, došlo k popsání také dvou variet, a sice *Fillobasidiella neoformans* a *Fillobasidiella bacillispora* (Casadevall et Perfect, 1998).. Kwon-Chung et Varma (2006) zjistili, že *F. neoformans* je tvořený sérotypy A a D a *F. bacillispora* je tvořený sérotypy B a C. Jedná se tedy o dvě teleomorfní variety pro anamorfní variety *C. neoformans* var. *neoformans* a *C. neoformans* var. *gattii*.

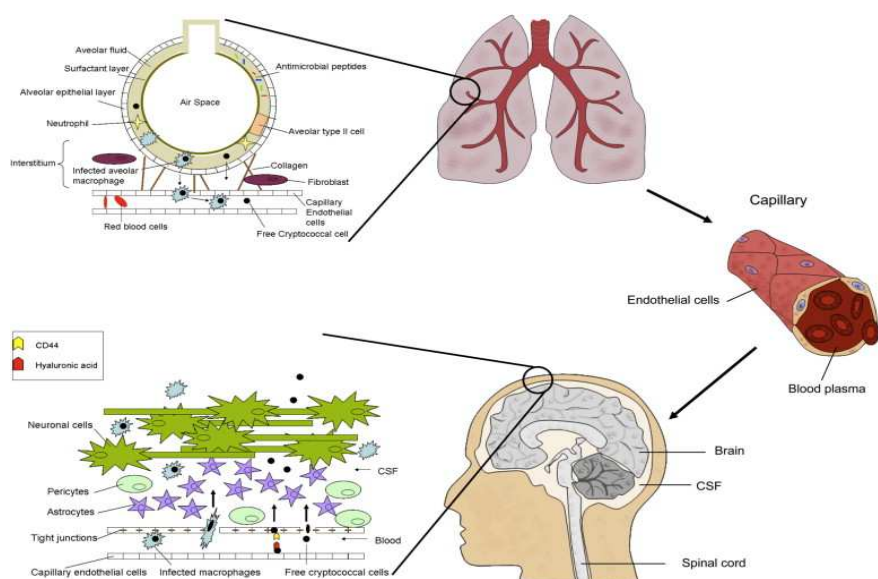
Cryptococcus neoformans je kosmopolitně rozšířená kvasinka. Vyskytuje se například v půdě, jako saprofyt nebo na rostlinách či zvířecích hostitelích. Jednotlivé variety se ve výskytu liší. Zatímco varieta *neoformans* je celosvětově rozšířená, varieta *gattii* se nachází pouze v tropickém či subtropickém pásu. Varieta *neoformans* byla získána například z půdy nebo ptačího (zejména holubího) trusu, varieta *gatti* hlavně ze stromů eukalyptu (Ellis et Pfeifer, 1990; Sorrel et al., 1996; Sorrel et Ellis, 1997; Casadevall et Perfect, 1998).

Rozdíly mezi varietami jsou patrné také na sérologické a biochemické úrovni. K identifikaci se používá zejména rozdílnost variet v aktivitě některých enzymů, což se využívá k diagnostice chorob. Rozdílná enzymatická aktivita se projevuje například v odlišné schopnosti asimlovat kyselinu fumarovou či sukcinovou, odlišná je také regulace metabolismu kreatinu, rozdílná je i citlivost obou variet k antivykotikům (Casadevall et Perfect, 1998). Většina chorob a infekcí vyvolaných *C. neoformans* je způsobena varietou *neoformans*. Tato varieta je nebezpečná hlavně pro pacienty s oslabenou imunitou, nejčastěji postihuje pacienty s virem HIV. Podle Khyriem et al. (2004) je však mnohem nebezpečnější varieta *gattii*, která infikuje i zdravé jedince. Onemocnění způsobená patogenem *C.*

neoformans se nazývají kryptokokózy. Jedná se o závažná onemocnění lokalizovaná zejména v centrální nervové soustavě mající charakter meningitidy či meningoencefalitidy (Mamidi *et al.*, 2002; Bicanic *et Harrison*, 2004; Friedman *et al.*, 2005). Patogen je pravděpodobně vdechnut ve formě bazidiospor, primárním ložiskem nákazy jsou tedy plíce. Chang *et al.* (2004) popsali možnost hematogenního rozsevu nákazy do jiných orgánů překonáním hematoencefalické bariéry. Výzkum prokázal, že po překonání této bariéry se buňky *C. neoformans* nachází nejprve v těsné blízkosti cév, později jsou ale schopny napadnout mozkový parenchym a pleny. Dochází zde k adaptaci buněk na podmínky v centrální nervové soustavě. Jednou z možností je adaptace na hypoxické podmínky v mozkové tkáni. Koncentrace kyslíku v mozkové tkáni je mnohem nižší než jeho koncentrace v plicích, jako primárním ložisku nákazy, nebo v cévách, kterými jsou buňky *C. neoformans* zaneseny do centrální nervové soustavy. Šíření kryptokokové infekce je zobrazeno na obrázku č. 2.

Další výzkumy týkající se patogenity *C. neoformans* odhalili gigantické buňky vyskytující se během infekce. Velikost gigantických kryptokokových buněk může dosahovat až 50 - 100 μm v průměru. Tyto buňky se vyskytují v organismu již po prvním dnu infekce (tvoří až 20 % ze všech buněk *C. neoformans* v plicích hostitele) (Okagaki *et al.*, 2010). Přítomnost gigantických buněk patogena by v napadeném organismu způsoboval závažný problém pro imunitní systém, už jen z důvodu velikosti buněk. Zaragoza *et al.* (2010) uvedli, že gigantické buňky jsou mnohem odolnější vůči oxidativním stresovým podmínkám v hostitelských buňkách a mají schopnost delšího přežití. Buněčné mechanismy zvětšování kryptokokových buněk do gigantických rozměrů dosud nejsou plně známy, nicméně růst buněk je úzce závislý na buněčném cyklu. Aby bylo možné pokračovat v průběhu buněčného cyklu, je nutné dosáhnout v hraničních bodech kritické velikosti buněk, Zaragoza *et al.* (2010) ve svém výzkumu předpokládali, že gigantického zvětšení dosáhnou buňky *C. neoformans* opakováním G_1 fáze bez dělení buněk. Stejní autoři také uvedli, že velikosti buňky je také přímo úměrný obsah DNA, což podporuje teorii o opakovaném probíhání G_1 fáze bez dělení buněk.

Gigantické buňky *C. neoformans* jsou limitované svou velikostí a tudíž u nich nedochází k rozšíření do organismu hostitele, nejsou schopné překonat biologické bariéry. Jejich patogenita souvisí se schopností přežití v organismu, dokud nenastanou vhodné podmínky, poté jsou schopny produkovat buňky menších velikostí, které snadněji překonávají biologické bariéry (Zaragoza *et al.*, 2010; Okagaki *et al.*, 2010).



Obrázek č. 2: Model šíření kryptokokové infekce

(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1749461312000061>)

3.2 Hypoxie

Termín hypoxie obecně označuje nedostatek kyslíku v těle či jednotlivých tkáních. Od hypoxie je potřeba také odlišovat termín anoxie, jedná se o úplný nedostatek kyslíku. Kyslík je nepostradatelným prvkem téměř pro všechny organismy, je důležitý pro metabolismus (uplatňuje se při řadě biochemických reakcí). Kyslík je také velmi důležitým faktorem životaschopnosti organismů, proto mají buňky určitý mechanismus, který množství kyslíku v prostředí je obklopující monitoruje. Podle Taylora *et al.* (1999) se v tomto mechanismu uplatňují jak proteinové receptory, tak i iontové kanály, přes které jsou reakce několikanásobně rychlejší.

Na nedostatek kyslíku buňky reagují dvěma základními způsoby: 1. Zpomalení buněčného cyklu; 2. Apoptóza (Goda *et al.*, 2003). Každá buněčná odpověď na hypoxii je systémem složitých reakcí, při nichž se uplatňují transkripční faktory a proteiny, které sehrávají důležitou roli při regulaci exprese genů důležitých pro přežití buňky.

Mechanismus hypoxické reakce je nejlépe popsán u buněk savců. Reakce na snížení dostupnosti kyslíku u savců vede ke spuštění aerobní glykolýzy, ale také k aktivaci genů zapojených do transportu glukózy, genů účastnících se erythropoézy, vazodilatace či angiogeneze. Dochází také ke zpomalení nebo zastavení procesů spotřebovávajících velké množství energie, zejména ke snížení proteosyntézy (Hu *et al.*, 2003). Při hypoxii se exprimují také HIF proteiny, ty jsou klíčové v regulaci exprese cílových genů.

Nejdůležitějším je HIF - 1. Tento hypoxia - inducible factor 1 pomáhá udržet homeostázu organismu (Carmeliet *et al.*, 1998).

3.2.1 Transkripční faktory HIF

První zmínky o transkripčních faktorech HIF se objevily při studiu erytropoetinu (EPO) a jeho exprese v roce 1991. Semenza *et al.* (1991) identifikovaly dva členy rodiny HIF. Při výzkumu zjistili, že na 3' enhancer EPO genu se váže transkripční faktor, který pojmenovali jako hypoxia - inducible factor. Později byly podrobněji popsány struktury prvních faktorů z HIF rodiny, a to HIF - 1 α a HIF - 1 β (Wang *et al.*, 1995). O rok později byl definován HRE (hypoxia response elements) (Semenza *et al.*, 1996). Tento objev pomohl také k identifikaci genů, které jsou regulovány v závislosti na hypoxii.

3.2.1.1 Hypoxia - inducible factor 1

HIF molekula je složená ze dvou podjednotek - alfa a beta. V současnosti známe tři formy každé z podjednotek, označují se jako HIF - 1 α , HIF - 2 α , HIF - 3 α , HIF - 1 β , HIF - 2 β a HIF - 3 β . Podjednotky alfa a beta spolu mohou vzájemně dimerizovat a obě jsou exprimovány také za stavu normoxie. HIF - 1 β zůstává za stavu normoxie stabilní, HIF - 1 α je rychle degradována, což zabraňuje spuštění hypoxických genů (Huang, 1998; Kallio, 1999; Marxsen, 2004). Transkripční aktivita HIF - 1 je vykazována pouze za stavu heterodimeru, z čehož vyplývá, že množství aktivního HIF- 1 (HIF - 1 α / β) je přímo úměrné množství podjednotky alfa, jelikož její existence je přímo úměrná koncentraci kyslíku. Na množství HIF - 1 β koncentrace kyslíku vliv nemá (Kallio *et al.*, 1999). HIF - 1 α má tedy za úkol rychlou odpověď na hypoxii, taková akutní odpověď je nepostradatelná pro každou buňku.

Nejlépe prozkoumanou molekulou HIF je alfa a její tři formy (HIF - 1 α / 2 α / 3 α). Podjednotky HIF - 1 α a HIF - 2 α spolupracují na rychlé odezvě na hypoxii, v některých případech působí specificky, v jiných se prolínají, zejména strukturní oblasti zodpovědné za vazbu na DNA či heterodimerizaci jsou podobné (Hu *et al.*, 2003). HIF - 3 α působí jako negativní regulátor ostatních alfa podjednotek.

HIF beta podjednotky bývá označována jako ARNT, tedy aryl hydrocarbon nuclear translocator. Tyto podjednotky mají schopnost dimenzovat i s jinými proteiny, například s aryl hydrokarbonovými receptory (AhR) a Sim proteiny (Chan *et al.*, 1999).

HIF -1 α / β patří do rodiny bazických helix - loop - helix proteinů. Struktura všech HIF proteinů je stejná, skládají se z bHLH a PAS domén (PAS doména je tvořena dvěma částmi - A a B). Tato molekulární struktura HIF proteinů je nezbytná pro dimerizaci podjednotek alfa a beta a pro jejich následné připojení se na DNA (Wang *et al.*, 1995).

HIF proteiny fungují jako senzory koncentrace kyslíku, tato schopnost je umožněna díky degradaci alfa podjednotky. Za normálních podmínek HIF - 1 α degraduje velmi rychle, v řádech několika minut. Odbourání alfa podjednotky se děje prostřednictvím ubikvitin - proteázomové dráhy. Degradace alfa podjednotky byla prokázána v několika pokusech s využitím inhibitorů proteazomu (Huang *et al.*, 1998; Kallio *et al.*, 1999). Místo zodpovídající za degradaci se označuje ODDD (oxygen dependent degradation domain). Tato degradační doména je závislá na koncentraci kyslíku a obsahuje motivy pro hydroxylaci a acetylaci (Marxen, 2004).

Za stavu normoxie dochází k aktivaci prolyl hydroxyláz, které hydroxylují prolinové zbytky nacházející se v ODDD. Takto dochází k rozpoznání a označení proteinu, následuje polyubikvitinizace a vazba pVHL (von - Hippel - Lindau protein). pVHL je součástí E3 ubikvitin - ligázového komplexu. Degradace probíhá ve 26S proteazomu (Covello *et al.*, 2006; Marxen, 2004). Huang *et al.* (1998) uvádí, že ke stabilizaci HIF - 1 α za normoxie dochází při odstranění ODDD.

Jestliže není HIF - 1 α odbouráná, pak dochází k jejímu transportu do jádra, zde dochází k dimerizaci s podjednotkou beta a vzniká aktivní transkripční faktor HIF - 1. HIF - 1 se pak váže na DNA a tím dochází k regulaci cílových genů. Pokud v okolním prostředí dojde k poklesu kyslíku, pak se prostřednictvím HIF - 1 spustí exprese hypoxických genů (například erythropoetin, glykolytické enzymy či VEGF - vascular endothelial growth factor), které mají zajistit obnovení homeostázy (Kallio *et al.*, 1999).

3.2.1.1.1 Regulace transkripční aktivity HIF - 1

Regulace transkripční aktivity HIF - 1 probíhá na více úrovních. Jedná se o acetylaci, hydroxylaci, S - nitrosylaci, sumoylaci a fosforylaci.

Za hypoxie dochází k vazbě heterodimeru HIF - 1 na HRE (hypoxia response elements) oblast DNA (Semenza *et al.*, 1996). Prostřednictvím této vazby působí HIF jako transkripční faktor a přímo ovlivňuje expresi genů, které obsahují sekvenci (A / G) CGTG (sekvence shodná se sekvencí v HRE oblasti) ve svém promotoru. Za vazbu specifických kofaktorů jsou zodpovědné oblasti nacházející se v CTAD a NTAD, tedy v C - koncové

transaktivační doméně a N - koncové transaktivační doméně. CTAD doména odpovídá spíše za přepis genů a NTAD doména zodpovídá za expresi cílových genů (Hu *et al.*, 2006).

Nejvýznamnějším transkripčním koaktivátorem je p300 a jeho homolog CREB (cAMP response element binding protein) (Arany *et al.*, 1996). Hydroxylací oblastí v CTAD doméně je znemožněna vazba koaktivátoru p300, čímž dojde k blokování aktivity HIF - 1. Pouze správně navázaný koaktivátor na sebe může vázat další nezbytné části důležité pro acetylaci histonů a následné rozvolnění chromatinu (Wang *et al.*, 2010).

Mateo *et al.* (2003) uvádí, že stabilizace HIF - 1 je také ovlivňována působením oxidu dusnatého. V CTAD dochází k S - nitrosilaci cysteinu a tím se mění rozložení nábojů, čímž je umožněna lepší interakce HIF - 1 s p300 (Submayev *et al.*, 2003).

Regulace transkripční aktivity HIF - 1 se děje i prostřednictvím sumoylace. Tato reakce modifikuje koaktivátory jako p300 či HIF - 1 β a tím dochází k negativnímu ovlivňování stability HIF - 1 (Girdwood *et al.*, 2003). Sumoylace může i zvyšovat stabilitu HIF - 1 a to tak, že modifikuje lizinové zbytky v ODDD oblasti HIF - 1 α (Bae *et al.*, 2004).

Další významnou formou regulace je fosforylace. Podle Richarda *et al.* (1999) fosforylace zvyšuje transkripční aktivitu HIF - 1 α . To se děje prostřednictvím MAPK kináz, které se nachází na specifických zbytcích HIF - 1 α .

Stabilitu HIF - 1 za hypoxických podmínek zřejmě ovlivňují také ROS (reactive oxygen species). Reaktivní kyslíkové radikály jsou syntetizovány mitochondriálním komplexem III, z čehož vyplývá, že klíčovou roli v hypoxické odpovědi buňky hraje také mitochondrie, jakožto organela s nejvyšší spotřebou kyslíku (Chandel *et al.*, 2000).

Jiným způsobem regulace je regulace stability a transkripční aktivity HIF - 1 prostřednictvím proteinu FIH - 1 (factor inhibiting HIF - 1). Ten v závislosti na koncentraci kyslíku hydroxyluje asparaginové zbytky v CTAD doméně HIF - 1 α . Hydroxylací v CTAD je znemožněna vazba některých koaktivátorů (např. p300) a aktivita HIF - 1 je blokována (Lando *et al.*, 2002).

3.2.2 Reakce na hypoxii u *Cryptococcus neoformans*

Pro některé druhy kvasinek, zejména pro ty, které se zařazují mezi fakultativně anaerobní organismy, není nedostatek kyslíku limitujícím faktorem. *C. neoformans* se ale řadí mezi obligátně aerobní organismy, pro které je kyslík rozhodujícím faktorem. Studie Oddse *et al.* (1995) potvrdila, že růst a viabilita této kvasinky je závislá na přítomnosti kyslíku.

Hypoxickou reakci *C. neoformans* studovali i japonští vědci Ohkusu *et al.* (2001). Porovnávali kulturu s dostatečným přístupem kyslíku a kulturu s přístupem nedostatečným. Sledovali zejména koncentraci kyslíku a glukózy v daném médiu a v průběhu několika hodin studovali velikost buněk a obsah DNA v nich. U kultury s omezeným přístupem kyslíku zjistili, že v první fázi růstu buněk značně přibývá, ale zároveň dochází s rostoucím počtem buněk v médiu také k poklesu koncentrace kyslíku. Po dosažení nejnižší koncentrace kyslíku v médiu (tj. 1 mg.l^{-1}) dochází k ukončení exponenciální fáze růstu a začíná druhá fáze, ve které je růst buněk velmi pozvolný a dochází k celkovému zpomalení buněčného cyklu. Nízká hladina kyslíku má za následek ovlivnění jednotlivých kroků v buněčném cyklu, hlavně tvorbu pupene, ta je přesunuta z fáze S do G₂. V G₂ fázi buněčného cyklu pak dochází vlivem nízké hladiny kyslíku k zástavě cyklu. Dalším důsledkem nízké koncentrace kyslíku je výrazně nižší počet pučících buněk, došlo k poklesu z 30 - 40 % pučících buněk na 3- 6% (Ohkusu *et al.*, 2001).

Vnímání koncentrace kyslíku je pro *C. neoformans* velmi důležité. Přizpůsobení se hypoxickým podmínkám je rozhodující pro přežití tohoto patogena v organismu hostitele, kde je koncentrace kyslíku mnohem nižší než v okolním atmosférickém prostředí. Hlavním místem kryptokokové infekce jsou plíce, které jsou kyslíkem bohatě zásobeny, poté ale dochází k rozšíření buněk do CNS (centrální nervový systém), kde je hladina kyslíku mnohem nižší (Moranova *et al.*, 2009). Chang *et al.* (2004) ve svém pokusu zkoumali mechanismus překonávání hematoencefalické bariéry. V prvních hodinách po infekci hostitelského organismu zůstávají buňky *C. neoformans* v těsné blízkosti mozkových cév. Po deseti dnech od infekce se v mozkovém parenchymu objevují cystické léze. Setrvávání buněk a cystických ložisek v blízkosti cév zajišťuje buňkám patogena dostatečné zásobení kyslíkem.

Mechanismus adaptace na hypoxii je dobře popsán u modelových organismů *Saccharomyces cerevisiae* a *Schizosaccharomyces pombe*, avšak u *Cryptococcus neoformans* se jednotlivé kroky adaptace a molekuly, které se na ní podílejí, zatím objasňují. U *S. pombe* je reakce na hypoxii spojena s proteiny Sre1, Scp1 a Ins1. Tyto proteiny jsou homologní k savcím proteinům SREBPs (sterol regulatory element binding proteins). Jejich role spočívá v udržování homeostázy, v kontrole metabolismu lipidů a v kontrole exprese genů, jejichž produkty se účastní syntézy mastných kyselin, fosfolipidů, triglyceridů a cholesterolu (Horton *et al.*, 2002). V roce 2005 bylo zjištěno, že kvasinkové proteiny Sre1 s Scp1 jsou funkčními ortology k savcím proteinům SREBP a SCAP (SREBP - cleavage activating protein). Sre1 protein se také aktivně podílí na adaptaci *S. pombe* na hypoxii, je nezbytný pro růst buněk v anaerobních podmínkách (Hughes *et al.*, 2005). Při nízké koncentraci kyslíku dochází ke

zpomalení syntézy sterolů, nižší hladina sterolů navozuje proteolytickou aktivaci Sre1 proteinu, ten poté funguje jako transkripční aktivátor, který zajišťuje expresi genů podílejících se na přechodu aerobní respirace na fermentaci (Hughes *et al.*, 2005; Todd *et al.*, 2006).

U *S. cerevisiae* sehrává důležitou roli v adaptaci na sníženou koncentraci kyslíku v okolí molekula hemu. Hem je signální molekulou a je zapojen do celé řady dějů souvisejících s využitím kyslíku. Hem pozitivně ovlivňuje transkripci aerobních genů a také působí negativně na transkripci genů hypoxických (Hon *et al.*, 2003). V tomto mechanismu je důležitý protein Hap1 (heme activated protein 1), jehož aktivaci zajišťuje molekula hemu. Podle Hona a kolektivu (2003) se na aktivaci Hap1 podílí kromě hemu i kyslík. Hap1 protein je transkripční aktivátor fungující za aerobních podmínek a zároveň se uplatňuje jako represor za stavu hypoxie, jeho aktivační či represní funkce je přepínána na základě přítomnosti nebo nepřítomnosti hemu (Hickman *et Winston*, 2007).

Mechanismus využívající hem jako senzor pro vnímání koncentrace kyslíku nebyl u *C. neoformans* prokázán, zato proteiny Sre1 a Scp1, které hrají klíčovou roli v adaptaci na hypoxické podmínky u *S. pombe* byly u *C. neoformans* objeveny a zastávají podobnou úlohu (Chang *et al.*, 2007). Stejně jako u *S. pombe* dochází při poklesu hladiny kyslíku ke zpomalení syntézy sterolů a následné aktivaci Sre1 proteinu. U *C. neoformans* byl objeven homolog k savčí proteáze Site-2, která se podílí na štěpení SREBP proteinu u savců, což má za následek jeho aktivaci. U *S. pombe* Site-2 proteáza identifikována nebyla (Chun *et al.*, 2007; Espenshade, 2006).

Dalším důležitým mechanismem, který se společně s dráhou využívající proteiny SREBP, podílí na přizpůsobení se hypoxickým podmínkám, je dráha v níž klíčovou roli hraje histidinová kináza Tco1 (two - component - like). Tato kináza je senzorem, který za nepříznivých okolních podmínek spouští signální dráhu jako odpověď na stresovou situaci. Kinázová signální dráha je zprostředkována přes Hog1 (high osmolarity glycerol) - MAPK (mitogen activated protein kinase) (Chun *et al.*, 2007; Bahn *et al.*, 2006). Ke spouštěcímu mechanismu této dráhy slouží Tco, tedy dvousložkový systém. Skládá se však ze tří částí - první je histidinová kináza (slouží jako senzor), druhá část je Hpt protein (histidine - containing phosphotransfer protein) a třetí částí je regulátor, který spouští MAPK dráhu. Sensorická část pomocí fosforylace aktivuje Hpt protein, přes který dojde k přenosu fosforu na regulátor. Za normálních podmínek je neustálým přenosem fosforu na regulátor aktivace MAPK dráhy inhibována, ale stresová situace inhibuje fosforylační systém a regulátor je hypofosforylován, čímž dochází k interakci ostatních složek signální dráhy a k jejímu spuštění

(Bahn *et al.*, 2006). Tato signální dráha byla u *C. neoformans* identifikována v roce 2005 Bahnem a jeho kolegy.

Chun *et al.* (2007) identifikovali mutanty *C. neoformans* s mutací v genu TCO1. Tito mutanté vykazují mnohem vyšší citlivost k hypoxickým podmínkám a také mají sníženou virulenci. Jejich fenotyp je tedy podobný fenotypu mutantů, kterým chybí gen SRE1. Chun *et al.* (2007) identifikovali tyto mutanté souběžně s Changem *et al.* (2007) a následným srovnáním jednoduchých mutantů s dvojitými prokázali, že SREBPs a Tco1 dráhy fungují paralelně, protože dvojití mutanté jsou na nízkou koncentraci kyslíku mnohem citlivější. Mutanté s nízkou patogenitou a vysokou citlivostí na nedostatek kyslíku však nejsou nijak oslabeni v růstu, na YNB médiu (za normoxických podmínek) rostou srovnatelně jako kmeny nemutované (Chun *et al.*, 2007).

Podle zatím provedených pokusů jsou Sre1 a Tco1 prvními objasněnými součástmi v mechanismu kryptokokové adaptace na hypoxii. Další pokusy by mohly vést k lepšímu porozumění mechanismu adaptace a objasnění toho, zda jsou tyto dvě dráhy jediné, které se na adaptaci na hypoxii u *C. neoformans* podílejí.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

Experimenty byly prováděny s kmenem *Cryptococcus neoformans* IFM49144 (T46) z Culture Collection of the Medical Mycology Research Center, Chiba University, Chiba, Japan.

4.2 Seznam použitých chemikálií

- NaCl (Lachema)
- KCL (Lachema)
- Na₂HPO₄ (Lachema)
- KH₂PO₄ (Lachema)
- FeSO₄ x 7 H₂O (Penta)
- Albumin (ICN Biomedicals)
- Lidské sérum
- Kvasničný extrakt (Himedia)
- Mykologický pepton (Himedia)
- D - Glukóza (Lach - Ner)
- RPMI 1640 (Sigma Aldrich)
- MOPS (Applichem)
- Chloramfenikol (Sigma Aldrich)
- Thiamin B (Sigma Aldrich)
- Destilovaná voda
- Deionizovaná voda
- NaOH (Lach - Ner)
- HCl (Lach - Ner)
- Bakteriologický agar (Oxoid)

4.3 Seznam použitých roztoků a medií

- **PBS (pH = 7, 4)**

NaCl	0,8 g
KCl	0,02 g
Na ₂ HPO ₄	0,144 g
KH ₂ PO ₄	0,024 g

- **Roztok FeSO₄ x 7 H₂O**

FeSO ₄	0,834 mg
Destilovaná voda	1000 ml

- **Roztok Bovine serum - albuminu**

Albumin	4,4 g
Destilovaná voda	100 ml

- **YPG médium**

Kvasničný extrakt	10 g
Mykologický pepton	10 g
Glukóza	10 g
Destilovaná voda	1000 ml

- **RPMI 1640 médium s 0,1% roztokem glukózy**

RPMI 1640	8,4 g
MOPS	34,5 g
1M NaOH	80 - 90 ml
D - glukóza	1 g
Deionizovaná voda	1000 ml

- **RPMI 1640 médium s 1% roztokem glukózy**

RPMI 1640	8,4 g
MOPS	34,5 g
1M NaOH	80 - 90 ml

D - glukóza	10 g
Deionizovaná voda	1000 ml

- **RPMI 1640 médium s 1% / 0,1% roztokem glukózy a PBS**

RPMI 1640 s 1% / 0,1% D - glukózou	10 ml
10x koncentrovaný roztok PBS	10 ml
Destilovaná voda	80 ml

- **RPMI 1640 médium s 1% / 0,1% roztokem glukózy, PBS a $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$**

RPMI 1640 s 1% / 0,1% D - glukózou	10 ml
10x koncentrovaný roztok PBS	10 ml
10x koncentrovaný roztok $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	10 ml
Destilovaná voda	70 ml

- **RPMI 1640 médium s 1% / 0,1% roztokem glukózy, PBS, $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ a 0,3% koncentrace agaru**

RPMI 1640 s 1% / 0,1% D - glukózou	10 ml
10x koncentrovaný roztok PBS	10 ml
10x koncentrovaný roztok $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	10 ml
0,3% zásobní roztok agaru	10 ml
Destilovaná voda	60 ml

- **RPMI 1640 médium s 1% / 0,1% roztokem glukózy, PBS, $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ a 0,15% koncentrace agaru**

RPMI 1640 s 1% / 0,1% D - glukózou	10 ml
10x koncentrovaný roztok PBS	10 ml
10x koncentrovaný roztok $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	10 ml
0,15% zásobní roztok agaru	10 ml
Destilovaná voda	60 ml

- **RPMI 1640 médium s 1% / 0,1% roztokem glukózy, PBS, $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,3% koncentrace agaru a albuminu**

RPMI 1640 s 1% / 0,1% D - glukózou	10 ml
------------------------------------	-------

10x koncentrovaný roztok PBS	10 ml
10x koncentrovaný roztok $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	10 ml
0,3% zásobní roztok agaru	10 ml
Albumin	10 ml
Destilovaná voda	50 ml

- **RPMI 1640 médium s 1% / 0,1% roztokem glukózy, PBS, $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,15% koncentrace agaru a albuminu**

RPMI 1640 s 1% / 0,1% D - glukózou	10 ml
10x koncentrovaný roztok PBS	10 ml
10x koncentrovaný roztok $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	10 ml
0,15% zásobní roztok agaru	10 ml
Albumin	10 ml
Destilovaná voda	50 ml

- **RPMI 1640 médium s 1% / 0,1% roztokem glukózy, PBS, $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,3% koncentrace agaru a lidského séra**

RPMI 1640 s 1% / 0,1% D - glukózou	10 ml
10x koncentrovaný roztok PBS	10 ml
10x koncentrovaný roztok $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	10 ml
0,3% zásobní roztok agaru	10 ml
Albumin	10 ml
Lidské sérum	10 ml
Destilovaná voda	40 ml

- **RPMI 1640 médium s 1% / 0,1% roztokem glukózy, PBS, $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,15% koncentrace agaru a lidského séra**

RPMI 1640 s 1% / 0,1% D - glukózou	10 ml
10x koncentrovaný roztok PBS	10 ml
10x koncentrovaný roztok $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	10 ml
0,15% zásobní roztok agaru	10 ml
Albumin	10 ml
Lidské sérum	10 ml
Destilovaná voda	40 ml

4.4 Seznam použitých laboratorních přístrojů a pomůcek

- Sterilní box
- Komorový termostat
- Vodní třepací lázeň Julabo SW 22 (Chemos)
- Centrifuga Spectrafuge 24D (Labnet)
- Centrifuga EBA 12R (HettichZentrifuger)
- Analytické váhy (Boeco)
- Analytické váhy (Vibra)
- Optický mikroskop CX 41 (Olympus)
- Fotoaparát C - 5060 (Olympus)
- pH metr pH elektrode SenTix 41 (Inolab)
- Magnetické míchadlo (JenWay)
- Erlenmeyerovy baňky
- Špičky
- Pipety
- Skleněné pipety 25 ml
- Automatický nástavec na pipety (Hirschmann Laborgerate)
- Mikrozkuřavky Eppendorf
- Petriho misky se Sabouraudovým agarem
- Očkovací kličky
- 24 - jamkové destičky (Iwaki)
- Samolepící fólie (Simport Canada)
- Filtry PowerPhil 25 / 0,2 (Rowemed)
- Podložní sklíčka
- Krycí sklíčka

4.5 Metodika a postupy

4.5.1 Přesnoční buněčná kultura

Pokusy byly zakládány z přesnoční kultury získané naočkováním 10 ml tekutého YPG média ve sterilní 100ml Erlenmeyerově baňce 1 - 3 koloniemi *C. neoformans* a kultivované ve

vodní třepací lázni při 37 °C a 140 kmitech za minutu. Do přesnoční kultury bylo přidáváno 10 µl thiaminu B a 20 µl chloramfenikolu. Chloramfenikol sloužil jako prevence bakteriální kontaminace a thiamin B podporoval růst buněk *C. neoformans* za přítomnosti chloramfenikolu. YPG médium bylo zaočkováno jednou kolonií rostoucí na Sabouraudově agaru.

4.5.2 RPMI 1640 médium

RPMI 1640 médium (Roswell Park Memorial Institute 1640 medium) bylo vyvinuto v roce 1966 Moorem a jeho kolektivem v Roswell Park Memorial Institutu v USA. Toto médium se využívá při podpoře růstu mnoha typů buněčných kultur. Nejčastěji se používá pro kultivaci humánních normálních a neoplastických leukocytů a svým složením napodobuje vnitřní prostředí savčího organismu. Ve své práci jsem toto médium použila pro kultivaci buněk *C. neoformans* a objasnění adaptace jeho buněk na hypoxické podmínky v lidské tkáni, protože je svým složením mnohem bližší podmínkám lidské tkáně ve srovnání k tradičním mikrobiologickými kultivačními médii.

Po smíchání RPMI (dodávané firmou Sigma - Aldrich) a MOPS byl roztok přefiltrován a poté se k němu přidával 10x koncentrovaný zásobní roztok 0,1% či 1% glukózy, který byl před přidáním 15 minut autoklávován. Následně se pomocí pH metru upravovalo pH na 7, 0. K takto připravenému kultivačnímu médiu byla pipetována přesnoční kultura dle následující tabulky č. 1.

Kultivace buněčné suspenze probíhala ve 24 - jamkových destičkách dodávaných firmou Iwaki přelepené adhezní folií (Simport Canada) s minimální propustností kyslíku (méně než 0,01 %) v komorovém termostatu při 37 °C. Na základě analogie s publikovanými daty lze předpokládat, že v jamkách, kde byl objem média 800 µl a více, nastával stav výrazné hypoxie. Objem média 200 µl zajišťoval stav normoxie, objem média 400 µl pak stav mírné hypoxie. Buněčná suspenze v jamce, která byla již jednou otevřena, nebyla dále používána z důvodu provzdušnění kultury v jamce.

Tabulka č. 1: Použité objemy RPMI média a přesnoční kultury

Objem média [μl]	Objem přesnoční kultury [μl]
200	10
400	20
800	40
1 600	80

4.5.3 Charakterizace odpovědi *C. neoformans* na hypoxii při různých úrovních aerace a různém složení kultivačního média

Buňky *C. neoformans* byly kultivovány ve 24 - jamkových destičkách v objemech, které jsou uvedeny v předchozí kapitole (kapitola 4.5.2). Kultivace probíhala za minimálního přístupu vzduchu, za konstantní teploty (37 °C) a bez třepání v komorovém termostatu. Minimální přístup vzduchu zajišťovala adhezní fólie (Simport Canada) přelepená přes 24 - jamkovou destičku (propustnost kyslíku méně než 0,01 %). Kultivace probíhala v médiu RPMI 1640, které bylo postupně obohacováno o další složky, tak aby docházelo ke změně parametrů média, které by mohly mít vliv na proliferaci buněk, na charakter kultury nebo na morfologii buněk v podmínkách různého stupně aerace.

Jednotlivé vyhodnocování pokusu probíhalo ve třech časových intervalech, a to po třech, pěti a sedmi dnech od založení pokusu. Reakce na hypoxii byla charakterizována na základě velikosti buněk *C. neoformans*.

Celý objem jamky byl odpipetován do mikrozkuřavky typu Eppendorf a poté centrifugován na centrifuze Spectrafuge 24D (Labnet) po dobu 2 minut při 4000 g. Supernatant byl z mikrozkuřavky odstraněn tak, aby zůstal pouze sediment, který byl následně v malém množství RPMI média (20 μl) resuspendován. Poté bylo 15 μl buněčné suspenze odebráno a byl vytvořen preparát, ten byl dále pozorován pod optickým mikroskopem Olympus CX 41 a byly zhotoveny fotografie (fotoaparát Olympus C - 5060).

Průměr buněk na fotografiích byl následně vyhodnocován prostřednictvím programu ImageJ (National Institutes of Health). Bylo měřeno vždy nejméně 50 buněk, byl spočítán průměr a směrodatná odchylka a rozdíly mezi velikostmi buněk kultivovaných za různých podmínek a po různou dobu byly vyhodnocovány Studentovým t - testem. T- test byl

prováděn pomocí funkce v MS Excel 2007 dvojvýběrovým testem s nerovností rozptylů, s dvoustranným rozdělením. Výsledky byly zohledňovány vůči příslušné tabulce kritických hodnot Studentova t- testu.

5 VÝSLEDKY

V experimentální části diplomové práce došlo k otestování vlivu různých parametrů kultivačního média na morfologii buněk a charakter celé kultury v podmínkách různého stupně aerace, představovaného čtyřmi odlišnými objemy buněčné suspenze kultivované ve 24 - jamkových destičkách (objem jamek použitých destiček je 3, 4 ml). Zamezení přístupu vzduchu do jamek s buněčnou suspenzí bylo dosaženo použitím adhezní fólie, jejíž propustnost kyslíku je menší než 0,01%. Destičky s přelepenou adhezní fólií byly použity na základě předchozích experimentů, kde se pro kultivaci buněk používaly Erlemeyerovy baňky s vatovými zátkami, které neposkytovaly dostatečnou zábranu proti pronikání vzduchu a provzdušňování buněčné kultury. Kultivace probíhala za konstantní teploty v komorovém termostatu (37 °C) a bez třepání, tak aby byly nejlépe napodobeny podmínky v lidské tkáni.

V experimentu použité objemy měly simulovat stavy normoxie, mírné hypoxie a výrazné hypoxie. Stav výrazné hypoxie nastával v jamkách, kde byl objem média 800 µl a 1600 µl. Objem média 200 µl zajišťoval stav normoxie, objem média 400 µl pak stav mírné hypoxie.

Výchozím testovacím médiem bylo médium RPMI 1640, které bylo postupně obohacováno o další složky, aby docházelo ke změně parametrů média. K RPMI médiu byl nejprve přidán 10x koncentrovaný 0,1% a 1% roztok glukózy, tak, že byly získány dva druhy kultivačního média: RPMI s 0,1% roztokem glukózy a RPMI s 1% roztokem glukózy. Poté byl k oběma médiím přidán 10x koncentrovaný roztok PBS, aby došlo k úpravě pH. Následně byl do médií přidán 10x koncentrovaný roztok heptahydrátu síranu železnatého ($\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$). Dalším krokem byla úprava viskozity média přidávkou agaru. Pro další pokusy byly použity dvě koncentrace viskozity média, jedna taková, aby viskozita média byla mírná a druhá koncentrace poloviční k první, tedy roztok média s 0,3% koncentrací agaru a roztok s 0,15% koncentrací. Posledním krokem úpravy kultivačního média byl přidávek séra. K roztoku byl přidán nejprve hovězí sérový albumin a poté sérum lidské. Ve všech těchto médiích byly kultivovány buňky za stejných podmínek po stejně dlouhou dobu.

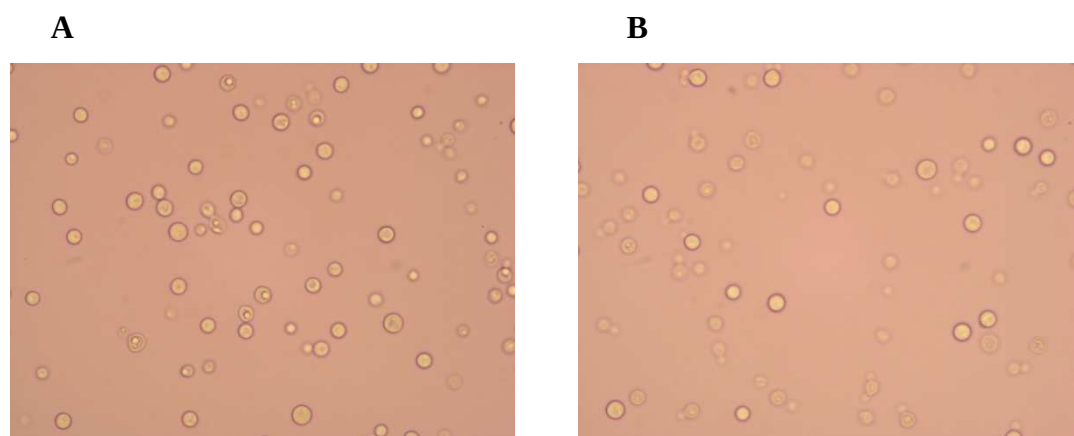
Vyhodnocování pokusu probíhalo ve třech časových intervalech, a to po třech, pěti a sedmi dnech od založení pokusu. Reakce na hypoxii byla charakterizována velikostí buněk *C. neoformans*. Tyto údaje byly získány pozorováním mikroskopických preparátů a následným vyhodnocením fotografií získaných z pozorování těchto preparátů analytickým programem ImageJ a statistickou metodou Studentova T- testu. Pro správnou statistickou analýzu bylo

nutné, aby se na fotografiích nacházelo více než 50 buněk, průměrně však na jeden použitý objem bylo vyhodnocováno 300 - 400 buněk.

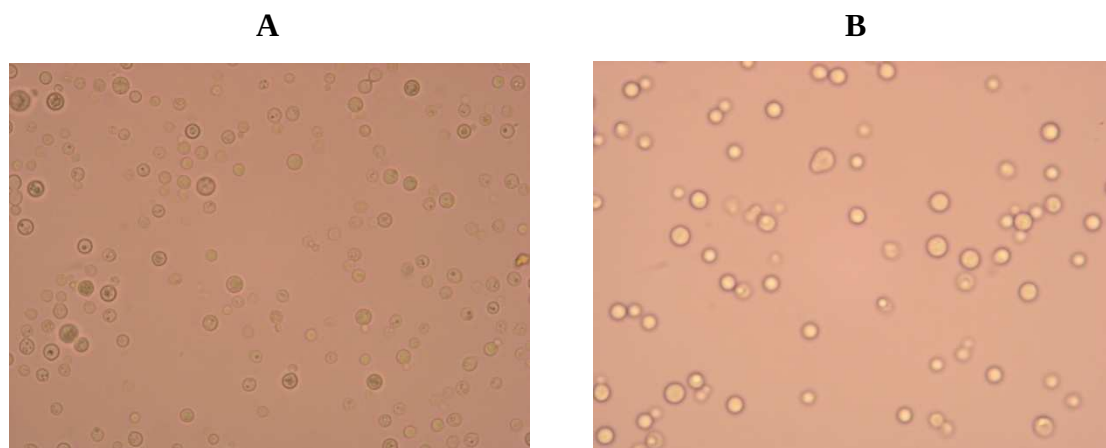
5.1 Vyhodnocení kultivace buněk *C. neoformans* v médiu RPMI 1640 s 1% a 0,1% glukózou

Mikroskopickou analýzou bylo nejprve zjištěno, že buňky kultivované v médiu s 1% hladinou glukózy byly na pohled větší než buňky kultivované v médiu s nižším obsahem glukózy a nejvíce se jich nacházelo v jamkách o objemu 400 μ l a 800 μ l buněčné suspenze (zobrazeno na obrázcích č. 3 a 4). Tento pozorovaný předpoklad byl následně potvrzen analýzou fotografií programem ImageJ a statistickým zjištěním průměrů velikostí pozorovaných buněk.

Největší buňky byly zjištěny v objemu 800 μ l v médiu obohaceném o 1% roztok glukózy po třech dnech kultivace, průměrná velikost byla 6,251525 μ m. Největší velikost buněk v médiu s 0,1% hladinou glukózy byla naměřena v objemu 400 μ l, 5,52987 μ m. Nejmenším zjištěný průměr 4,499848 μ m byl po sedmi dnech kultivace v jamce s objemem buněčné suspenze 200 μ l kultivačního média s 0,1% hladinou glukózy. Podle zjištěných dat lze usuzovat, že 1% hladina glukózy v médiu zajišťuje lepší výživu než médium s nižším obsahem glukózy a buňky dosahují větších velikostí. Graf č. 1 znázorňuje zjištěné průměry, jak v médiu s 1% hladinou glukózy, tak v médiu s 0,1% roztokem glukózy.

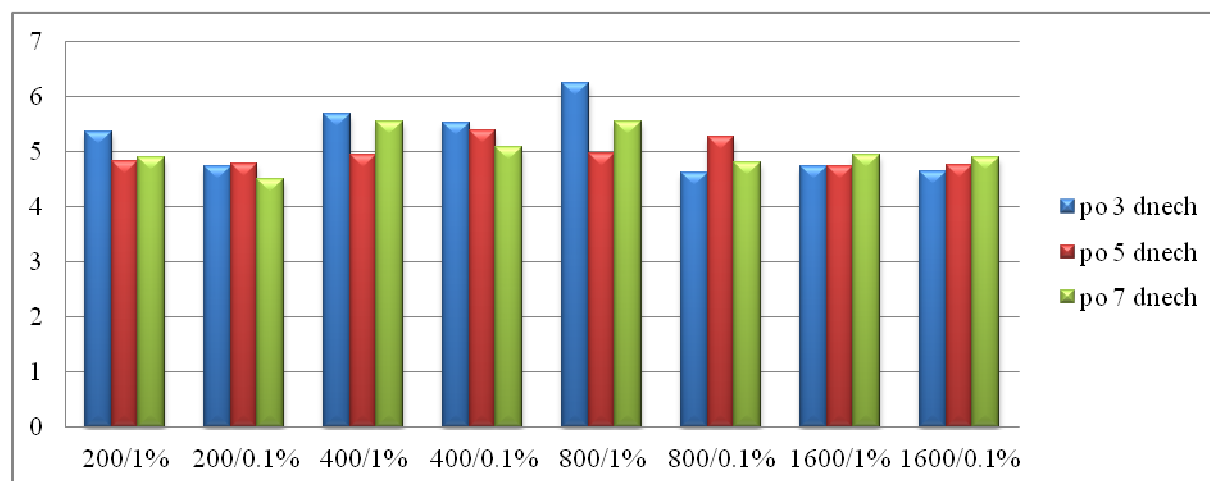


Obrázek č. 3: Porovnání velikostí buněk v objemu 400 μ l. A - kultivované buňky v RPMI médiu s 1% hladinou glukózy; B - kultivované buňky v RPMI médiu s 0,1% hladinou glukózy.



Obrázek č. 4: Porovnání velikostí buněk v objemu 800 μ l. A - kultivované buňky v RPMI médiu s 1% hladinou glukózy; B - kultivované buňky v RPMI médiu s 0,1% hladinou glukózy.

Graf č. 1: Zjištěné průměry velikostí buněk v RPMI médiu s 1% obsahem glukózy a 0,1% obsahem glukózy.



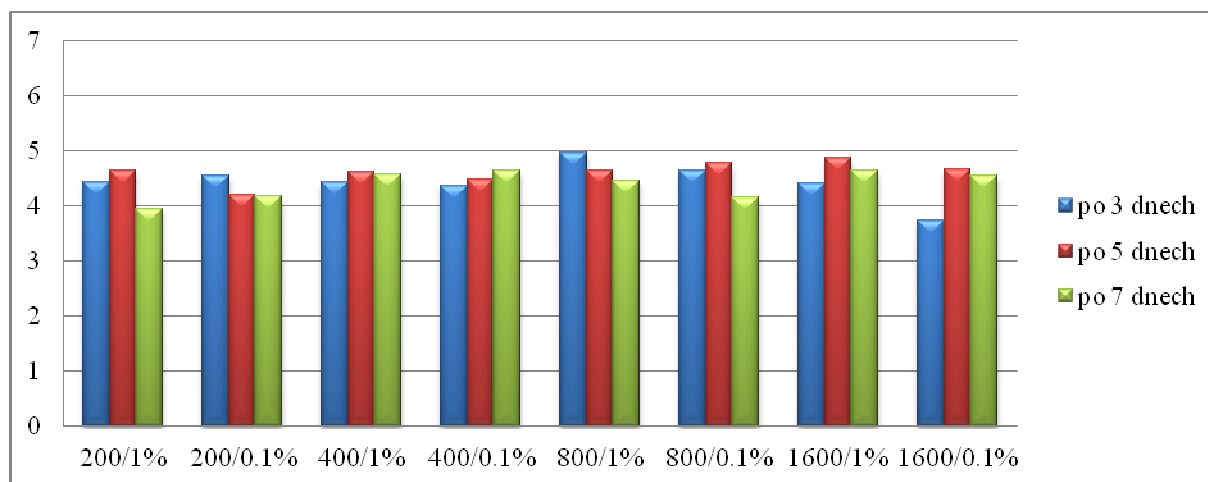
Pozn.: Na ose x jsou znázorněny objemy buněčné suspenze v médiích s různým obsahem glukózy. Na ose y jsou znázorněny průměry buněk v μ m. Velikosti buněk byly získány z analyzovaných fotografií.

5.2 Vyhodnocení kultivace buněk *C. neoformans* v médiu RPMI 1640 s 1% a 0,1% glukózou a pufrované PBS

Analýza fotografií buněk kultivovaných v médiích pufrovaných PBS odhalila, že nedocházelo k výrazným rozdílům velikostí buněk v rámci všech použitých objemů a v rámci doby kultivace. Podobně jako u kultivace buněk v médiu, které nebylo pufrováno, největší velikosti dosahovaly buňky v objemu 800 μ l po třech dnech kultivace, 4,961974 μ m. Nejmenší velikost buněk byla zjištěna v objemu 1600 μ l (RPMI médium s 1% obsahem

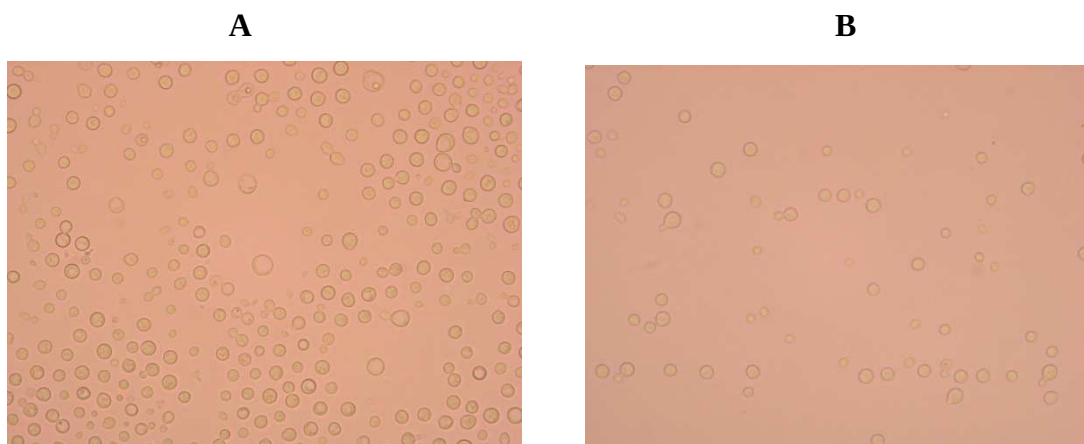
glukózy a PBS) po třech dnech kultivace, 3,728723 μm . Porovnání všech zjištěných průměrů velikostí buněk zobrazuje graf č. 2.

Graf č. 2: Zjištěné průměry velikostí buněk v RPMI médiu s 1% obsahem glukózy a PBS a 0,1% obsahem glukózy a PBS.



Pozn.: Na ose x jsou znázorněny objemy buněčné suspenze v médiích s různým obsahem glukózy a přidavkem PBS. Na ose y jsou znázorněny průměry buněk v μm . Velikosti buněk byly získány z analyzovaných fotografií.

Na následující sérii obrázků č. 5 je zobrazen rozdílný vliv dvou kultivačních médií na velikost buněk u objemu 400 μl v médiu s 1% roztokem glukózy a PBS.

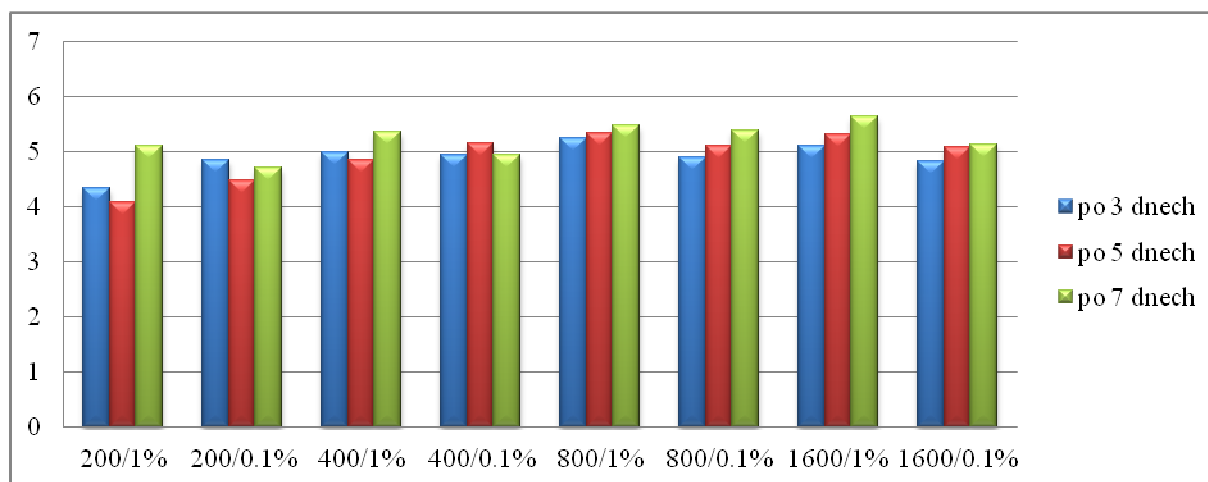


Obrázek č. 5: Porovnání velikostí buněk v objemu 400 μl . A - kultivované buňky v RPMI médiu s 1% hladinou glukózy a roztokem PBS po sedmi dnech kultivace; B - kultivované buňky v RPMI médiu s 0,1% hladinou glukózy a roztokem PBS po pěti dnech kultivace.

5.3 Vyhodnocení kultivace buněk *C. neoformans* v médiu RPMI 1640 s 1% a 0,1% glukózou, pufované PBS a obohacené železem

Nejvýraznějších velikostí dosahovali buňky kultivované v médiu s přidavkem železa v podobě $\text{FESO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ (v porovnání s ostatními kultivačními médii). Největší byly buňky v objemech 800 a 1600 μl , obojí v kultivačním médiu s 1% hladinou glukózy, pufované PBS a s přidavkem železa. V obou těchto objemech velikost buněk přesahovala 5 μm . Nejmenší velikosti byly zaznamenány v objemu 200 μl v obou typech kultivačního media. Zde se velikost buněk pohybovala kolem 4, 5 μm . Největší velikost 5,63911 μm byla nalezena v objemu 1600 μl v médiu s 1% hladinou glukózy, pufované PBS a s přidavkem železa po sedmi dnech kultivace, naopak nejmenší velikost byla zaznamenána u 200 μl v médiu s 1% hladinou glukózy, pufované PBS a s přidavkem železa po pěti dnech kultivace, a to 4,085793 μm . Na grafu č. 3 jsou rozdíly v průměrech velikostí znázorněny.

Graf č. 3: Zjištěné průměry velikostí buněk v RPMI médiu s 1% / 0,1% obsahem glukózy a přidavkem PBS a $\text{FESO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$.



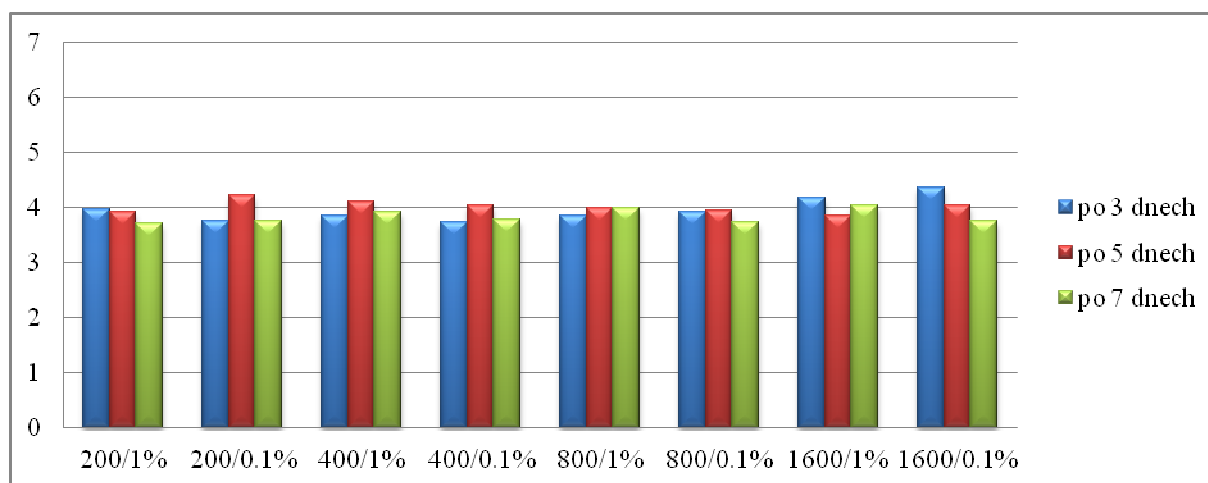
Pozn.: Na ose x jsou znázorněny objemy buněčné suspenze v médiích s různým obsahem glukózy a přidavkem PBS a železa. Na ose y jsou znázorněny průměry buněk v μm . Velikosti buněk byly získány z analyzovaných fotografií.

5.4 Vyhodnocení kultivace buněk *C. neoformans* v médiu RPMI 1640 s 1% a 0,1% glukózou, pufrované PBS, s přídatkem železa a viskozitou upravenou přídatkem agaru

Přidáním roztoků agaru ke kultivačním médiím došlo k úpravě viskozity. Dvě koncentrace byly použity proto, aby vzniklo médium mírně viskózní a pro srovnání vlivu agaru ještě koncentrace poloviční. Výrazné rozdíly velikostí buněk mezi jednotlivými koncentracemi agaru zaznamenány nebyly, u obou typů medií se velikost buněk pohybovala na hranici 4 μm . V porovnání předchozích kultivačních medií s těmi obohacenými o agar došlo v této kultivaci k výraznému zmenšení buněk, statistická významnost byla následně potvrzena provedeným Studentovým T - testem, jehož podrobné výsledky jsou prezentovány v kapitole 5.7.

V médiu s agarem o koncentraci 0,3% byly buňky největší v objemu 1600 μl . Naopak nejmenší velikosti dosahovaly buňky v objemu 200 μl . V médiu obohaceném o 0,15% koncentraci agaru byla velikost buněk nepatrně větší než v médiu s koncentrací 0,3%, největší buňky byly také zaznamenány v objemu 1600 μl , nejmenší pak v objemu 200 μl . V porovnání těchto dvou medií byly největší buňky pozorovány v RPMI médiu s 1% hladinou glukózy a 0,15% hladinou agaru po pěti dnech kultivace, a to 4,5785 μm . Nejmenší velikost, 3,33122 μm , byla pozorována v tomtéž médiu po sedmi dnech kultivace. Průměrné velikosti buněk v obou médiích zachycují grafy č. 4 a 5.

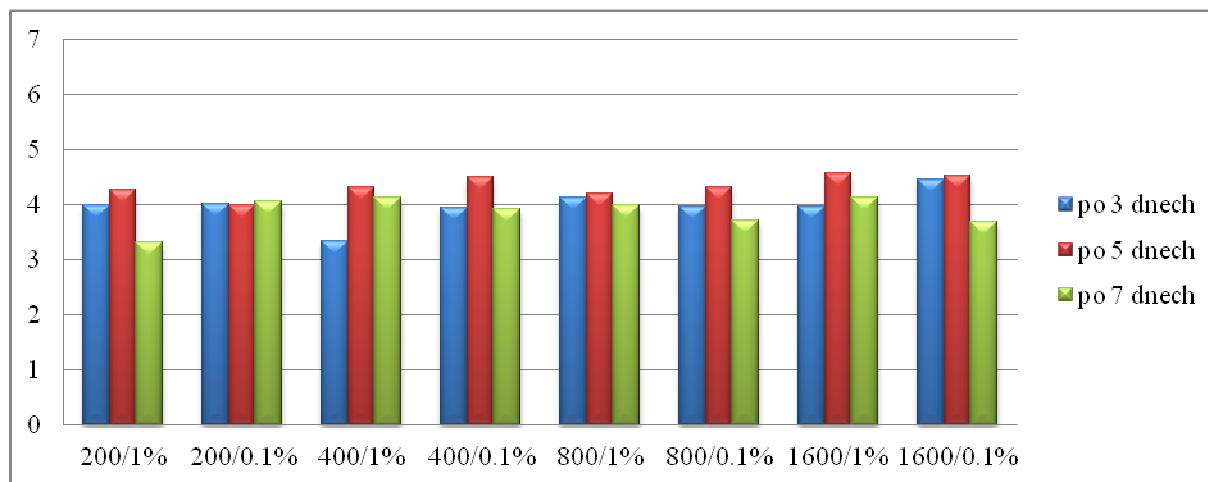
Graf č. 4: Zjištěné průměry velikostí buněk v RPMI médiu s 1% / 0,1% obsahem glukózy a přídatkem PBS, $\text{FESO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ a 0,3% roztoku agaru.



Pozn.: Na ose x jsou znázorněny objemy buněčné suspenze v médiích s různým obsahem glukózy a přídatkem

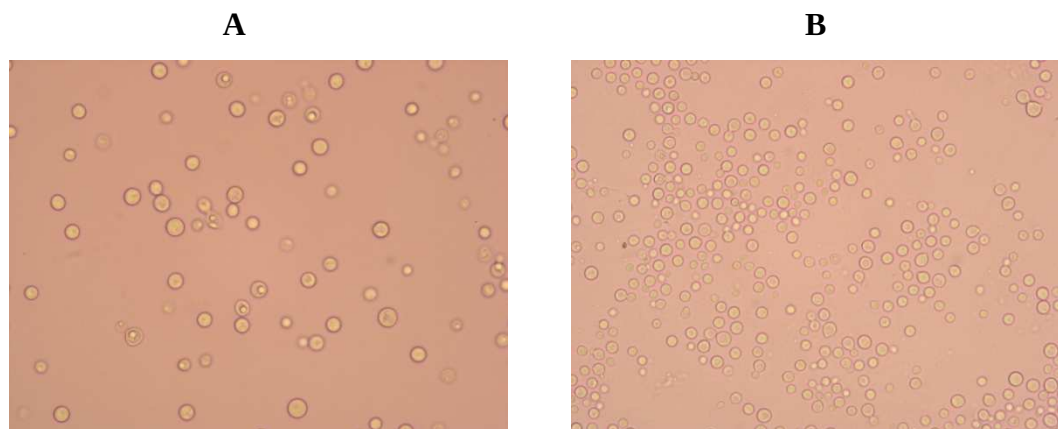
PBS, železa a agaru. Na ose y jsou znázorněny průměry buněk v μm . Velikosti buněk byly získány z analyzovaných fotografií.

Graf č. 5: Zjištěné průměry velikostí buněk v RPMI médiu s 1% / 0,1% obsahem glukózy a přidavkem PBS, $\text{FESO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ a 0,15% roztoku agaru.

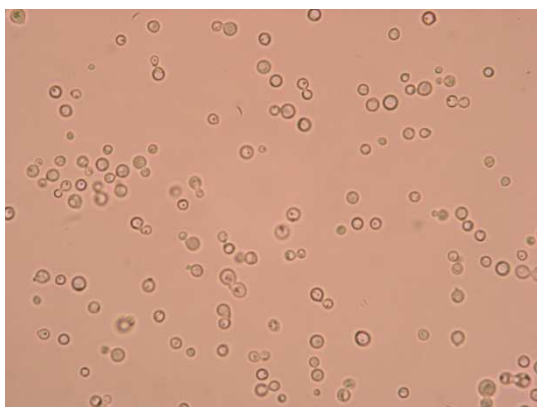


Pozn.: Na ose x jsou znázorněny objemy buněčné suspenze v médiích s různým obsahem glukózy a přidavkem PBS, železa a agaru. Na ose y jsou znázorněny průměry buněk v μm . Velikosti buněk byly získány z analyzovaných fotografií.

Vliv agaru na velikost a počet buněk je patrný ze série obrázků č. 6. Na fotografii A jsou buňky kultivované v objemu 400 μl pouze v médiu RPMI s 1% obsahem glukózy, na fotografii B je zobrazen tentýž objem i médium po přidavku 0,3% roztoku agaru, na fotografii C je zachycen rovněž stejný objem i médium po přidání 0,15% roztoku agaru. Z fotografií je patrné, že přidavkem agaru, ať už vyšší či nižší koncentrace, se velikost buněk zmenšila, což dokazují i data uvedená v předchozích grafech.



C

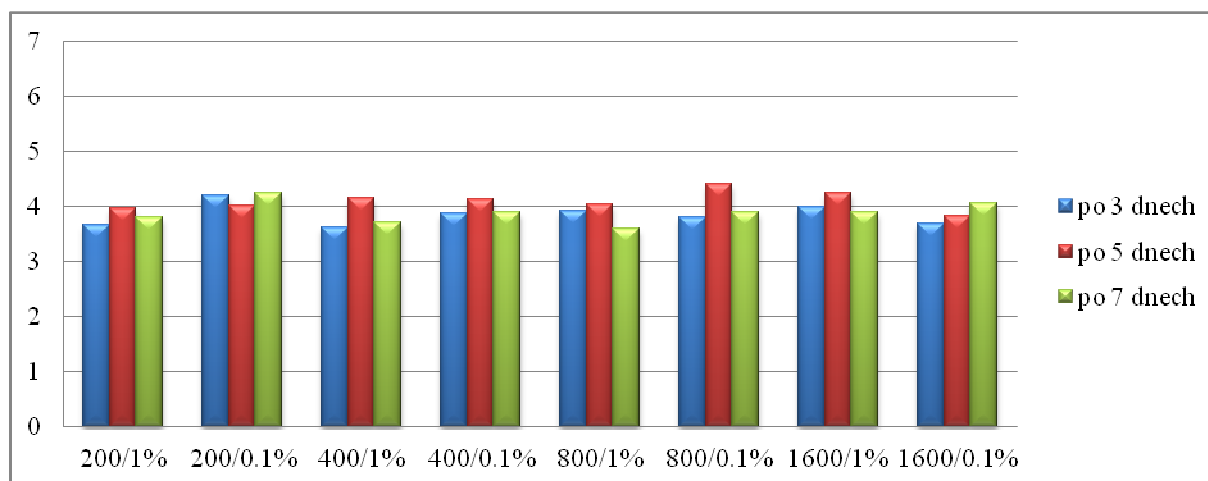


Obrázek č. 6: Porovnání velikostí buněk v objemu 400 μ l. A - kultivované buňky v RPMI médiu s 1% hladinou glukózy; B - kultivované buňky v RPMI médiu s 1% hladinou glukózy a 0,3% hladinou agaru; C - kultivované buňky v RPMI médiu s 1% hladinou glukózy a 0,15% hladinou agaru.

5.5 Vyhodnocení kultivace buněk *C. neoformans* v médiu RPMI 1640 s 1% a 0,1% glukózou, pufrované PBS, obohacené o železo, s viskozitou upravenou agarem a s přidavkem hovězího sérového albuminu

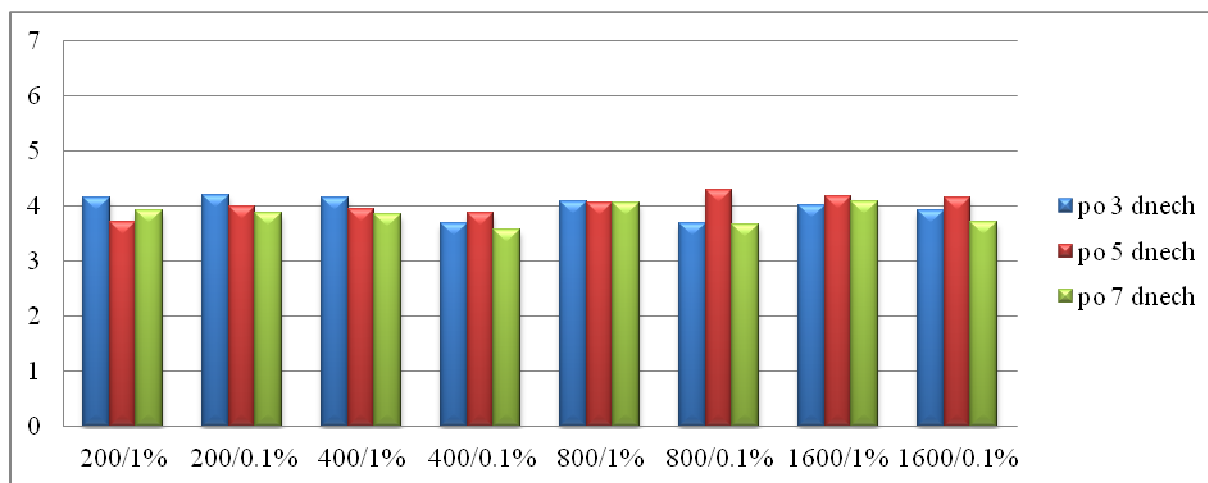
S přidáním agaru do kultivačních médií došlo ke zmenšení kultivovaných buněk a ani přidáním albuminu k navýšení průměrných velikostí buněk nedošlo. Podobně jako v předchozí kapitole byla velikost buněk okolo 4 μ m. Nejmenší velikost byla zachycena v objemu 400 μ l kultivačního média s 0,1% hladinou glukózy a 0,15% hladinou agaru po sedmi dnech kultivace, a to 3,565263 μ m. Největší velikosti dosahovaly buňky kultivované v médiu s 0,1% hladinou glukózy a 0,3% hladinou agaru v jamce o objemu 800 μ l po pěti dnech kultivace, 4,411337 μ m. V porovnání s ostatními médii zde došlo ke změně, v předchozích pokusech buňky dosahovaly největší velikosti v objemech 400 μ l a nejmenší velikosti v objemech 200 μ l, přidáním albuminu se největší buňky nachází v objemu 800 μ l, tedy objemu simulující stav výrazné hypoxie, a nejmenší buňky jsou v objemu 400 μ l, simulující stav mírné hypoxie. Grafy zachycující změnu v průměrných velikostech buněk kultivovaných médií s albuminem jsou označeny čísly 6 a 7.

Graf č. 6: Zjištěné průměry velikostí buněk v RPMI médiu s 1% / 0,1% obsahem glukózy a přidavkem PBS, $\text{FESO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,3% roztoku agaru a přidavkem albuminu.



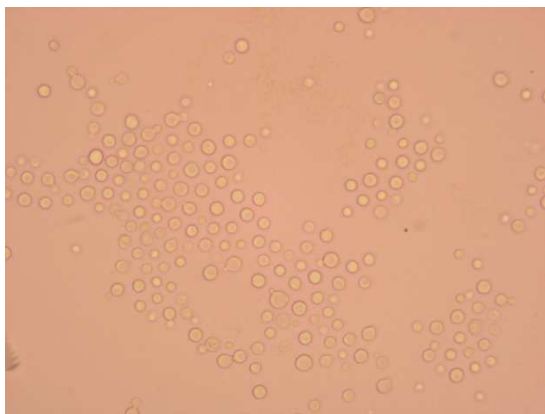
Pozn.: Na ose x jsou znázorněny objemy buněčné suspenze v médiích s různým obsahem glukózy a přidavkem PBS, železa, agaru a albuminu. Na ose y jsou znázorněny průměry buněk v μm . Velikosti buněk byly získány z analyzovaných fotografií.

Graf č. 7: Zjištěné průměry velikostí buněk v RPMI médiu s 1% / 0,1% obsahem glukózy a přidavkem PBS, $\text{FESO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,15% roztoku agaru a přidavkem albuminu.



Pozn.: Na ose x jsou znázorněny objemy buněčné suspenze v médiích s různým obsahem glukózy a přidavkem PBS, železa, agaru a albuminu. Na ose y jsou znázorněny průměry buněk v μm . Velikosti buněk byly získány z analyzovaných fotografií.

Na analyzovaných fotografiích bylo možné pozorovat růst buněk ve shlucích (zobrazeno na obrázku č. 7). To může být dáno tím, že vyšší koncentrace agaru a zároveň přítomnost albuminu, účinněji bránila pasivnímu pohybu buněk v médiu.

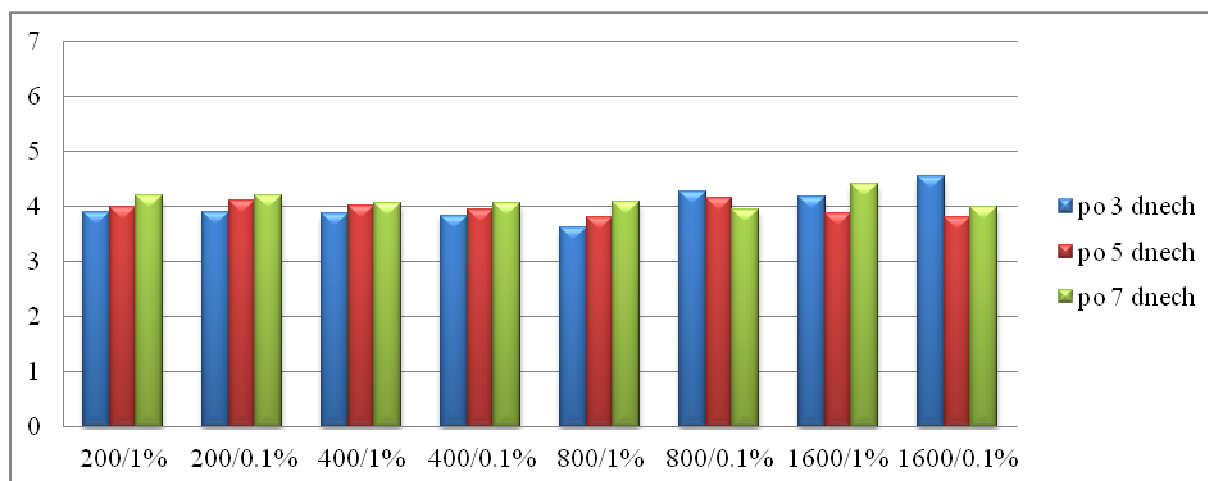


Obrázek č. 7: Shluky buněk vytvořené po přidání albuminu k RPMI médiu s 1% roztokem glukózy, PBS, železem a 0,3% roztokem agarů (objem 400 μ l po sedmi dnech kultivace).

5.6 Vyhodnocení kultivace buněk *C. neoformans* v médiu RPMI 1640 s 1% a 0,1% glukózou, pufrované PBS, obohacené o železo, s viskozitou upravenou agarem a s přidavkem hovězího sérového albuminu a lidského séra

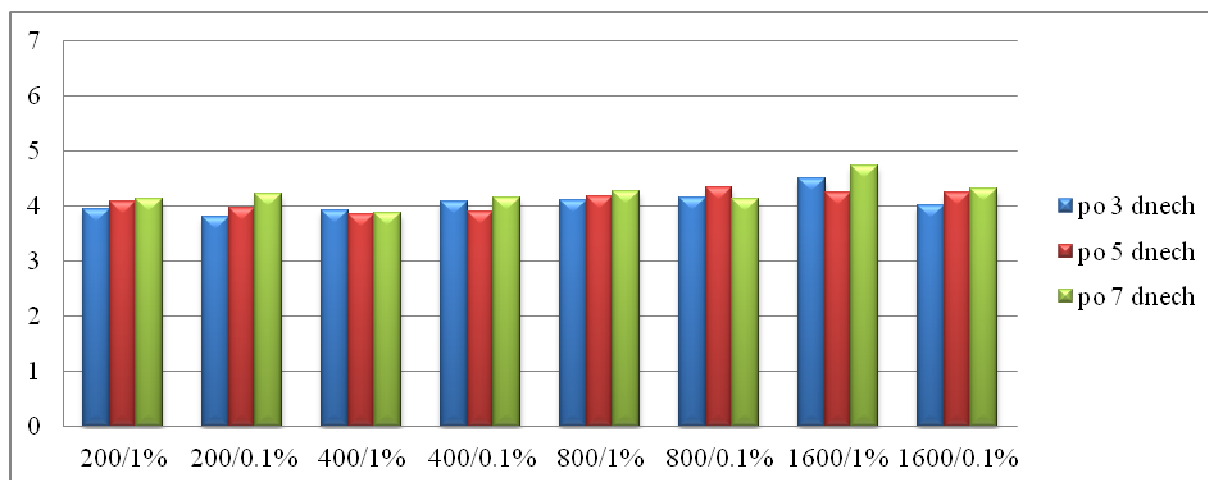
Ani po přidavku lidského séra nedošlo u průměrných velikostí buněk ke zvětšení, můžeme tedy usuzovat, že snížení průměrných velikostí buněk způsobuje právě přidání agarů ke kultivačnímu médiu. Velikost buněk zůstala téměř shodná s velikostí buněk kultivovaných v médiu, které bylo obohaceno agarem. Stejně jako v předchozích kapitolách se velikost buněk pohybovala kolem hodnoty 4 μ m. Největší buňky jsou zaznamenány v objemech 1600 μ l, jak u média s 0,3% koncentrací agarů, tak u média s koncentrací nižší. Podobně jako u předchozího média, největší buňky se vyskytují v objemu reprezentujícím stav výrazné hypoxie. Největší hodnota byla zaznamenána v daném objemu v médiu s 0,1% obsahem glukózy a 0,3% obsahu agarů po třech dnech kultivace, a sice 4,553107 μ m. Nejmenší velikost dosahovaly buňky kultivované v médiu s 1% hladinou glukózy a 0,3% hladinou agarů po pěti dnech kultivace v objemu 800 μ l, 3,80654 μ m. Průměrné velikosti buněk jsou zaznamenány v následujících dvou grafech.

Graf č. 8: Zjištěné průměry velikostí buněk v RPMI médiu s 1% / 0,1% obsahem glukózy a přidavkem PBS, $\text{FESO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,3% roztoku agaru a přidavkem albuminu a lidského séra.



Pozn.: Na ose x jsou znázorněny objemy buněčné suspenze v médiích s různým obsahem glukózy a přidavkem PBS, železa, agaru, albuminu a lidského séra. Na ose y jsou znázorněny průměry buněk v μm. Velikosti buněk byly získány z analyzovaných fotografií.

Graf č. 9: Zjištěné průměry velikostí buněk v RPMI médiu s 1% / 0,1% obsahem glukózy a přidavkem PBS, $\text{FESO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,15% roztoku agaru a přidavkem albuminu a lidského séra.



Pozn.: Na ose x jsou znázorněny objemy buněčné suspenze v médiích s různým obsahem glukózy a přidavkem PBS, železa, agaru, albuminu a lidského séra. Na ose y jsou znázorněny průměry buněk v μm. Velikosti buněk byly získány z analyzovaných fotografií.

5.7 Výsledky statistického vyhodnocení dat prostřednictvím Studentova T - testu

Statistické hodnocení výsledků metodou T - testu bylo nejprve prováděno pomocí funkce v MS Excel 2007 dvojvýběrovým testem s nerovností rozptylů, s dvoustranným rozdělením. Po tomto provedeném výpočtu byla nalezena data o velmi vysoké hladině

významnosti ($P < 0,01$), která potvrzují předpoklady z porovnávání průměrných velikostí buněk.

Statisticky nejvýznamněji se projevil přídavek agaru (statisticky nejvýznamnější hodnota nalezena po sedmi dnech kultivace v objemu 400 μ l v médiu obohaceném o 1% hladinu glukózy a 0,3% hladinu agaru, a to $p = 2,22301^{E-58}$), jelikož po jeho přidání kultivované buňky vykazovaly značně menší velikost než v kultivacích bez agaru. Statistická významnost tohoto přídatku je na 1% hladině významnosti. V kultivacích prováděných po přidání albuminu a lidského séra nedošlo k žádné výrazné změně, velikosti buněk zůstaly téměř shodné s velikostmi buněk kultivovaných v médiu s agarem.

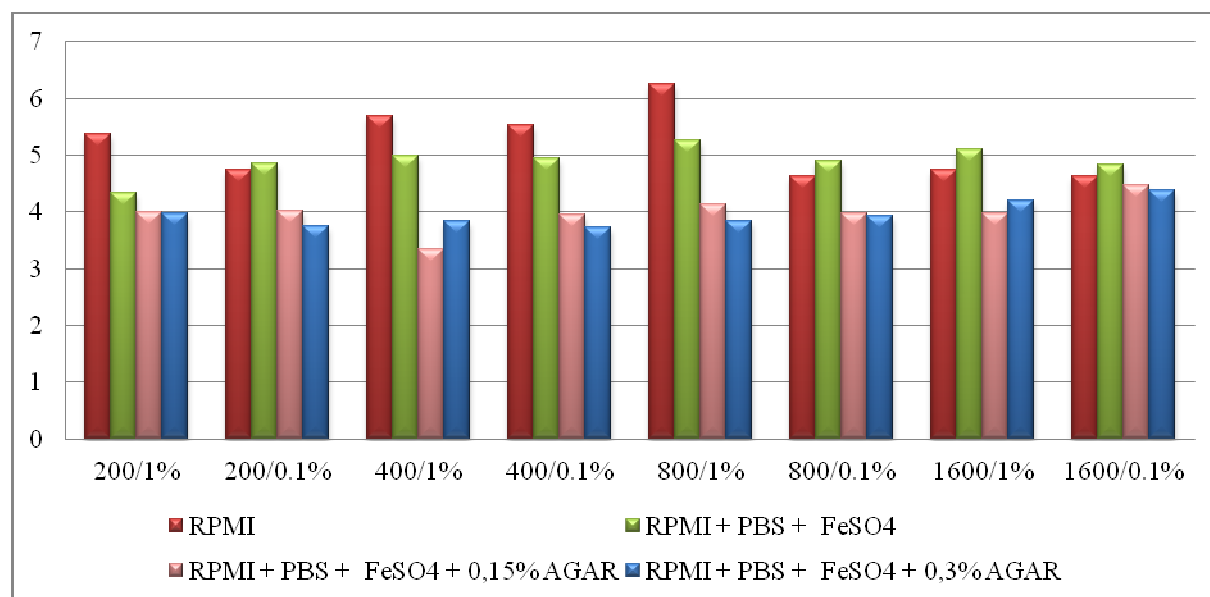
Mezi statisticky významné hodnoty se zařadila kultivace v médiích obohacených o glukózu a také přídavek železa (ve formě 10x koncentrovaného roztoku $\text{FESO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$). Přídavek PBS nezpůsobil v porovnání s kultivací v médiu RPMI obohaceném pouze o glukózu žádné změny, průměrné velikosti buněk zůstaly u porovnávaných medií téměř shodné. Výraznější změnu kultivace přineslo přidání roztoku $\text{FESO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$. V porovnání s médiem s roztokem PBS došlo k nárůstu průměrných velikostí buněk. Tato změna ve složení kultivačního média (přídavek PBS a železa) se nachází na 1% hladině významnosti. Vzájemné porovnávání statisticky nejvýznamnějších hodnot v rámci počtu dnů kultivace, tedy experimenty provedené v médiu s 1% a 0,1% roztokem glukózy, v médiu obohaceném o PBS a zároveň o roztok $\text{FESO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ a v médiu obohaceném o agar, zobrazují grafy č. 10, 11 a 12. Grafy uvádí změny v naměřených průměrných velikostech v odlišných typech kultivačních medií, kde byla tato změna statisticky nejvýznamnější, v daných objemech a počtech dnech, po kterých byla kultivace vyhodnocována.

Tabulka č. 2 zobrazuje hodnoty T - testu. Tato data dokazují, že provedená měření a výpočty průměrných velikostí buněk a směrodatných odchylek jsou naměřena správně.

Tabulka č. 2: Hodnoty testového kritéria dle t- testu (vzorec MS Excel 2007). Červeně označené hodnoty jsou statisticky velmi významné, na 1% hladině významnosti. Zeleně označené hodnoty jsou statisticky významné na 5% hladině významnosti. Neoznačené hodnoty jsou statisticky nevýznamné.

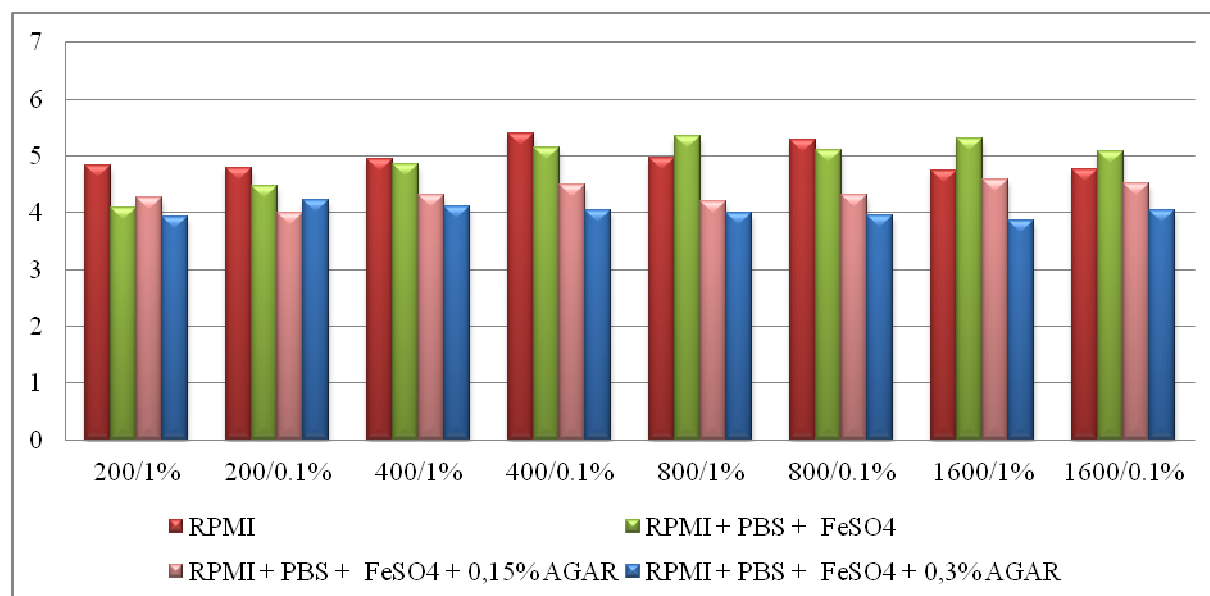
RPMI vs RPMI + PBS	200/1	200/0.1	400/1	400/0.1	800/1	800/0.1	1600/1	1600/0.1
po 3 dnech	1,92827E-10	0,38385307	1,5724E-13	1,79864E-06	1,1452E-13	0,848373401	0,040944545	3,39181E-12
po 5 dnech	0,119303509	2,10078E-05	0,007351783	1,79709E-09	0,006801301	0,000189428	0,534885281	0,445090077
po 7 dnech	4,69093E-06	0,139807164	8,37582E-09	0,00126747	4,44274E-06	2,26045E-07	0,037520964	0,0744601
RPMI + PBS vs RPMI + PBS + FeSO4								
po 3 dnech	0,218752375	0,030661615	5,86612E-06	5,54193E-06	0,007860029	0,004667561	2,89731E-09	2,2251E-26
po 5 dnech	2,17312E-10	0,016901632	0,014019814	3,93676E-10	5,68496E-14	0,002195728	5,43952E-05	3,07452E-06
po 7 dnech	1,54699E-38	1,02613E-05	3,90726E-27	0,001037906	1,6745E-20	1,81997E-27	3,72602E-24	9,35457E-12
RPMI + PBS + FeSO4 vs RPMI + PBS + FeSO4 + 0.15%Agar								
po 3 dnech	3,28537E-05	1,02396E-09	2,8501E-29	6,57767E-10	2,87659E-21	2,70808E-13	6,51597E-23	0,003436084
po 5 dnech	0,006905624	4,13094E-07	1,18518E-10	3,35632E-24	7,42253E-47	6,83373E-16	3,9175E-11	3,55011E-10
po 7 dnech	4,3016E-53	5,13429E-07	1,71991E-40	5,64437E-24	1,90536E-42	7,41207E-40	1,78233E-37	1,55553E-28
RPMI+PBS+FESO4 VS. RPMI+PBS+FESO4+0.3%AGAR								
po 3 dnech	1,24367E-05	1,94172E-16	1,46125E-18	4,12295E-18	2,35571E-39	1,18106E-20	5,23535E-12	0,000109854
po 5 dnech	0,016949252	0,009699603	7,85165E-16	2,50715E-36	1,00927E-56	1,59864E-28	8,72149E-40	1,63923E-23
po 7 dnech	3,02289E-39	6,42996E-14	2,22301E-58	1,1973E-31	3,29738E-36	8,30221E-41	8,46457E-38	5,46776E-37
RPMI+PBS+FESO4+0.15%AGAR VS RPMI+PBS+FESO4+0.3%AGAR								
po 3 dnech	0,771730086	0,010414023	7,65935E-06	0,123280087	0,015116366	0,761465852	0,09441405	0,456461432
po 5 dnech	2,39712E-09	0,001552748	0,000496497	6,9944E-09	0,002684975	1,31947E-06	1,06072E-19	1,11813E-08
po 7 dnech	0,000684807	0,008403108	0,013715201	0,193613143	0,892640962	0,876628156	0,451847824	0,639899775
RPMI+PBS+FESO4+0.15%AGAR VS RPMI+PBS+FESO4+0.3%AGAR+ ALBUMIN								
po 3 dnech	0,079817345	0,077137413	4,39784E-12	0,05928575	0,678552548	0,028452504	0,646559691	0,000168169
po 5 dnech	1,02298E-14	0,862593649	5,3001E-09	3,80684E-14	0,035815926	0,870559796	1,17062E-06	1,24747E-07
po 7 dnech	7,16337E-08	0,150877582	0,001444251	0,000931767	0,479212702	0,708935185	0,634733612	0,900120105
RPMI+PBS+FESO4+0.3%AGAR VS RPMI+PBS+FESO4+0.3%AGAR+ ALBUMIN								
po 3 dnech	0,002170063	9,64322E-05	0,021886839	0,294902964	0,400512999	0,197855108	0,165330614	3,73702E-08
po 5 dnech	0,410065164	0,005307203	0,485902311	0,283422471	0,614132925	2,08829E-06	1,28889E-08	0,014313687
po 7 dnech	0,290447518	0,00012601	0,016430869	0,260401437	0,000266748	0,101640962	0,193823778	0,001073062

Graf č. 10: Zjištěné průměry velikostí buněk kultivovaných v médiích se statisticky nevýznamnějšími přídávky po třech dnech kultivace.



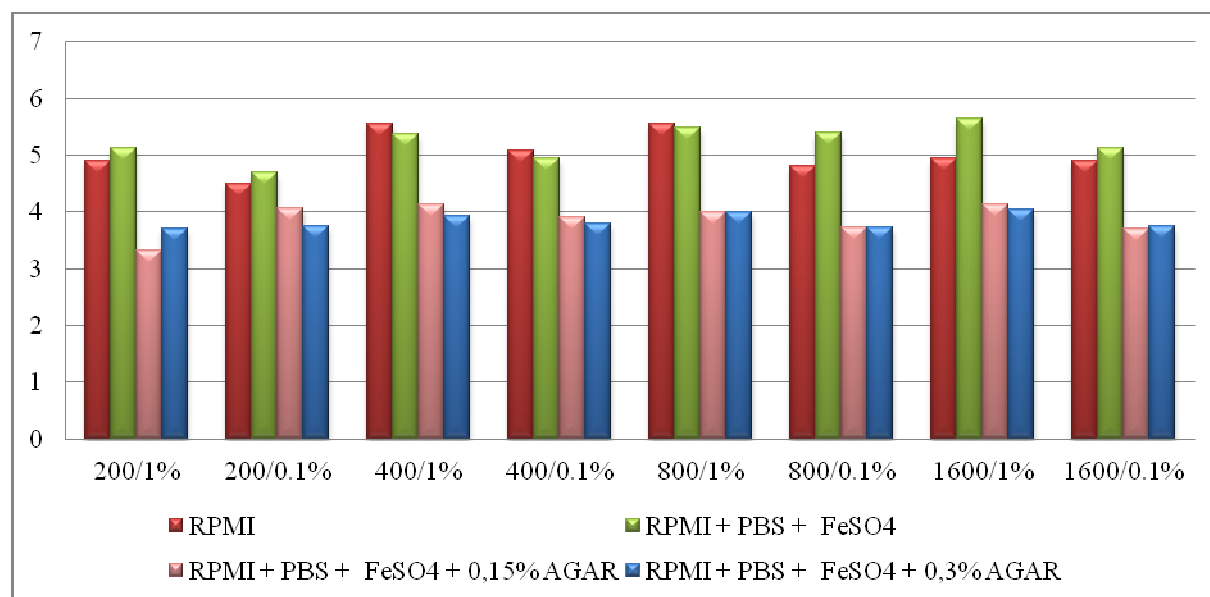
Pozn.: Na ose x jsou znázorněny objemy buněčné suspenze v médiích se statisticky nevýznamnějšími přídávky. Na ose y jsou znázorněny průměry buněk v μm. Velikosti buněk byly získány z analyzovaných fotografií.

Graf č. 11: Zjištěné průměry velikostí buněk kultivovaných v médiích se statisticky nevýznamnějšími přídávky po pěti dnech kultivace.



Pozn.: Na ose x jsou znázorněny objemy buněčné suspenze v médiích se statisticky nevýznamnějšími přídávky. Na ose y jsou znázorněny průměry buněk v μm. Velikosti buněk byly získány z analyzovaných fotografií.

Graf č. 12: Zjištěné průměry velikostí buněk kultivovaných v médiích se statisticky nevýznamnějšími přísadkami po sedmi dnech kultivace.



Pozn.: Na ose x jsou znázorněny objemy buněčné suspenze v médiích se statisticky nejvýznamnějšími přísadkami. Na ose y jsou znázorněny průměry buněk v μm . Velikosti buněk byly získány z analyzovaných fotografií.

6 DISKUZE

Ve své diplomové práci jsem pro kultivaci kryptokokových buněk použila RPMI 1640 médium, které nahradilo běžně využívaná mikrobiologická média. Toto médium se využívá, aby simulovalo prostředí savčího organismu. Nahrazením tradičních mikrobiologických médií médiem RPMI 1640 a optimalizací kultivačních podmínek jsem se snažila objasnit mechanismus adaptace buněk *C. neoformans* na hypoxické podmínky v lidské tkáni. Podle předchozí studie Raclavského *et al.* (2009), jež se zabývala vlivem provzdušňování a třepání *in vitro* kultury na šíření kryptokokové infekce, mi byly stanoveny následující podmínky kultivace, a to kultivace bez třepání, za konstantní teploty 37 °C a v mikrotitračních destičkách přelepených adhezní fólií, která zabraňuje přístupu vzduchu. Autoři původně kultivovali buňky v Erlenmeyerových baňkách s vatovými zátkami a za různé úrovně třepání, zjistili, že výrazné třepání vede u buněk *C. neoformans* k rychlejší proliferaci a také k rychlejšímu vyčerpání kyslíku, čímž dochází k zastavení buněčného cyklu a k výraznému zpomalení proliferace. Používali běžná mikrobiologická média. Abych vytvořila *in vitro* model, který co nejlépe simuluje podmínky savčí tkáně, bylo nutné nahradit mikrobiologická média médiem RPMI 1640.

Kultivační podmínky jsem měnila postupným přidáváním 10x koncentrovaných roztoků glukózy, PBS, železa, agar, hovězího sérového albuminu a lidského séra. Hypoxické a normoxické podmínky kultivace zajišťovaly čtyři různé objemy, a to 200 µl, 400 µl, 800 µl a 1600 µl. Na základě analogie s předchozími publikovanými daty víme, že v objemu 200 µl jsou zajištěny normoxické podmínky, v objemu 400 µl se jedná o podmínky mírné hypoxie a v objemech vyšších než 800 µl se jedná o stav výrazné hypoxie.

Po srovnání všech objemů a médií lze také konstatovat, že největší buňky se vyskytovaly v objemu 400 µl v médiích s 1% obsahem glukózy (a dalšími přísadami). Větší obsah glukózy v médiích zřejmě poskytuje kryptokokovým buňkám lepší výživu, a proto byly v médiích s tímto obsahem glukózy největší. V závislosti na dostatku živin a stále dostatečném přístupu vzduchu bylo právě v tomto objemu buněk nejvíce a byly dostatečně velké. Největší buňky se ve většině kultivací vyskytovaly v daném objemu po pěti dnech kultivace.

Nejmenších velikostí dosahovaly buňky v objemu 200 µl v téměř všech kultivačních médiích, zejména ale v těch s 0,1% hladinou glukózy, pouze po přidání albuminu a lidského séra se nejmenší velikosti buněk nacházely v objemu 400 µl jak v médiu s 1% hladinou glukózy, tak v médiu s nižší hladinou glukózy. Nejmenších velikostí dosahovaly buňky

kultivované po dobu sedmi dnů. Změna nastala pouze u kultivace buněk v médiu obohaceném o PBS a železo, kde naopak po sedmi dnech došlo k zvětšení. To může být dáno vlivem přídavku železa, který způsobil zvětšení buněk ve všech objemech a také zřejmě ovlivnil životnost buněk, jelikož jsem větší buňky pozorovala po sedmi dnech kultivace i v objemech s výraznou hypoxií. Je tedy možné, že po přídavku železa jsou buňky schopné přežít i ve stavu výrazné hypoxie.

Jak potvrzují provedené statistické hodnocení, většina změn parametrů kultivace má významný vliv na velikost buněk. Jako statisticky nejvýznamnější se jeví přídavek agarů, ať už v koncentraci 0,3% či 0,15%. V těchto podmínkách byla ve srovnání se stavem před přidáním zaznamenána nejvyšší hodnota T - testu, a sice $p = 2,22301^{E-58}$, což reprezentuje vysoce významnou statistickou hodnotu na 1% hladině významnosti ($P < 0,01$). Po přidání agarů do kultivačního média došlo k výraznému zmenšení buněk, jak ukazují i grafy v předchozí kapitole 5.4. Naopak výrazné zvětšení buněk nastalo po přídavku železa, tato změna je podle výsledků T - testu také vysoce významná, nachází se na 1% hladině významnosti. Můžeme tedy konstatovat, že přídavek železa ovlivnil kultivované kryptokokové buňky pozitivně, stejně jako obohacení média o 1% roztok glukózy. Jako negativní se jeví ovlivnění kultury agarem, který způsobí zahuštění média a dojde k poklesu velikosti buněk. Pravděpodobně to může být způsobeno tím, že buňky v hustším médiu nemají dostatečný prostor pro růst a proliferaci.

Kmen T46 - 1 byl součástí podobných pokusů v předchozích pracích vedených MUDr. Raclavským, Ph.D., kde docházelo k charakterizaci odpovědi buněk *C. neoformans* na hypoxické podmínky. V. Husíčková ve své diplomové práci (2008) kultivovala buňky *C. neoformans* v běžném mikrobiologickém médiu za různých podmínek aerace. Ve své práci došla k závěru, že nejlépe provzdušňované kultury buněk dosahovaly menších rozměrů, ale zároveň obsahovaly největší množství buněk. Středně okysličené kultury proliferovaly dle jejích pokusů pomaleji, ale byly větší. V mé práci jsem objevila buňky s největším průměrem právě v kultuře středně okysličené, zároveň však bylo těchto buněk v téměř všech pokusech nejvíce (zhodnocení fotografií mikroskopickým pozorováním). Buňky kultivované v médiu s glukózou, PBS a železem vykazovaly největší průměrné velikosti buněk v objemu 400 μ l, který zajišťuje právě stav mírné hypoxie. Situace se změnila po přidání agarů, kdy došlo ke zmenšení buněk.

Raclavský *et al.* (2009) ve své studii uvádí přítomnost malých dceřiných kapkovitých buněk kolem jedné mateřské buňky. Kryptokokové buňky byly kultivovány v YPG médiu za omezeného přístupu vzduchu. Já jsem ve své práci běžná mikrobiologická média nahradila

médiem RPMI 1640, přesto i já jsem během vyhodnocování svých experimentů podobná soubuní také pozorovala, a to zejména po sedmi dnech kultivace v objemech reprezentujících stav výrazné hypoxie, tedy v 800 μ l a 1600 μ l. Autoři studie uvádí, že tato soubuní pozorovali po osmi dnech kultivace buněk, což dokazuje, že některé z buněk dokázaly v hypoxických podmínkách přežít a mít potomstvo. Malé dceřiné buňky však nejsou schopny se od mateřské oddělit a odumírají. Podobná bizarní soubuní ve své práci prezentuje také V. Husičková. Tato soubuní jsou pravděpodobně výsledkem poruchy tvorby septa mezi mateřskou a dceřinou buňkou, resp. poruchou v procesu oddělení dceřiné buňky od matky.

Autoři Zaragoza *et al.* (2010) pozorovali výskyt gigantických kryptokokových buněk během infekce v savčích buňkách. Tyto buňky měly dosahovat velikosti až 25 μ m v průměru. Já jsem v *in vitro* modelu takovéto zvětšené buňky nepozorovala, ačkoli jsem se snažila navodit podmínky kultivace co nejvíce podobné podmínkám vyskytujícím se v lidské tkáni. Mnou nalezená největší velikost kryptokokových buněk, kultivovaných v RPMI médiu s 1% hladinou glukózy, byla 6 μ m. Průměrná velikost buněk kultivovaných v *in vitro* podmínkách je 4 - 5 μ m. V téměř všech kultivacích jsem i já ve své práci dosahovala průměrných velikostí buněk okolo 4 - 5 μ m. Pouze po přidavku agarů se velikost buněk zmenšila na 3,5 - 4 μ m.

Provedenými experimenty bylo prokázáno, že složení a konzistence média výrazně ovlivňuje velikost a také proliferaci kryptokokových buněk a mnohdy může být limitujícím faktorem růstu, stejně jako různé stupně aerace. Buňky *C. neoformans* se snaží hypoxickým podmínkám během kultivace přizpůsobovat tak, aby nedocházelo k úplnému vyčerpání kyslíku v kultuře.

7 ZÁVĚR

Ve své diplomové práci jsem se věnovala úpravám kultivačního média tak, abych popsala vliv jednotlivých složek tohoto média na velikost buněk *C. neoformans*. Tradiční mikrobiologické médium jsem nahradila médiem simulující podmínky v savčí tkáni (RPMI 1640). Toto médium jsem následně obohacovala o různé koncentrace glukózy, PBS pro úpravu pH, železa, agaru pro úpravu viskozity, hovězího sérového albuminu a lidského séra. Buněčnou suspenzi jsem kultivovala v různých podmínkách aerace, které byly stanoveny čtyřmi odlišnými objemy, při 37 °C po dobu tří, pěti a sedmi dnů.

Statisticky nejvýznamnější vliv na kultivaci měl přídavek agaru, ten byl do média přidán ve dvou různých koncentracích. Jeho přidání vedlo k výraznému zmenšení velikosti buněk během kultivace a tento stav se dále nezměnil ani po přidání hovězího sérového albuminu, či lidského séra.

Pro podporu tvorby velkých buněk se jako nejlepší jevílo přidání železa (ve formě roztoku $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$). Větší buňky jsem pozorovala také v původním médiu RPMI obohaceném o dva roztoky glukózy. Přídavek PBS nezpůsobil žádné výrazné změny, průměrné velikosti buněk byly téměř shodné s průměry v původním médiu.

Dále jsem vyhodnotila, že buňky *C. neoformans* dosahovaly největších velikostí v podmínkách mírné hypoxie, tedy při objemu 400 μl a při přídavku 1% glukózy, takže i v podmínkách částečného provzdušnění dosahovaly kultivované buňky největších velikostí, řádově 5 μm . Kultivované buňky v médiu obohaceném pouze o 0,1% roztok glukózy nedosahovaly velkých rozměrů.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AhR	aryl hydrocarbon receptor
ARNT	aryl hydrocarbon nuclear translocator
bHLH	transaktivační doména
CNS	centrální nervová soustava
CREB	cAMP response element binding protein
CTAD	C - koncová transaktivační doména
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EPO	erythropoetin
FESO ₄ x 7 H ₂ O	heptahydrát síranu železnatého
FIH - 1	factor inhibiting HIF - 1
G ₁	G ₁ fáze buněčného cyklu
G ₂	G ₂ fáze buněčného cyklu
Hap 1	heme activated protein 1
HIF - 1	hypoxia inducible factor 1
Hog 1	high osmolarity glycerol
Hpt	histidin - containing phosphotransfer protein
HRE	hypoxia response elements
MAPK	mitogen - activated protein kinase
MOPS	sodium salt Buffer grade
NTAD	N - koncová transaktivační doména
ODDD	oxygen - dependent degradation domain
PAS	transaktivační doména
PBS	phosphate buffer saline
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 medium
pVHL	von - Hippel - Lindau protein
S	S fáze buněčného cyklu
SCAP	SREBP cleavage - activating protein
Scp 1	Sre1 cleavage activating protein, Scap Scp1
Sre 1	sterol regulatory element binding protein, transcription factor
SREBPs	sterol regulatory element binding proteins
Tco1	two - component - like
VEGF	vascular endothelial growth factor

YPG	yeast - peptone -glucose medium
YNB	yeast nitrogen base

Arany, Z., Huang, L. E., Eckner, R., Bhattacharya, S., Jiang, Ch., Goldberg, M. A., Bunn, H. F. & Livingston, D. M. (1996): An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93(23): 12969-12973.

Bae, S. H., Jeong, J. W., Park, J. A., Kim, S. H., Bae, M. K., Choi, S. J., Kim, K. W. (2004): Sumoylation increases HIF-1 α stability and its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 324: 394-400.

Bahn Y. S., Kojima K., Cox G. M., Heitman J. (2005): Specialization of the HOG Pathway and Its Impact on Differentiation and Virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Biology of the Cell* 16: 2285-2300.

Bahn Y. S., Kojima K., Cox G. M., Heitman J. (2006): A Unique Fungal Two-component System Regulates Stress Respones, Drug Sensitivity, Sexual Development and Virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Biology of the Cell* 17: 3122-3135.

Bicanic T., Harrison T. S. (2004): Cryptococcal meningitis. *Br Med Bull* 72, 99-118.

Buchanan K. L., Murphy J. W. (1998): What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen? *Emerg Infect Dis* 4, 71-83.

Bulmer G. S., Sans M. D. (1968): *Cryptococcus neoformans*. III. Inhibition of phagocytosis. *J Bacteriol* 95, 5-8.

Carmeliet, P., Dor, Y., Herbert, J. M., Fukumura, D., Brusselmans, K., Dewerchin, M., Neeman, M., Bono, F., Abramovitch, R., Maxwell, P., Koch, C. J., Ratcliffe, P., Moons, L., Jain, R. K., Collen, D. & Keshert, E. (1998): Role of HIF-1 α in

hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis, *Nature*, 394: 485-490.

Casadevall A., Perfect J. R. (1998): *Cryptococcus neoformans*. American Society for Microbiology, Washington, DC. ISBN 155811078.

Chan, W. K., Yao, G., Gu, Y. Z. & Bradfield, C. A. (1999): Cross-talk between the aryl hydrocarbon receptor and hypoxia inducible factor signaling pathways. Demonstration of competition and compensation. *J Biol Chem*, 274: 12115-12123.

Chandel, N. S., McClintock, D. S., Feliciano, C. E., Wood, T. M., Melendez, J. A., Rodriguez, A. M. & Schumacker, P. T. (2000): Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing. *J Biol Chem*, 275: 25130-25138.

Chang Y. C., Bien C. M., Lee H., Espenshade P. J., Kwon-Chung K. (2007): Sre1, a regulator of oxygen sensing and sterol homeostasis, is required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology* 64: 614-629.

Chang Y. C., Stins M. F., McCaffery M. J., Miller G. F., Pare D. R., Dam T., Paul-Satyasee M., Kim K. S., Kwon-Chung K. J. (2004): Cryptococcal yeast cells invade the central nervous system via transcellular penetration of the blood-brain barrier. *Infect Immun*. 72 (9): 4985-95.

Cleare W., Casadevall A. (1999): Scanning electron microscopy of encapsulated and non-encapsulated *Cryptococcus neoformans* and the effect of glucose on capsular polysaccharide release. *Med Mycol* 37, 235-243.

Chun C. D., Liu O. W., Madhani H. D. (2007): A Link between Virulence and Homeostatic Responses to Hypoxia during Infection by the Human Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathogens* 3: 225-238.

Covello, K. L., Simon, M. C., Kehler, J., Yu, H., Gordan, J. D., Arsham, A. M., Hu, C. J., Labosky, P. A. & Keith, B. (2006): HIF-2 α regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev*, 20(5): 557-570.

Doering T. L. (2000): How does *Cryptococcus* get its coat? *Trends Microbiol* 8, 547-553.

Drouhet E. (1997): Milestones in the history of *Cryptococcus* and cryptococcosis. *J Mycol Méd* 7, 10-27.

Ellis D., Pfeiffer T. J. (1990): Natural Habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Journal of Clinical Microbiology* 28: 1642-1644.

Edwards M. R., Gordon M. A., Lapa E. W., Ghiorse W. C. (1967): Micromorphology of *Cryptococcus neoformans*. *J Bacteriol* 94, 766-777.

Espenshade P. J. (2006): SREBPs: sterol-regulated transcription factors. *Journal of Cell Science* 119:973-976.

Faganello J., Arruda W., Schrank A., Vainstain M. H. (2006): An alternative method to prepare samples of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans* for scanning elektron microscopy analysis. *J Microbiol Methods* 64, 416-419.

Fell J. W., Statzell-Tallman A. (1998): *Cryptococcus Vuillemin*. In: Kurtzman C. P., Fell J. W. (eds.), *The yeasts, a taxonomic study*, 4th edn., Elsevier, Amsterdam, 742-763.

Friedman G. D., Fessel W. J., Udaltsova N. V., Hurley L. B. (2005): Cryptococcosis: the 1981-2000 epidemic. *Mycoses* 48, 122-125.

Girdwood, D., Bumpass, D., Vaughan, O. A., Thain, A., Anderson, L. A., Snowden, A. W., Garcia-Wilson, E., Perkins, N. D., Hay, R. T. (2003): P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. *Mol Cell*, 11: 1043-1054.

Goda N., Ryan H. E., Khadivi B., McNulty W., Rickert R. C., Johnson R. S. (2003): Hypoxia-Inducible Factor 1 α Is Essential for Cell Cycle Arrest during Hypoxia. *Molecular and Cellular Biology* 23: 359-369.

Hickman M. J., Winston F. (2007): Heme Levels Switch the Function of Hap1 of *Saccharomyces cerevisiae* between Transcriptional Activator and Transcriptional Repressor. *Molecular and Cellular Biology* 27: 7414-7424.

Hon T., Dodd A., Dirmeier R., Gorman N., Sinclair P. R., Zhang L., Poyton R. O. (2003): A Mechanism of Oxygen Sensing in Yeast. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 50771-50780.

Horton J. D., Goldstein J. L., Brown M. S. (2002): SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.* 109: 1125-1131.

Hu, C. J., Iyer, S., Sataur, A., Covello, K. L., Chodosh, L. A. & Simon, M. C. (2006): Differential Regulation of the Transcriptional Activities of Hypoxia-Inducible Factor 1 Alpha (HIF-1 α) and HIF-2 α in Stem Cells. *Mol Cell Biol*, 26: 3514-3526.

Hu Ch. J., Wang L. Y., Chodosh L. A., Keith B., Simon M. C. (2003): Differential Roles of Hypoxia-Inducible Factor 1 α (HIF-1 α) and HIF-2 α in Hypoxic Gene Regulation. *Molecular and Cellular Biology* 23: 9361-9374.

Huang L. E., Gu J., Schau M., Bunn H. F. (1998): Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitinproteasome pathway. *Biochemistry* 95: 7987-7992.

Hughes A. L., Todd B. L., Espenshade P. J. (2005): SREBP Pathway Responds to Sterols and Functions as an Oxygen Sensor in Fission Yeast. *Cell* 120: 831-842.

Ikeda R., Sugita T., Jacobson E. S., Shinoda T. (2002): Laccase and melanization in clinically important *Cryptococcus* species other than *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* 40, 1214-1218.

Jacobson E. S. (2000): Pathogenic roles for fungal melanins. *Clin Microbiol Rev* 13, 708-717.

Kallio P. J., Wilson W. J., O'Brien S., Makino Y., Poellinger L. (1999): Regulation of the Hypoxia-inducible Transcription Factor 1 α by the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 6519-6525.

Khyriem A. B., Sujatha S., Parija S. C. (2004): Chronic Meningitis in an Immunocompetent Adult caused by *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Indian Journal of Medical Microbiology* 22: 275.

Kopecká M., Yamaguchi M., Gabriel M., Takeo K., Svoboda A. (2000): Morphological transitions during the cell division cycle of *Cryptococcus neoformans* as revealed by transmission electron microscopy of ultrathin sections and freeze substitution. *Scripta Medica (Brno)* 73, 369-380.

Kozel T. R. (1995): Virulence factors of *Cryptococcus neoformans*. *Trends Microbiol* 3, 295-299.

Kozel T. R., Pfrommer G. S. T., Guerlain A. S., Highison B. A., Highison G. J. (1988): Role of the capsule in phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. *Rev Infect Dis* 10, S436S439.

Kwon-Chung, K. J., Varma A. (2006): Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? *FEMS Yeast Res* 6: 574-587.

Lando D., Peet D. J., Gorman J. J., Whelan D. A., Whitelaw M. L., Bruick R. K. (2002): FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes & Development* 16:1466–1471.

Mamidi A., DeSimone J. A., Pomerantz R. J. (2002): Central nervous system infections in individuals with HIV-1 infection. *J Neurovirol* 8, 158-167.

Marxen J. H., Stengel P., Doege K., Heikkinen P., Jokilehto T., Wagner T., Jelkmann W., Jaakkola P., Metzen E. (2004): Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) promotes its degradation by induction of HIF- α -prolyl-4-hydroxylases. *Biochem. J.* 381: 761-767.

Mateo J., García-Lecea M., Cadenas S., Hernández C., Moncada S. (2003): Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by nitric oxide through mitochondria-dependent and independent pathways. *Biochem. J.* 376: 537–544.

Mitchell T. G., Perfect J. R. (1995): Cryptococcosis in the era of AIDS 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Microbiol Rev* 8, 515-548.

Mochizuki T., Tanaka S., Watanabe S. (1987): Ultrastructure of the mitotic apparatus in *Cryptococcus neoformans*. *J Med Vet Mycol* 25, 223-233.

Mochizuki T. (1998): Three-dimensional reconstruction of mitotic cells of *Cryptococcus neoformans* based on serial section electron microscopy. *Jpn J Med Mycol* 39, 123-127.

Nosanchuk J. D., Casadevall A. (2003): Budding and melanized *Cryptococcus neoformans* in the presence or absence of L-dopa. *Microbiology* 149, 1945-1951.

Odds F. C., Backer T., Dams G., Vranckx L., Woestenborghs F. (1995): Oxygen as Limiting Nutrient for Growth of *Cryptococcus neoformans*. Journal of Clinical Microbiology 33: 995-997.

Ohkusu M., Hata K., Takeo K. (2001a): Bud emergence is gradually delayed from S to G₂ with progression of growth phase in *Cryptococcus neoformans*. FEMS Microbiology Letters 194: 251-255.

Ohkusu M., Raclavský V., Takeo K. (2001b): Deficit in oxygen causes G₂ budding and unbudded G₂ arrest in *Cryptococcus neoformans*. FEMS Microbiology Letters 204: 29-32.

Okagaki, L.H., Strain, A.K., Nielsen, J.K., Charlier, C., Baltes, N.J., Chretien, F., et al. (2010): Cryptococcal cell morphology affects host cell interaction and pathogenicity. PLoS Pathog; 6:e1000953.

Phaff H. J., Fell J. W. (1970): *Cryptococcus* Kützing emend. Phaff et Spencer. Lodder J. (ed.), The yeasts, a taxonomic study, 2nd edn., Elsevier, Amsterdam, 10881145.

Polacheck I., Hearing V. J., Kwon-Chung K. J. (1982): Biochemical studies of phenoloxidase and utilization of catecholamines in *Cryptococcus neoformans*. J Bacteriol 150, 12121220.

Raclavský, V., Husičková, V., Moránová, Z., Ohkusu, M., Fischer, O., Precek, J., Trtková, J., Takeo, K., Kawamoto, S. (2009): Growth strategy of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans* submerged culture under different cultivation formats. Folia Microbiol (praha) 54; 349 -352.

Raclavský, V., Pavlíček, J., Novotný, R., Moránová, Z., Ohkusu, M., Trtková, J., Takeo, K., Kawamoto, S. (2009): Peculiar clusters of daughter cells observed in *Cryptococcus neoformans* grown in sealed microtiter plates. *Folia Microbiol (praha)* 54: 369-371.

Renker C., Blanke V., Böstler B., Heinrichs J., Buscot F. (2004): Diversity of *Cryptococcus* and *Dioszegia* yeasts (Basidiomycota) inhabiting arbuscular mycorrhizal roots or spores. *FEMS Yeast Res* 4, 597-603.

Richard, D. E., Berra, E., Gothie, E., Roux, D. & Pouyssegur, A. (1999): J. p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem*, 274: 32631-32637.

Saag M. S., Graybill R. J, Larsen R. A., Pappas P. G., Perfect J. R., Powderly W. G., Sobel J. D. (2000): Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. *Clin Infect Dis* 30, 710-718.

Sakaguchi N., Baba T., Fukuzawa M., Ohno S. (1993): Ultrastructural study of *Cryptococcus neoformans* by quick-freezing and deep-etching method. *Mycopathologia* 121, 133-141.

Semenza, G. L., Jiang, B. H., Leung, S. W., Passantino, R., Concordet, J. P., Maire, P. & Giallongo, A. (1996): Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, 271: 32529-32537.

Semenza, G. L., Nejfelt, M. K., Chi, S. M. & Antonarakis, S. E. (1991): Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 5680-5684.

Soares M. C. B., Paula C. R., Dias A. L. T., Caseiro M. M., da Costa S. O. P. (2005): Environmental strains of *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* in the city of Santos, SP, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 47, 31-36.

Sorrell T. C., Brownlee A. G., Ruma P., Malik K., Pfeiffer T. J., Ellis D. H. (1996): Natural Environmental Sources of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Journal of Clinical Microbiology* 34: 1261–1263.

Sorrell T. C., Ellis D. H. (1997): Ecology of *Cryptococcus neoformans*. *Rev. Iberoam. Micol.* 14: 42-43.

Steenbergen J. N., Casadevall A. (2003): The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Microbes Infect* 5, 667-675.

Sumbayev, V. V., Budde, A., Zhou, J. & Brune, B. (2003): HIF-1 alpha protein as a target for S-nitrosation. *FEBS Lett*, 535: 106-112.

Takeo K., Uesaka I., Nishiura M. (1974): The wall particle of the genus *Cryptococcus*: Large size and characteristic distribution. *J Gen Microbiol* 84, 223-225.

Takeo K., Uesaka I., Uehira K. Nishiura M. (1973): Fine structure of *Cryptococcus neoformans* grown in vitro as observed by freeze-etching. *J Bacteriol* 113, 1442-1448.

Taylor B. L., Zhulin I. B. (1999): PAS Domains: Internal Sensors of Oxygen, Redox Potential, and Light. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63: 479-506.

Todd B. L., Stewart E. V., Burg J. S., Hughes A. L., Espenshade P. J. (2006): Sterol Regulatory Element Binding Protein Is a Principal Regulator of Anaerobic Gene Expression in Fission Yeast. *Molecular and Cellular Biology* 26: 2817-2831.

Wang, F., Zhang, R., Wu, X. & Hankinson, O. (2010): Roles of Coactivators in Hypoxic Induction of the Erythropoietin, *Plosone*, 5(4): 1-11.

Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A. & Semenza, G. L. (1995): Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 5510-5514.

Zaragoza, O., Garcia-Rodas, R., Nosanchuk, J. D., Cuenca-Estrella, M., Rodriguez-Tudella, J.L. and Casadevall, A. (2010): Fungal cell gigantism during mammalian infection. *PLoS Pathog*; 6:e1000945.

<http://mmbbr.asm.org/content/75/2/213/F10.expansion.html>

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1749461312000061>