Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Srovnání transkripce fosfatázy PHO15 u *Candida albicans* a *Candida parapsilosis* při různých stresových podmínkách

Bc. Lucie Frydrychová

Diplomová práce

2024

University of Pardubice

Faculty of Chemical-Technology

Comparison of phosphatase PHO15 transcription in *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* in different stress conditions

Bc. Lucie Frydrychová

Master thesis

2024

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	**Bc. Lucie Frydrychová**
Osobní číslo:	**C22388**
Studijní program:	**N0512A130006 Analýza biologických materiálů**
Téma práce:	**Srovnání transkripce fosfatázy PHO15 u *Candida albicans* a *Candida parapsilosis* při různých stresových podmínkách**
Téma práce anglicky:	**Comparison of Phosphatase PHO15 Transcription in *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* in Different Stress Conditions**
Zadávající katedra:	**Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

Význam tzv. "core stress response" u kvasinek. Přehled genů, které se na ní podílejí a mění svou expresi ve stresových podmínkách, především u kvasinek *C. parapsilosis* a *C. albicans*. Popis fosfatázy (Pho15p) z *C. parapsilosis* a *C. albicans* (struktura, funkce, enzymatické vlastnosti, regulace, aj.).

Experimentální část:

1. Kultivace *C. parapsilosis* a *C. albicans* za různých stresových podmínek;
2. izolace RNA;
3. analýza pomocí real-time PCR (qPCR);
4. zhodnocení, jak se liší transkripce PHO15 v *C. albicans* a *C. parapsilosis*.

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Vojtěch Vejvoda, Ph.D.**
Herbacos Recordati s.r.o.

Konzultanti diplomové práce: **Ing. Lucie Michalcová**
Katedra biologických a biochemických věd
doc. RNDr. Olga Heidingsfeld, CSc.
Přírodovědecká fakulta – Katedra biochemie, Univerzita Karlova

Datum zadání diplomové práce: **22. prosince 2023**
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

L.S.

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 29. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem Srovnání transkripce fosfatázy PHO15 u *Candida albicans a Candida parapsilosis* při různých stresových podmínkách jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou, nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 10.5.2024

Bc. Lucie Frydrychová

Ráda bych tímto poděkovala svému vedoucímu diplomové práce panu Mgr. Vojtěchu Vejvodovi, PhD. za vstřícnost a rady při psaní diplomové práce. Zároveň bych chtěla poděkovat paní Ing. Lucii Michalcové za vedení při experimentální části a za výpomoc při psaní diplomové práce. Děkuji také paní doc. RNDr. Olze Heidingsfeld, CSc. za spolupráci a rady při zpracovávání výsledků.

ANOTACE

Tato práce se zabývá srovnáním transkripce fosfatázy Pho15 u *Candida albicans* a *Candida parapsilosis* při různých stresových podmínkách. Konkrétně jsou zvoleny různé zdroje uhlíku v porovnání s glukózou. K těmto stresovým podmínkám bylo zvoleno ještě vaginální simulační tekuté médium, které napodobuje sekrece ženského genitálního traktu. Cílem práce bylo zjistit, jak se změní transkripce fosfatázy Pho15 za těchto podmínek.

KLÍČOVÁ SLOVA

Candida albicans, *Candida parapsilosis*, transkripce, ribonukleová kyselina, CaPho15, CpPho15, RT-qPCR

ANNOTATION

This study compares the transcription of phosphatase Pho15 in *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* under different stress conditions. Specifically, different carbon sources are chosen in comparison to glucose. In addition to these stress conditions, a Vaginal Simulation Fluid medium was chosen to mimic the secretions of the female genital tract. The aim of this work was to determine how the transcription of phosphatase Pho15 changes under these conditions.

KEY WORDS

Candida albicans, *Candida parapsilosis*, transcription, ribonucleic acid, CaPho15, CpPho15, RT-qPCR

SEZNAM ZKRATEK

A – adenin

ADH1 – gen kódující alkoholdehydrogenázu

ATP – adenosintrifosfát

bp – páry bází

BSA – hovězí sérový albumin

c – koncentrace

C – cytosin

C. – Candida

C. albicans – Candida albicans

C. parapsilosis – Candida parapsilosis

CAP1 – s cyklázou asociované proteiny 1

CAP2 – s cyklázou asociované proteiny 2

CaPho15 – fosfatáza Pho15 z *Candida albicans*

CpPho15 – fosfatáza Pho15 z *Candida parapsilosis*

CZF1 – Candida albicans zinc finger 1 gen

DEPC voda – voda ošetřená diethyl pyrokarbonátem

DNA – deoxyribonukleová kyselina

dPCR – digitální PCR

FAD2 – gen kódující flavodoxin

G – guanin

GLK1 – gen kódující glukokinázu

HAD – dehalogenázy halokyselin

HSP – proteiny tepelného šoku

HTG12 – gen kódující hexózový transportér

HXK1 – gen kódující hexokinázu

ICL1 – gen kódující izocitrátlyázu

kb – kilobáze

lncRNA – dlouhé nekódující RNA

miRNA – mikroRNA

mRNA – messengerová ribonukleová kyselina

NAD^+ – nikotinamiddinukleotid

NADH – nikotinamidadenindinukleotid

NADPH – nikotinamidadenindinukleotidfosfát

NK – nukleová kyselina

OD – optická hustota

PCR – polymerázová řetězová reakce

PDC11 – gen kódující pyruvátdekarboxylázu

PHO15 – gen kódující fosfatázu Pho15

pre-mRNA – prekurzorová mRNA

qPCR – kvantitativní PCR v reálném čase

R – čistota

RBT1 – gen kódující protein buněčné stěny

RIN – RNA integrity number

RNA – ribonukleová kyselina

RNázy - ribonukleázy

rRNA – ribozomální ribonukleová kyselina

RTáza – reverzní transkriptáza

SDS – dodecylsulfát sodný

SnoRNA – malá RNA

T – thymin

TBE – Tris-borát-EDTA pufr

TDH3 – gen kódující triosafosfátdehydrogenázu

TPS1 – gen kódující trehalóza-6-fosfátsyntázu

tRNA – transferová ribonukleová kyselina

U – uracil

UDP-galaktóza – uridindifosfát-galaktóza

UDP-glukóza – uridindifosfát-glukóza

YNB – Yeast Nitrogen Base

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Schéma buňky kvasinky (převzato a upraveno z [12]).....17
Obrázek 2: Morfologie *C. albicans* (převzato a upraveno z [27]).....18
Obrázek 3: Kolonie *C. albicans* na krevním agaru (převzato z [32]).....20
Obrázek 4: Kolonie *C. albicans* na Sabouradově agaru (převzato z [33]).....20
Obrázek 5: Kolonie *C. parapsilosis* na Sabouradově agaru (převzato z [38]).....21
Obrázek 6: Schéma glykolýzy (převzato a upraveno z [71]). 25
Obrázek 7: Růstová křivka (převzato z [90]). 28
Obrázek 8: Struktura dusíkatých bází (převzato a upraveno z [95]). 29
Obrázek 9: Struktura ribózy (převzato a upraveno z [96]).....29
Obrázek 10: Sekundární struktura tRNA (převzato a upraveno z [102]).....31
Obrázek 11: Schéma transkripce (převzato a upraveno z [109]).....33
Obrázek 12: Izolace RNA pomocí fenol-chloroformu (převzato a upraveno z [121]). 36
Obrázek 13: Grafické znázornění vyhodnocení RIN (převzato z [125]).....37
Obrázek 14: Schéma gelové elektroforézy (převzato a upraveno z [133]). 38
Obrázek 15: Schéma PCR, horní části 1. krok denaturace, 2. krok annealing a 3. krok elongace, v dolní části znázornění opakování PCR v cyklech (převzato z [140]).....39
Obrázek 16: Použitý DNA marker 200-1500 bp (Top-Bio).....49
Obrázek 17: Růstová křivka *C. albicans* ve VSF médiu.....51
Obrázek 18: Růstová křivka *C. parapsilosis* ve VSF médiu.....51
Obrázek 19: Růstová křivka *C. albicans* v YNB médiu s 2% glycerolem.....52
Obrázek 20: Růstová křivka *C. parapsilosis* v YNB médiu s 2% galaktózou. 52
Obrázek 21: Elektroforetický gel obsahující vzorky RNA z kvasinky *C. albicans*. Ca RNA – RNA vyizolovaná z *C. albicans*.....58
Obrázek 22: Elektroforetický gel, obsahující vzorky RNA z *C. albicans* a *C. parapsilosis*. Ca DNA – DNA vyizolovaná z *C. albicans*, Ca RNA – RNA vyizolovaná z *C. albicans*, Cp DNA – DNA vyizolovaná z *C. parapsilosis*, Cp RNA – RNA vyizolovaná z *C. parapsilosis*.....59
Obrázek 23: Elektroforetický gel obsahující vzorky RNA z *C. albicans* a *C. parapsilosis*. Ca DNA – DNA vyizolovaná z *C. albicans*, Ca RNA – RNA vyizolovaná z *C. albicans*, Cp DNA – DNA vyizolovaná z *C. parapsilosis*, Cp RNA – RNA vyizolovaná z *C. parapsilosis*.....60
Obrázek 24: Křivka amplifikace RT-qPCR při první reakci.....61

Obrázek 25: Křivka amplifikace RT-qPCR po úpravě teploty v kroku, který předcházel RT-qPCR.....61
Obrázek 26: Křivka tání při RT-qPCR.....62
Obrázek 27: Porovnání změn genové exprese *PHO15* u RNA získané z *C. albicans* kultivované v různých médiích. YNB 2% gal – YNB médium s 2% galaktózou, YNB 2% gly – YNB médium s 2% glycerolem, VSF – VSF médium.....65
Obrázek 28: Porovnání změn genové exprese *PHO15* u RNA získané z *C. parapsilosis* kultivované v různých médiích. YNB 2% gal – YNB médium s 2% galaktózou, YNB 2% gly – YNB médium s 2% glycerolem, VSF – VSF médium.....66

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Složení VSF média (převzato z [85]). 27
Tabulka 2: Primery použité do RT-qPCR. Tm – teplota tání, CaPho15-F – forward primer *PHO15* pro *C. albicans*, CaPho15-R – reverse primer *PHO15* pro *C. albicans*, CpPho15-F – forward primer *PHO15* pro *C. parapsilosis*, CpPho15-r – reverse primer *PHO15* pro *C. parapsilosis*, CaAct F – forward primer aktinu pro *C. albicans*, CaAct-R – reverse primer aktinu pro *C. albicans*, CpAct-F – f orward primer aktinu pro *C. parapsilosis*, CpAct-R – reverse primer aktinu pro *C. parapsilosis*. 44
Tabulka 3: Komponenty na jednu PCR reakci. 48
Tabulka 4: Komponenty na jednu reakci RT-qPCR.....50
Tabulka 5: Koncentrace (c) a čistota (R) RNA vyizolované z *C. albicans* a *C. parapsilosis* pomocí sady Quick-RNA™ Viral Kit.....53
Tabulka 6: Hodnoty OD po kultivaci *C. albicans* v různých podmínkách. 54
Tabulka 7: Hodnoty OD po kultivaci *C. parapsilosis* v různých podmínkách. 55
Tabulka 8: Koncentrace (c) a čistota (R) RNA vyizolované z *C. albicans* pomocí Trizolu a po přidání DNáz.....56
Tabulka 9: Koncentrace (c) a čistota (R) RNA vyizolované z *C. parapsilosis* pomocí Trizolu a po přidání DNáz.....57
Tabulka 10: Hodnoty Ct získané z RT-qPCR pro *C. albicans*. YNB 2% gal – YNB médium s 2% galaktózou, YNB 2% gly – YNB médium s 2% glycerolem, VSF – VSF médium, Aktin – použité primery s aktinem, Pho15 – použité primery s *PHO15*. 63
Tabulka 11: Hodnoty Ct získané z RT-qPCR pro *C. parapsilosis*. YNB 2% gal – YNB médium s 2% galaktózou, YNB 2% gly – YNB médium s 2% glycerolem, VSF – VSF médium, Aktin – použité primery s aktinem, Pho15 – použité primery s *PHO15*. 63
Tabulka 12: Vypočítané hodnoty transkripce *PHO15* pro RNA vyizolovanou z *C. albicans* z různých médií. YNB 2% gal – YNB médium s 2% galaktózou, YNB 2% gly – YNB médium s 2% glycerolem, VSF – VSF médium. 64
Tabulka 13: Vypočítané hodnoty transkripce *PHO15* pro RNA vyizolovanou z *C. parapsilosis* z různých médií. YNB 2% gal – YNB médium s 2% galaktózou, YNB 2% gly – YNB médium s 2% glycerolem, VSF – VSF médium.....64

OBSAH

ÚVOD **15**

1. TEORETICKÁ ČÁST **16**

1.1. ROD CANDIDA 16

1.1.1. Struktura *16*

1.1.2. Druhy *17*

1.2. *CANDIDA ALBICANS* 18

1.3. *CANDIDA PARAPSILOSIS* 20

1.4. CORE STRESS RESPONSE 21

1.4.1. Přehled genů podílejících se na core stress response u Candida albicans *21*

1.4.2. Přehled genů podílejících se na core stress response u Candida parapsilosis *22*

1.4.3. Gen PHO15 ..... *22*

1.5. ENZYM FOSFATÁZA 23

1.5.1. Fosfatáza CaPho15 a CpPho15 ..... *23*

1.6. METABOLICKÉ OPRAVY 23

1.7. GLYKOLÝZA 24

1.8. ZDROJE UHLÍKU 25

1.8.1. Glycerol *26*

1.8.2. Galaktóza *26*

1.8.3. Kyselina mléčná *27*

1.9. VAGINAL SIMULATION FLUID MÉDIUM 27

1.10. RŮSTOVÁ KŘIVKA 27

1.11. RNA 28

1.11.1. mRNA *29*

1.11.2. tRNA *30*

1.11.3. rRNA *31*

1.12. TRANSKRIPCE 32

1.12.1. Regulace transkripce *33*

1.12.2. Reverzní transkripce *33*

1.13. IZOLACE RNA 34

1.13.1. Manipulace s biologickým materiálem *34*

1.13.2. Obecný postup *35*

1.13.3. Stanovení koncentrace a čistoty *36*

1.13.4. Elektroforéza *37*

1.14. POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE 38

1.14.1. Druhy PCR *40*

1.14.2. Kvantitativní PCR s reverzní transkripcí (RT-qPCR) *41*

2. PRAKTICKÁ ČÁST 42

2.1. CÍLE PRÁCE 42

2.2. CHEMIKÁLIE 42

2.2.1. Použité kity 42

2.2.2. Ostatní chemikálie 42

2.3. POUŽÍVANÉ KMENY 43

2.4. POUŽITÉ PRIMERY 44

2.5. PŘÍSTROJE 44

2.6. OSTATNÍ MATERIÁLY 45

2.7. METODIKA 45

2.7.1. Příprava zásobních inokul 45

2.7.2. Příprava Vaginal simulation fluid (VSF) média 45

2.7.3. Příprava YNB média s 2% glukózou, 2% galaktózou a 2% glycerolem 46

2.7.4. Růstová křivka 46

2.7.5. Izolace RNA pomocí Trizol Reagentu 46

2.7.6. Izolace RNA pomocí sady Quick-RNA™ Viral Kit 46

2.7.7. Odstranění DNáz 47

2.7.8. RNA elektroforéza 47

2.7.9. PCR 47

2.7.10. DNA elektroforéza 48

2.7.11. RT-qPCR 49

2.8. VÝSLEDKY A DISKUZE 50

2.8.1. Růstová křivka 50

2.8.2. Izolace RNA pomocí sady Quick-RNA™ Viral Kit 53

2.8.3. Izolace RNA pomocí Trizol Reagentu 53

2.8.4. RNA elektroforéza 57

2.8.5. Kontrolní PCR a elektroforéza 58

2.8.6. RT-qPCR 60

3. ZÁVĚR 67

4. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 69

Úvod

Tato práce se zabývá tématem srovnání transkripce fosfatázy Pho15 u *Candida albicans* a *Candida parapsilosis* při různých stresových podmínkách. *Candida albicans* a *Candida parapsilosis* jsou oportunní patogeny běžně se vyskytující u člověka. Při přemnožení způsobují kandidózy. Při různých stresových podmínkách dochází k transkripčním změnám u některých genů. Tyto změny jsou souhrnně nazývané core stress response. V práci se zaměřuji na gen *PHO15*, kódující proteiny CaPho15 u *Candida albicans* a CpPho15 u *Candida parapsilosis*. Tyto proteiny jsou enzymy hydrolyzující 4-nitrofenylfosfát. Gen *PHO15* se zapojuje do stresové odpovědi *Candida albicans* a *Candida parapsilosis* a mění se jeho exprese. Jako stresové podmínky jsou použity různé zdroje uhlíku. Běžným zdrojem uhlíku pro kvasinky je glukóza. Ta je zpracována glykolýzou a buňky tak získávají energii. Místo glukózy jsme jako zdroje uhlíku použili glycerol a galaktózu. Další stresovou podmínkou bylo vaginal simulation fluid médium, které se svým složením snaží napodobit vaginální prostředí. Toto médium bylo použito, protože obsahuje laktát, který může buňkám sloužit jako další zdroj uhlíku.

1. Teoretická část

1.1. Rod Candida

Zástupci rodu *Candida* jsou oportunní patogeny. Jedná se o houby, které jsou součástí lidské mikroflóry. Kvasinky kolonizují lidskou kůži, gastrointestinální a urogenitální trakt. Při jejich přemnožení vznikají kandidové infekce, neboli kandidózy. Závažnost těchto infekcí je různá. Může se jednat o nepříjemné, ale poměrně neškodné kandidózy sliznic, kdy se na postiženém místě vyskytují červené, nebo bílé svědivé skvrny. Stejně tak může dojít k infekcím krevního řečiště, při kterých je ohrožen život pacienta. K infekci jsou náchylnější pacienti s HIV a pacienti podstupující chemoterapii, nebo transplantaci [[1], [2], [3]].

Kandidóza úst a hrdla se nazývá orofaryngeální kandidóza, vaginální kandidóza se jinak nazývá vaginální soor, při napadení vnitřních orgánů se infekce označuje jako invazivní kandidóza. Infekce krevního řečiště jsou označovány jako kandidémie [[1], 4].

Podle studií provedených na myších vede pravděpodobně nerovnováha v homeostáze normální střevní flóry k imunitní reakci. Předpokládá se, že přemnožení kandidy ve střevě může vést k zánětlivým střevním onemocněním jako je Crohnova choroba. U pacientů s tímto onemocněním se často vyskytují biofilmy tvořené *C. albicans*, nebo *C. tropicalis* [5, 6].

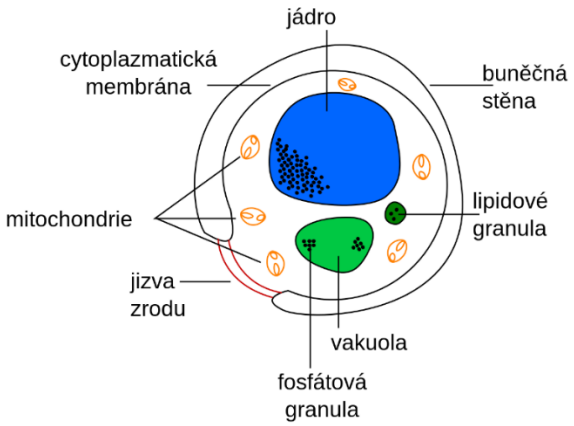
Tyto kvasinky mají mnoho faktorů virulence, díky kterým mohou napadat člověka jako hostitele. Mezi faktory virulence patří adheze k hostiteli, tvorba biofilmů a sekrece hydrolytických enzymů [7].

1.1.1. Struktura

Kvasinky rostou jako osamocené buňky. Mohou existovat ve třech fázích, jako pučící kvasinky, hyfy a pseudohyfy. Jednotlivé formy se liší buněčnou morfologií, funkcí a podmínkami růstu. Rozdělení kvasinek je určené podle přítomnosti, nebo nepřítomnosti pouzder, velikosti a tvaru buněk, mechanismu tvoření dceřiných buněk, tvorby pseudohyf a hyf a přítomností pohlavních spor. Pomocí morfologických znaků se rozlišuje především rod. Druh se identifikuje pomocí morfologických znaků spojených se schopností asimilace a fermentace různých zdrojů uhlíku a využíváním dusičnanů jako zdroj dusíku [8, 9].

Buněčná stěna je důležitá pro udržení životaschopnosti kvasinek. Skládá se z chitinových mikrofibril, které jsou uloženy v matrici malých polysacharidů, proteinů, lipidů, anorganických solí a pigmentů, poskytujících skeletární podporu a tvar buňky. Chitin je polymer N-acetyl-D-glukosaminu a je produkován pomocí chitinsyntetázy. Jeho obsah ve

stěně se liší podle morfologické fáze houby. Polysacharidy tvořící buněčnou stěnu jsou látky tvořené necelulózovými glukany. Glukany jsou skupina D-glukózových polysacharidů s glykosidickými vazbami. Příkladem jsou mannany, chitóza a galaktany. Kromě těchto látek mohou stěny obsahovat lipidy, proteiny, chitosan, kyselou fosfatázu, proteázy, melanin a anorganické ionty (např. fosfor, vápník a hořčík) [9, 10, 11]. Buňka kvasinky je na obrázku 1.



Obrázek 1: Schéma buňky kvasinky (převzato a upraveno z [12]).

1.1.2. Druhy

C. tropicalis je oportunní patogen běžně se vyskytující v tropických zemích, kde bývá nejčastější příčinou nozokomiální kandidémie. Způsobuje různé kandidózy, například vaginální, slizniční a invazivní. U onkologických pacientů může být invazivnější než *C. albicans*. Je to diploidní dimorfní kvasinka, vyskytující se jako pučící buňky, nebo v krátkých řetězcích a shlucích. Kultivuje se na Sabouradově agaru, kde tvoří krémové, bílé, nebo šedé kolonie. Podle makroskopických znaků nelze tento druh rozeznat od ostatních. K identifikaci se používají chromogenní půdy, mikroskopická identifikace a biochemické testy. K léčbě infekcí *C. tropicalis* se používají antimykotika, konkrétně amfotericin B, flukonazol a echinokandiny. Mnoho kmenů tohoto druhu je již rezistentní vůči antimykotikům, což značně ztěžuje léčbu [13, 14, 15, 16].

C. auris byla poprvé izolována z ucha. Bylo to v Japonsku v roce 2009. Tato kvasinka může kolonizovat kůži jako normální flóra. Při přemnožení způsobuje invazivní kandidózu, kdy napadá krevní řečiště, centrální nervový systém, vnitřní orgány, svaly, kosti, klouby a další. Optimální teplota růstu je 37 °C, ale je schopna přežít do 42 °C, díky čemuž dokáže přežít horečku. Jednotlivé buňky vytváří shluky. Neprodukuje hyfy, ale pseudohyfy. K léčbě se používají echinokandiny, ale tato kvasinka je poměrně rezistentní vůči antimykotikům a z tohoto důvodu není vždy léčba účinná. Z důvodu rezistence vůči mnohým

antimykotikům, obtížné identifikaci a snadného šíření, se tento druh považuje za potencionální hrozbu [17, 18, 19, 20].

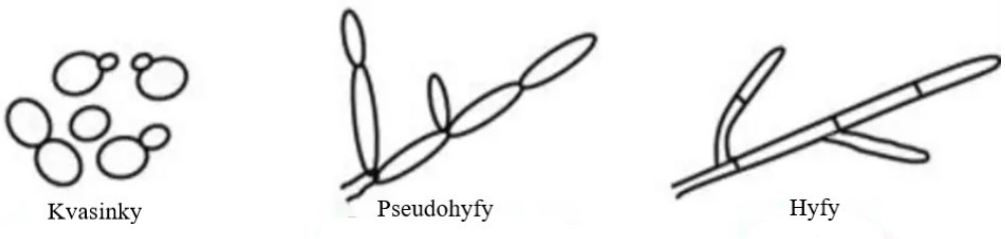
C. glabrata je komenzál lidských slizničních tkání. Společně s *C. albicans* je velmi často izolována od pacientů s orofaryngeální kandidózou. Tyto druhy často spolupracují a poškozují tkáně. Dále způsobuje urogenitální, případně až systémové infekce. Tvoří pseudohyfy. Z toho důvodu nestačí mikroskopická identifikace, ale je třeba kultivace. Na chromogenních půdách se barví bíle, růžově, nebo fialově, a tak je možné ji rozeznat od *C. albicans*, která se barví modrozeleně. Při léčbě se používají echinokandiny, nebo azoly. Stejně jako ostatní druhy si však tvoří rezistenci [21, 22, 23, 24].

C. albicans a C. *parapsilosis* budou popsány v samostatných kapitolách.

1.2. Candida albicans

Candida albicans je kvasinka, která se běžně vyskytuje v lidském těle. Je to oportunní patogen způsobující kandidózu u člověka. Ohroženi jsou imunokompromitovaní pacienti.

Jedná se o dimorfní houbu, může tedy růst v různých formách, podle charakteru okolního prostředí, a to jako kvasinky, pseudohyfy a pravé hyfy (obrázek 2). Kvasinky jsou malé kulaté, nebo oválné struktury. Jeví se jako jednobuněčné a mají průměr 2-10 μm. Množí se pučením, což znamená, že na povrchu rodičovské buňky vznikají další buňky. Hyfy jsou dlouhé větvící se nitkovité útvary. Dosahují délky až několik centimetrů. Tato forma vzniká v případě příznivých podmínek, například za přítomnosti vhodných živin. Ve formě hyf dochází k penetraci tkání a invazi. Mimo tyto dvě formy existuje morfologická změna na pseudohyfy. Jsou to protáhlé struktury, které zůstávají spojené. Jsou širší než hyfy. Tím vytváří dojem vláknité struktury [8, 25, 26, 27, 28].



Obrázek 2: Morfologie *C. albicans* (převzato a upraveno z [27]).

Nachází se v dutině ústní, kde se může projevovat jako tzv. moučnivka. Na sliznici úst jazyka vznikají bílé povlaky. Dále kolonizuje povrch kůže. Může způsobovat kožní kandidózu, a to především v zapařených místech jako například v podpaží, nebo mezi prsty. V trávicím

traktu se vyskytuje především v tenkém střevě a konečníku. Při přemnožení následkem oslabení imunitního systému, nebo při užívání antibiotik zde způsobuje kandidózu. V oblasti genitálií způsobuje kvasinkové infekce a záněty. Ve vzácných případech se kandidóza rozvíjí až v systémové onemocnění [25, 27, 28, 29, 30].

Ke vzniku infekce má *C. albicans* mnoho faktorů virulence. Mezi faktory patří například adheziny, tvorba biofilmů, invaziny, a různé enzymy, jako jsou hydrolázy, proteázy a lipázy. Adheziny jsou molekuly na povrchu bakterií. Umožňují přichycení bakterie k buňce a následné napadení buňky. Biofilm je komplex mikroorganismů, přilnutých k nějakému povrchu, například ke tkáni. Tvorba biofilmu chrání kvasinku před okolním prostředím a zvyšuje tak její odolnost. Invaziny jsou proteiny napomáhající kvasince k průniku do hostitelských buněk.

Nákaza probíhá v několika fázích. Nejprve kvasinka přilne k hostitelské tkáni. Tvorba adhezinů usnadní její přilnutí. Následně kolonizuje hostitelskou tkáň. Po kolonizaci tvoří hyfy, které pronikají do hostitelských buněk. V této fázi se vylučují hydrolytické enzymy, které poškozují tkáně. *C. albicans* má několik mechanismů, jak unikat imunitní odpovědi. Je odolná vůči fagocytóze a je schopna manipulovat s imunitními signálními cestami hostitele. Následně se kvasinka šíří krevním řečištěm do dalších míst. V krajním případě to může vést až k systémové kandidóze, která může mít za následek smrt [25, 27, 28, 30, 31].

Laboratorní diagnostika se provádí několika způsoby. Nejdříve se provádí předběžné mikroskopické vyšetření. Barví se grampozitivně. V mikroskopu je možné vidět pseudohyfy a pučící kvasinkové buňky. Při kultivaci na krevním agaru roste v drobných bílých koloniích, z nichž později vyrůstají výběžky (obrázek 3). Na Sabouradově agaru s přídavkem glukózy, nebo maltózy roste v bílých až krémově zbarvených koloniích s matným povrchem (obrázek 4). Na chromagaru roste v zelených koloniích. Z biochemických testů se provádí test na fermentaci glukózy, kdy vzniká oxid uhličitý [25, 27, 28, 30].

Obrázek 3: Kolonie *C. albicans* na krevním agaru (převzato z [32]).

Obrázek 4: Kolonie *C. albicans* na Sabouradově agaru (převzato z [33]).

1.3. Candida parapsilosis

Candida parapsilosis je v mnoha zemích druhým nejčastěji izolovaným druhem z rodu *Candida*. Vyskytuje se na lidské kůži a v gastrointestinálním traktu. U zdravých jedinců nezpůsobuje komplikace. Kromě člověka se vyskytuje u zvířat, hmyzu a v půdě.

Buňky jsou oválné, jednobuněčné a měří 2-4 µm. Množí se pučením. Na rozdíl od *C. albicans* netvoří pravé hyfy. Za určitých podmínek může vytvářet pseudohyfy, jejich vznik je však méně pravděpodobný než u jiných druhů [34, 35].

Mezi faktory virulence patří produkce adhezních proteinů, usnadňujících přilnutí k povrchům a hostitelským buňkám. Dále vylučuje řadu enzymů, jako jsou proteázy a hemolyziny. Kromě enzymů produkuje *C. parapsilosis* mnoho cytotoxických látek. Mezi ně

patří látky, které narušují membrány hostitelských buněk a látky poškozující DNA hostitelských buněk. *C. parapsilosis* dokáže tvořit biofilm, který zvyšuje odolnost kvasinek vůči obranným mechanismům hostitele a některým lékům. Zároveň je tato kvasinka schopna vytvářet rezistenci na antifungální léky, a proto se často obtížně léčí.

Při barvení dle Grama se barví grampozitivně. V mikroskopu je tedy vidět modrofialové vejčité, nebo protáhlé buňky. Na Sabouradově agaru roste v bílých až krémových lesklých koloniích (obrázek 5). Na chromogenním agaru tvoří narůžovělé kolonie [34, 35, 36, 37].

Obrázek 5: Kolonie *C. parapsilosis* na Sabouradově agaru (převzato z [38]).

1.4. Core stress response

Core stress response je soubor transkripčních změn ve velkém počtu genů v reakci na různé formy stresu. Vnější faktory, narušující stav bez stresu, se nazývají stresory. Vzniklý stav po působení stresorů je stres a adaptační procesy, které směřují k nastolení nové rovnováhy (stavu bez stresu), jsou stresové reakce. *C. albicans* se setkává v hostiteli s oxidativním stresem při setkání s imunitním systémem, s osmotickým stresem v ledvinách a s pH stresem v gastrointestinálním a urogenitálním traktu. Stresové reakce na tyto podněty se vyvinuly k udržení tepelné a osmotické rovnováhy [4, 39, 40, 41, 42].

1.4.1. Přehled genů podílejících se na core stress response u *Candida albicans*

U *C. albicans* se na stresové odpovědi podílí mnoho genů. Žádná reakce na stres není u této kvasinky stejná. S každým stresem dochází k indukci jiných genů a neexistují geny indukované společně všemi rysy. Pro ochranu buněk před poškozením teplem má *C. albicans*

proteiny tepelného šoku (HSP). Jsou indukovány zvýšením teploty z normální růstové teploty. Mnoho studií prokázalo, že HSP jsou částečně zodpovědné za rezistenci *C. albicans* vůči antifungálním lékům regulací některých signálních drah. S cyklázou asociované proteiny 1 a 2 (CAP1, CAP2) jsou geny spojené s regulací buněčného cyklu a odpovědí na stres. Jsou důležité pro přežití kvasinky v nepříznivých podmínkách. V obraně proti oxidativnímu stresu obsahuje kvasinka geny kódující superoxid dismutázu, zodpovědnou za detoxikaci reaktivních kyslíkových radikálů [43, 44, 45, 46].

Při změnách zdroje uhlíku dochází k aktivaci, nebo potlačení několika genů. Gen *HXK1* kóduje cytosolový protein, katalyzující fosforylaci hexóz. Jeho exprese se zvyšuje při růstu na neglukózových zdrojích uhlíku. *HTG12* kóduje protein transportující fruktózu, glukózu a manózu. *GLK1* pravděpodobně kóduje glukokinázu. Exprese se mění v reakci na zdroj uhlíku růstového média. Gen *TPS1* kóduje trehalóza-6-fosfátsyntázu. Tento enzym má důležitou úlohu při syntéze trehalózy, která je stabilizátor proteinů a membrán během stresu. Jeho expresi může ovlivnit hladina glukózy. *ICL1* kóduje enzym glyoxylátového cyklu izocitrátlyázu, potřebný pro růst při některých zdrojích uhlíku. Jeho exprese se potlačuje přidáním galaktózy, nebo fruktózy do buněk pěstovaných na laktátu, nebo kyselině olejové [47, 48, 49, 50].

1.4.2. Přehled genů podílejících se na core stress response u *Candida parapsilosis*

Geny *C. parapsilosis* měnící svou expresi při stresových podmínkách zatím nejsou příliš prozkoumané. Bylo prokázáno, že genovou expresi může ovlivnit tyrosol, což je molekula odvozená od tyrosinu. Za přítomnosti tyrosolu dochází ke zkrácení lag fáze. Dochází ke zvýšení regulace genů souvisejících s buněčnou stěnou (např. *PDC11*, *TDH3* a *ADH1*), genů podílejících se na produkci biofilmu (např. *CZF1*, *RBT1*), genů souvisejících s virulencí (*FAD2*) a dalších [51].

1.4.3. Gen *PHO15*

Gen *PHO15* kóduje fosfatázy spadající do superrodiny halokyselin dehalogenáz (HAD), jež defosforylují 2-fosfoglykolát. Byl charakterizován na základě homologie s genem *PHO13* ze *Saccharomyces cerevisiae*. Exprimací tohoto genu vznikají proteiny CaPho15 a CpPho15, které snadno hydrolyzují 4-nitrofenylfosfát při pH 8-8,3 za přítomnosti dvojmocných kationtů (Mg^{2+}, Mn^{2+} a Co^{2+}) jako kofaktorů. Hydrolyzují molekuly související s metabolismem sacharidů. Tento gen je jedním z několika genů zapojených do stresové odpovědi *C. albicans* a *C. parapsilosis* [52].

1.5. Enzym fosfatáza

Fosfatázy jsou enzymy, katalyzující odstraňování fosfátových skupin ze substrátu. Patří do třídy hydroláz [53].

Alkalická fosfatáza je optimálně aktivní v alkalickém prostředí. Vyskytuje se na vnější vrstvě buněčné membrány. Má širokou specifičnost. Katalyzuje hydrolýzu fosfátových esterů, které jsou v extracelulárním prostoru. Kofaktory tohoto enzymu jsou zinek a hořčík [54, 55, 56, 57].

Kyselá fosfatáza katalyzuje hydrolýzu fosfoesterů při kyselém pH. Je přítomna v buněčných membránách [58, 59, 60].

1.5.1. Fosfatáza CaPho15 a CpPho15

Jak je uvedeno kapitole 1.4.3. Gen *PHO15*, tyto fosfatázy jsou kódovány tímto genem a defosforylují 2-fosfoglykolát. Obě fosfatázy preferují jako substrát 2-fosfoglykolát. Z dalších substrátů upřednostňuje CaPho15 glyceraldehydfosfát a *β*-glycerofosfát a CpPho15 přednostně 1,3-dihydroxyacetonfosfát. Díky své schopnosti hydrolyzovat fosforylované vedlejší produkty jsou tyto enzymy součástí metabolického reparačního systému [52].

1.6. Metabolické opravy

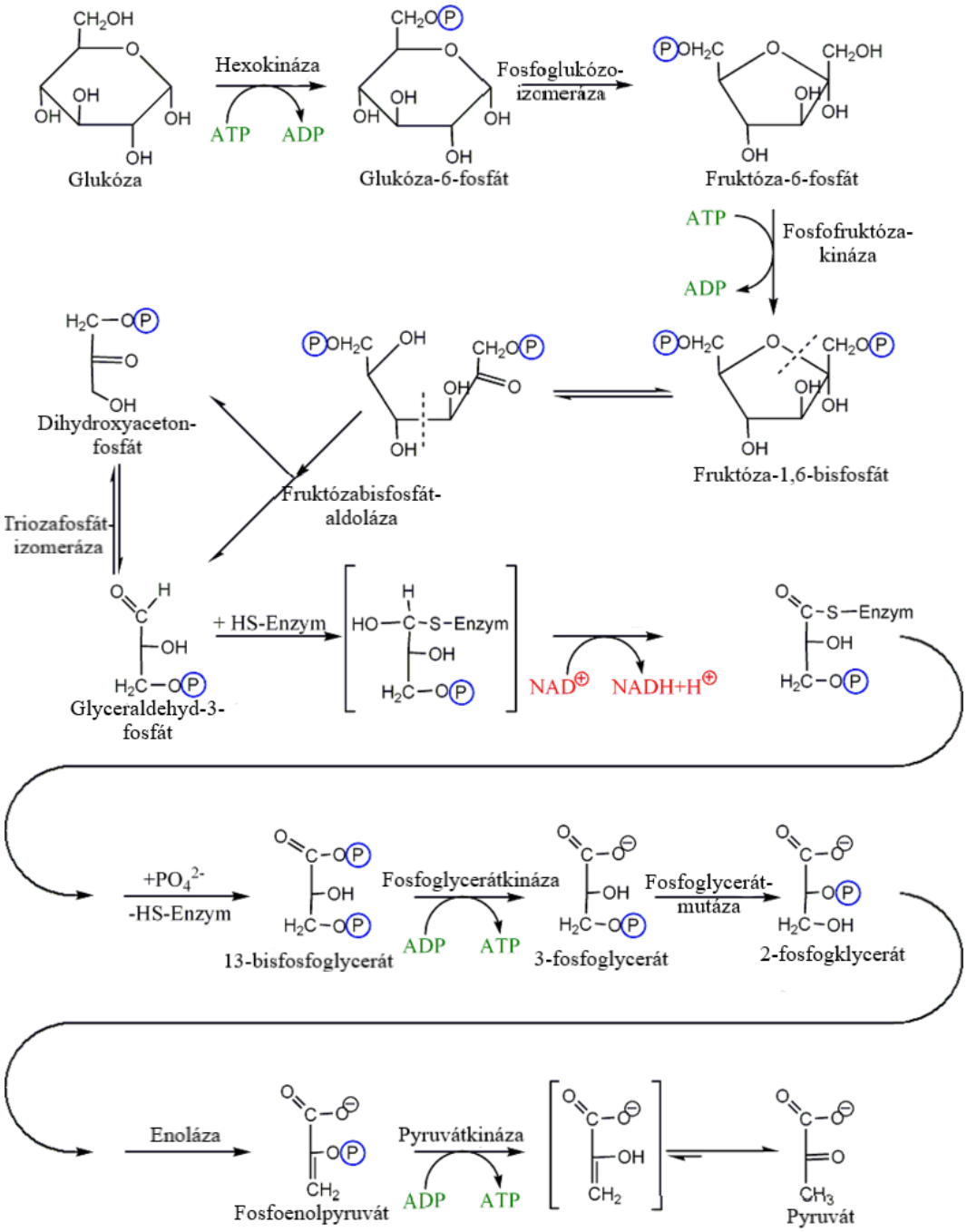
C. albicans a *C. parapsilosis* jsou schopny se přizpůsobit různým podmínkám prostředí, jako je dostupnost živin a další stresové podmínky. Dokáží měnit svůj metabolismus podle různých podmínek vnějšího prostředí. Tato schopnost je důležitá pro jejich přežití a zároveň pro jejich virulenci. Mají schopnost využívat mnoho anabolických a katabolických procesů a z toho důvodu měnit zdroje uhlíku a dusíku. Při omezeném množství zdrojů sacharidů mohou používat aminokyseliny a lipidy jako doplněk pro metabolickou adaptaci. O regulaci a využití metabolismu aminokyselin u kandid je toho známo velmi málo. Je však prokázáno, že *C. albicans* používá aminokyseliny k nahrazení uhlíku a dusíku. Ke změnám metabolismu dochází i v případě, že se kvasinka dostane do prostředí s nízkým (např. střevo), nebo naopak vysokým (např. krev) obsahem kyslíku. Při hypoxických podmínkách jsou aktivovány glykolytické geny a geny související s oxidativní fosforylací jsou potlačeny. Kvůli změnám metabolismu je kvasinka schopna si vytvořit rezistenci na některé antifungální léky [61, 62, 63, 64, 65, 66].

1.7. Glykolýza

Glykolýza je metabolická dráha, sloužící k anaerobnímu získávání energie. Vyskytuje se téměř u všech organismů. Nevyžaduje přítomnost kyslíku, proto je důležitá v anaerobním dýchání. Zároveň je glykolýza prvním krokem v buněčném dýchání. Z jedné molekuly glukózy vznikají dvě molekuly pyruvátu, což je konečný produkt glykolýzy. Pokud je přítomen kyslík, vzniklý pyruvát vstupuje do mitochondrií, kde je oxidován na acetyl-CoA. Pokud kyslík přítomen není, pyruvát je redukován na laktát [67, 68, 69].

Má tři hlavní úlohy. První úlohou je tvorba ATP v nepřítomnosti kyslíku, pyruvát se následně přeměňuje na laktát. Další roli hraje glykolýza za přítomnosti kyslíku, kdy vznikající pyruvát vstupuje do Krebsova cyklu. Ten probíhá v mitochondriích a produkuje ATP. Poslední funkcí je tvorba metabolitů, které následně vstupují do anabolických drah. Dochází k tvorbě NADPH a dalších látek, z nichž je mnoho potřebných k tvorbě glykogenu, lipidů, nukleotidů a dalších důležitých látek [67].

Děj probíhá v cytosolu buněk. Nejdříve dochází k fosforylaci glukózy na glukóza-6-fosfát za spotřeby 1 molekuly ATP. Reakce je katalyzována hexokinázou, nebo glukokinázou. Hexokináza se vyskytuje ve všech buňkách a obecně katalyzuje fosforylaci hexóz. Glukokináza je podtypem hexokináz, nachází se pouze v játrech a slinivce břišní a katalyzuje fosforylaci pouze u glukózy. Vzniklá glukóza-6-fosfát je přeměněna fosfoglukózoizomerázou na fruktóza-6-fosfát, která je následně přeměněna fosfofruktóza-kinázou na fruktóza-1,6-bisfosfát. V tomto kroku se spotřebuje druhá molekula ATP. Za katalýzy fruktózabisfosfátaldolázy se fruktóza-1,6-bisfosfát přemění na dihydroxyacetonfosfát a glyceraldehyd-3-fosfát. Pro další reakce je třeba glyceraldehyd-3-fosfát a z toho důvodu se na něj přeměňuje dihydroxyacetonfosfát za katalýzy triózafosfátizomerázy. Glyceraldehyd-3-fosfát je oxidován na 1,3-bisfosfoglycerát. Dochází tak k redukci NAD^+ na NADH a H^+. Za katalýzy fosfoglycerátkinázy se 1,3-bisfosfoglycerát převádí na 3-fosfoglycerát a vzniká molekula ATP. Fosfomutázou je 1,3-bisfosfoglycerát převeden na 2-fosfoglycerát, který je enolázou převeden na fosfoenolpyruvát. Posledním krokem je přeměna fosfoenolpyruvátu na pyruvát. K tomu dochází za katalýzy pyruvátkinázy a vzniká další molekula ATP [67, 70]. Schéma glykolýzy je na obrázku 6.



Obrázek 6: Schéma glykolýzy (převzato a upraveno z [71]).

1.8. Zdroje uhlíku

Pro tvorbu energie a správný průběh biosyntézy jsou pro buňky nejdůležitější zdroje uhlíku. Organismy mohou obvykle používat jako zdroje uhlíku různé sloučeniny, ať přírodní, nebo xenobiotické. Typickým zdrojem uhlíku je glukóza, ale mohou jím být i jiné látky jako například alkany, alkoholy, di- a trikarboxylové kyseliny. V případě současné přítomnosti různých sloučenin použitelných jako zdroj uhlíku dochází buď ke kometabolismu, nebo selektivnímu metabolismu. Při kometabolismu využívají mikroorganismy oba zdroje současně,

zatímco při selektivním metabolismu využijí nejprve jeden zdroj a po jeho vyčerpání teprve zdroj druhý. K selektivnímu metabolismu často dochází u médií obsahujících směs glukózy s dalším zdrojem uhlíku. Glukóza je obvykle preferovaným zdrojem a její přítomnost často brání použití jiných látek. Tento jev se nazývá represe glukózy, nebo represe uhlíkového katabolitu [72, 73, 74].

1.8.1. Glycerol

Glycerol jinak známý jako glycerin je nejjednodušší triol. Vyskytuje se v přírodních tucích a olejích. Je významným meziproduktem v metabolismu živých organismů. Získává se jako vedlejší produkt při přeměně tuků a olejů na mastné kyseliny, nebo jejich methylestery.

Vstřebání glycerolu probíhá přes cytoplazmatickou membránu pasivní difúzí. U *Escherichia coli* dochází k transportu usnadněnou difúzí. V buňkách je glycerol pomocí glycerolkinázy přeměněn na glycerol-3-fosfát. Takto zůstává zachycen v buňce, dokud není dále metabolizován. Mnoho mikroorganismů je schopno růst na glycerolu jako jediném zdroji uhlíku a energie.

Existují dvě cesty metabolismu. Oxidační cesta začíná přeměnou glycerolu na dihydroxyaceton pomocí glyceroldehydrogenázy. Následnou fosforylací pomocí dihydroxyacetonkinázy vzniká dihydroxyaceton-fosfát, který je následně převeden do glykolýzy.

Druhou možností je redukční dráha. Dochází k přeměně glycerolu na 3-hydroxypropionaldehyd. Reakce je katalyzována koenzym B12-dependentní glyceroldehydratázou. Meziprodukt je následně redukován na 1,3-propandiol pomocí 1,3-propandioldehydrogenázy. Zároveň dochází k regeneraci NAD^+ [75, 76, 77].

1.8.2. Galaktóza

Galaktóza patří mezi monosacharidy. V přírodě se často vyskytuje spolu s jinými cukry, například s laktózou. Může být využita všemi živými organismy pomocí tří hlavních enzymů, tvořících Leloirovu dráhu. Nejprve je galaktóza fosforylována galaktokinázou na galaktóza-1-fosfát. Produkt je reakcí s uridindifosfát-glukózou (UDP-glukóza) přeměněn na uridindifosfát-galaktózu (UDP-galaktóza). Tuto reakci katalyzuje galaktóza-1-fosfáturidyltransferáza a uvolní se glukóza-1-fosfát, který může následně vstoupit do glykolýzy. Posledním krokem je reverzibilní konverze mezi UDP-galaktózou a UDP-glukózou pomocí enzymu UDP-galaktóza-4-epimeráza [78, 79, 80].

1.8.3. Kyselina mléčná

Kyselina mléčná, neboli laktát patří mezi karboxylové kyseliny. Vyskytuje se v některých rostlinných šťávách, krvi a svalech zvířat a také v půdě. Zároveň je obsažena ve fermentovaných mléčných výrobcích, například v sýru. Některé mikroorganismy jsou schopny využívat laktát jako zdroj uhlíku. Když je za přítomnosti laktátdehydrogenázy oxidován na pyruvát, poskytuje energii pro růst mikroorganismů. U bakterií mléčného kvašení se laktát produkuje během fermentace a následně je využíván jako zdroj energie při nízké hladině glukózy [81, 82].

1.9. Vaginal simulation fluid médium

Vaginální simulační tekuté médium napodobuje sekrece ženského genitálního traktu. Vyvinulo se pro pěstování vaginální mikroflóry. Složení média je založeno na množství literatury o složkách lidských vaginálních sekrecí. Cílem složení je vyzdvihnout vlastnosti ovlivňující interakce vaginální tekutiny s antikoncepčními, nebo terapeutickými produkty. Mezi tyto vlastnosti patří pH a osmolarita [83, 84]. Složení média je tabulce 1.

Tabulka 1: Složení VSF média (převzato z [85]).

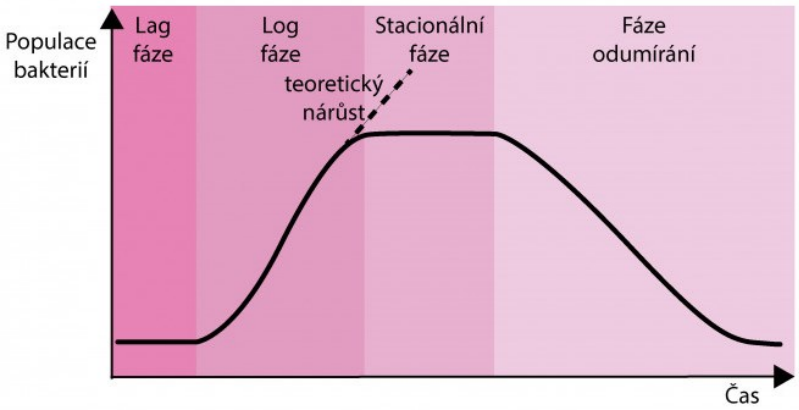
Název	Koncentrace (g/l)
NaCl	3,510
KOH	1,400
$Ca(OH)_2$	0,222
BSA (bovine serum albumin)	0,018
Kyselina mléčná	2,000
Kyselina octová	1,000
Glycerol	0,160
Močovina	0,400
Glukóza	5,000
pH	4,6-7

1.10. Růstová křivka

Mikrobiální růstová křivka je graf prezentující změnu počtu buněk v kultuře v průběhu času. Mikroorganismy potřebují pro růst specifické podmínky. Rostou především na základě omezeného zdroje živin [86, 87].

Lag fáze je počáteční fáze růstu. Nedochází při ní k dělení buněk, pouze k jejich zvětšování a přípravě na dělení. Při exponencionální fázi, neboli log fázi se buňky dělí a po každé generační době zdvojnásobují svůj počet. Je zde vysoká metabolická aktivita, tvoří se DNA, RNA a různé proteiny, potřebné pro růst a dělení buněk. Následuje stacionární fáze, při níž klesne růst populace. Živiny z média se postupně vyčerpají a hromadí se odpadní produkty. Počet dělících se buněk se při této fázi rovná počtu odumírajících buněk. Poslední fází je fáze smrti. Počet živých buněk se postupně snižuje a přibývají odpadní produkty [86, 87, 88, 89]. Graf růstové křivky je na obrázku 7.

Často se stává, že mikroorganismy nerostou zcela podle modelu. Růstové fáze se liší podle použitých podmínek, i podle podmínek před zahájením kultivace [88].



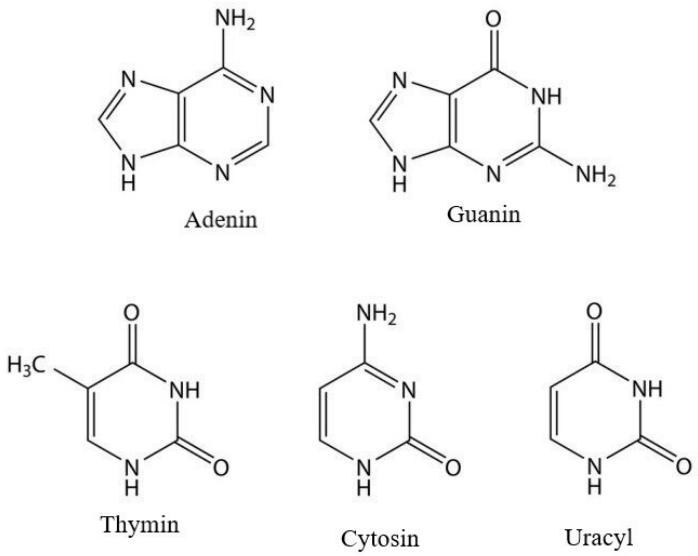
Obrázek 7: Růstová křivka (převzato z [90]).

1.11. RNA

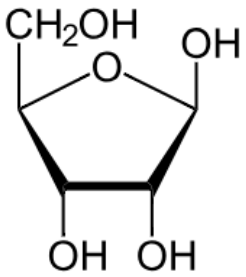
Ribonukleová kyselina (RNA) je jednovláknová biopolymerní molekula s vysokou molekulovou hmotností. Podílí se na mnoha důležitých procesech. Je důležitá při přepisu genetické informace z deoxyribonukleové kyseliny (DNA) do proteinů. Je to tedy posel mezi DNA a syntézou bílkovin, a to prostřednictvím ribozomů. Při přepisu se uplatňují tři typy RNA a to transferová (tRNA), messengerová (mRNA) a ribozomální (rRNA). Zároveň může vytvářet struktury podobné DNA a z toho důvodu se může uplatnit jako nosič genetické informace v některých virech [91, 92].

Stejně jako DNA se skládá z nukleotidových podjednotek. Nukleotidy jsou složené z cukru ribózy, dusíkaté báze a fosfátové skupiny. Jednotlivé nukleotidy jsou spojeny fosfodiesterovými vazbami. Řetězec má vždy 5′ konec, obsahující fosfátovou skupinu a 3′ konec s hydroxylovou skupinou. Dusíkatými bázemi v případě RNA jsou adenin, guanin, cytosin a uracil (obrázek 8). V DNA je místo uracilu jeho

methylovaný analog thymin. Ribóza je tvořena pěti uhlíky a jedním kyslíkem (obrázek 9). Na druhé uhlíkové skupině je připojena hydroxylová skupina, což způsobuje větší náchylnost RNA k hydrolýze. Malé rozdíly ve struktuře DNA a RNA jsou důležité pro různé vlastnosti obou kyselin. RNA je reaktivnější, velmi labilní v alkalickém prostředí a citlivá vůči mnoha nukleovým enzymům. Obvykle se jedná o jednovláknovou molekulu. V případě tRNA a rRNA může v určitých oblastech vznikat sekundární struktura, kdy se vlákno skládá zpět na sebe. Může mít různou délku a tvořit různé struktury [92, 93, 94].



Obrázek 8: Struktura dusíkatých bází (převzato a upraveno z [95]).



Obrázek 9: Struktura ribózy (převzato a upraveno z [96]).

1.11.1. mRNA

Messsenger RNA je typ RNA, který se vyrábí z templátu DNA. Informaci z DNA nelze dekódovat přímo do proteinů, a proto se nejdříve kopíruje do mRNA. Jedná se o jednovláknovou molekulu a její délka je různá podle oblastí transkribované DNA. Jedna molekula mRNA obsahuje informaci pro jeden protein. Je transportována z jádra buňky

do cytoplazmy. Každá sekvence tří bází (kodon) je přeložena na odpovídající aminokyselinu [94, 97].

V případě prokaryot může být vzniklá mRNA okamžitě použita pro syntézu proteinů. U eukaryot nejprve vzniká prekurzorová mRNA (pre-mRNA), která se musí upravit. Jedná se o posttranskripční úpravy. Z molekuly DNA vznikne RNA, která má stejné 5′ trifosfátové a 3′ hydroxylové koncové zbytky jako DNA. Tato pre-mRNA obsahuje nekódující oblasti a je náchylná k degradaci. Její zpracování probíhá ve třech krocích [94, 98].

Jako první je capping. Pomocí 5′-5′ fosfátové vazby se na 5′ konec naváže čepička, tvořená 7-methylguanosinem, která chrání mRNA před degradací. Zároveň je nápomocná při syntéze proteinů s rozpoznáním molekuly mRNA pomocí iniciačních faktorů [94, 98, 99].

Následuje polyadenilace na 3′ konci. Zde se naváže několik set adenylových nukleotidů. Vzniklý polyadenilový konec zabraňuje degradaci kyseliny. Kromě toho pomáhá při exportu mRNA z jádra do cytoplazmy a napomáhá iniciaci translace [94, 98, 99].

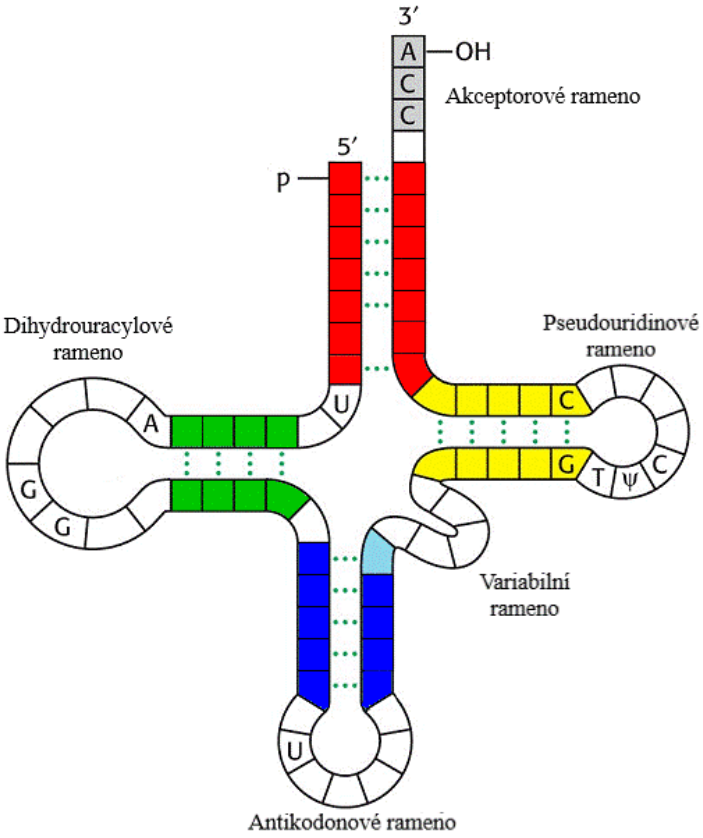
Posledním krokem je sestřih mRNA, při kterém se odstraní nekódující oblasti (introny) a zůstanou pouze kódující oblasti (exony). Probíhá ve spliceozomech, což jsou jaderné částice tvořené proteiny a malými jadernými RNA, které jsou bohaté na uridin. Introny jsou rozpoznány a odstraněny spliceozomem. Následně jsou pomocí spliceozomů spojeny exony. Různé pre-mRNA mohou být spojeny různými způsoby, a tak se vytvoří různé zralé mRNA, kódující různé proteinové sekvence. Takto může vznikat mnoho různých proteinů z omezeného množství DNA, tzv. alternativní sestřih, kdy vzniklá mRNA obsahuje různé kombinace exonů daného protein kódujícího genu [94, 98, 99].

Upravená mRNA je tedy tvořena modifikovaným 5′ koncem se 7-methylguanosinovým uzávěrem a modifikovaným 3′ koncem s polyadenilovými nukleotidy [98, 99].

1.11.2. tRNA

Transferová RNA překládá mRNA do struktury proteinů. Je nosičem aminokyseliny. Na základě kodonu v sekvenci mRNA přenáší vhodnou aminokyselinu do ribozomu. Sekundární struktura je ve tvaru jetelového listu. Vznikají zde ramena, kde se nukleotidy párují a jsou zakončeny nepárovými bázemi, které tvoří smyčky. Ramena se nazývají akceptorové, dihydrouracilové (D-rameno), pseudouridinové (T-rameno), variabilní a antikodonové (obrázek 10). Jediné akceptorové rameno netvoří smyčku, ale obsahuje prodloužení volné 3′ hydroxylové skupiny a slouží k připojení aminokyselin esterovou vazbou. D-rameno

je rozpoznávací místo pro enzym aminoacyl tRNA syntetázu. T-rameno slouží jako vazebné místo pro ribozom. Antikodonové rameno je tvořeno zhruba 6 páry bází a je zakončeno smyčkou 7 nepárových bází. Z těchto nepárových bází tvoří prostřední tři antikodon. Antikodon rozpozná ve struktuře mRNA kodon a váže se na něj pomocí vodíkových vazeb. Terciární struktura má tvar písmene L. Akceptorové a T-rameno se naskládají na jednu stranu a antikodonové a D-rameno se složí do pravého úhlu proti zbylým dvěma. Vzniká tak velmi stabilní struktura udržovaná vodíkovými můstky. Kromě syntézy bílkovin se tRNA podílí na neproteinových procesech, například zastává funkci primeru při reverzní transkripci [94, 100, 101].



Obrázek 10: Sekundární struktura tRNA (převzato a upraveno z [102]).

1.11.3. rRNA

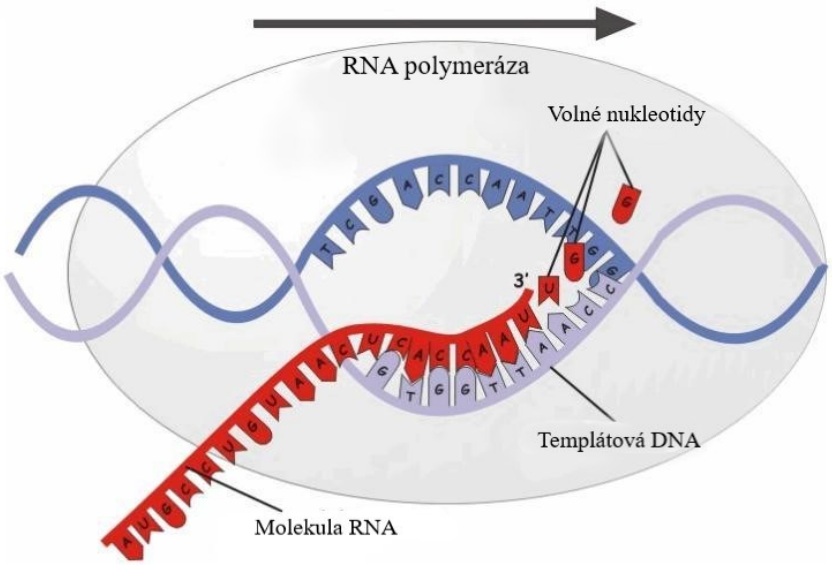
Ribozomální RNA je spolu se specifickými bílkovinami součástí ribozomů. Je to ribozym, který funguje jako peptidyltransferáza, tedy enzym umožňující vytváření peptidových vazeb při syntéze proteinů. Vzniká v jadérku. Tvoří až 60 % ribozomů. Eukaryotický ribozom má Svedbergův koeficient 80S. Je tvořen velkou 60S a malou 40S podjednotkou. Malá podjednotka je složena ze dvou krátkých molekul (pod 200 nukleotidů)

a velká podjednotka je složena ze dvou velkých molekul. Delší z nich (28S) má více než 5 kb a kratší (18S) má délku přibližně 2 kb [94, 103].

Udává tvar ribozomu. Má trojrozměrnou strukturu, skládající se z vnitřních smyček a šroubovic, vytvářející specifická místa a to akceptorové (A), peptidylové (P) a výstupní (E). Akceptorové místo slouží pro navázání příchozí tRNA obsahující aminokyselinu. Peptidylové místo na sebe váže rostoucí polypeptid. Výstupní místo slouží pro navázání tRNA po vytvoření peptidové vazby. Dále má molekula místo pro navázání ribozomálních proteinů a je schopna rozlišit proteiny a zbytky RNA [94, 104].

1.12. Transkripce

Transkripce je proces, kdy se vytváří molekula mRNA se sekvencí komplementární k určitému malému úseku DNA. Tato RNA nese proteinovou informaci genu zakódovanou v DNA. Jedná se o enzymatický proces a jako enzym se využívá DNA dependentní RNA polymeráza (RNA polymeráza). Tento enzym vyhledává v molekule DNA iniciační místa, neboli promotory, což jsou specifické sekvence nukleotidů. Příkladem takové sekvence je TATA, kde se opakují báze adenin a thymin, nebo sekvence CAT. K funkčnosti RNA polymerázy je třeba, aby obsahovala tzv. jádro enzymu, skládající se z pěti podjednotek (dvou α, jedné β, jedné β' a ω) a proteinovou jednotku zvanou *sigma* faktor. RNA polymeráza přiřazuje k DNA řetězci komplementární nukleotidy. Po zahájení syntézy RNA se uvolní *sigma* faktor a umožní jádru polymerázy pokračovat v syntéze, dokud nenarazí na signál ukončení. Vždy dochází k přepisu pouze jednoho vlákna, což je vlákno pracovní. Druhé vlákno pro transkripci daného genu nemá význam. Transkripce probíhá vždy od 5´ konce k 3´ konci. mRNA se přesouvá z buněčného jádra do buněčné cytoplazmy, kde dochází k translaci [105, 106, 107, 108]. Schéma transkripce je na obrázku 11.



Obrázek 11: Schéma transkripce (převzato a upraveno z [109]).

1.12.1. Regulace transkripce

Transkripční regulace je zásadní biologický proces, který umožňuje buňce, nebo organismu reagovat na různé vnitřní a vnější podněty, definovat svou identitu během vývoje a udržovat ji po celý život. Tento mechanismus je vysoce dynamický a zahrnuje řadu biofyzikálních dějů, které jsou řízeny velkým počtem molekul. Funkce těchto molekul sahají od specifických interakcí mezi DNA a proteinem až po nábor a sestavování nukleoproteinových komplexů [110, 111].

Iniciace transkripce je regulována několika faktory jako jsou promotory, regulační sekvence, regulační proteiny a DNA vazebné domény. Promotory jsou počáteční místo transkripce a určují její směr. Na regulační sekvence se vážou regulační proteiny a regulují kdy je gen transkribován. Regulační proteiny rozpoznají danou sekvenci díky svému specifickému povrchu, neboli DNA vazebné doméně, kterou se vážou na určitý úsek DNA [110, 111, 112].

Do regulace transkripce jsou zapojeny mimo jiné nekódující RNA. Mezi ně patří miRNA, snoRNA, lncRNA a další. Každá molekula má různé regulační funkce a náleží do komunikační sítě řídící produkci proteinu [110, 111].

1.12.2. Reverzní transkripce

Reverzní transkripce je děj, při kterém dochází k přepisu sekvence nukleotidů z RNA do DNA. Je to tedy obrácená buněčná transkripce. Vzniká komplementární

jednovláknová DNA. Reverzní transkripce je katalyzovaná enzymem RNA-dependentní-DNA polymerázou, neboli reverzní transkriptázou (RTáza). Enzym byl objeven v roce 1970 [113, 114].

Je to důležitá součást v životním cyklu retrovirů. Nejprve se navážou na receptorový protein hostitelské buňky, rozloží membránu a vlákna RNA se dostanou do buňky. Následně reverzní transkriptáza vyrobí z původní retrovirové RNA komplementární DNA. RNA zaniká a vzniklá DNA se replikuje a pomocí integrázy se včlení do DNA hostitelské buňky. Syntézou mRNA z této DNA se retrovirus množí [114, 115].

Vzniklá DNA je odolnější vůči degradaci oproti RNA. Z toho důvodu se proces využívá v laboratořích, kdy se z RNA syntetizuje komplementární DNA, která je použita pro další experimenty [113].

1.13. Izolace RNA

Extrakce RNA, DNA a bílkovin je nejdůležitější metodou v molekulární biologii. Je to výchozí bod pro navazující postupy. Nukleové kyseliny je možné izolovat z biologického materiálu, jako jsou tkáně, buňky, nebo třeba virové částice [116, 117, 118].

Při izolaci RNA je možné získat pouze mRNA, nebo celkovou RNA, obsahující kromě mRNA i rRNA, tRNA a další typy RNA. Častěji se používá izolace celkové RNA. Izolace se provádí různými způsoby. Často se využívá metody s kolonkami, kde se RNA z připraveného lyzátu, naváže na pevný nosič (nejčastěji modifikovaný silikagel). Je možné využít i metodu používající k izolaci fenol-chloroform, nebo se velmi často používají nejrůznější komerčně dostupné sady na izolaci [116, 117, 118].

1.13.1. Manipulace s biologickým materiálem

Při práci s RNA je nutné brát ohled na to, že je velmi náchylná na působení ribonukleáz (RNáz). Z toho důvodu se při práci s RNA musí dodržovat čistota, používat rukavice a používat voda neobsahující RNázy.

Pokud dojde ke kontaminaci RNázami, dochází k degradaci vzorku. Kontaminaci je možné poznat na elektroforéze, kdy místo dvou celistvých proužků (odpovídajících ribozomálním podjednotkám 18S a 28S, které tvoří až 80 % celkové RNA) vznikne více proužků, které jsou rozmazané (degradovaná RNA).

Pro stabilizaci vzorků, určených pro izolaci RNA, lze využít stabilizátory např. RNA later, případně Trizol Reagent (ten lze využít i pro izolaci RNA). Takto ošetřené vzorky lze skladovat i několik měsíců při teplotě -80 °C, aniž by došlo k degradaci vzorku.

Při kontaminaci genomovou DNA se do roztoku přidává DNáza [116, 117].

1.13.2. Obecný postup

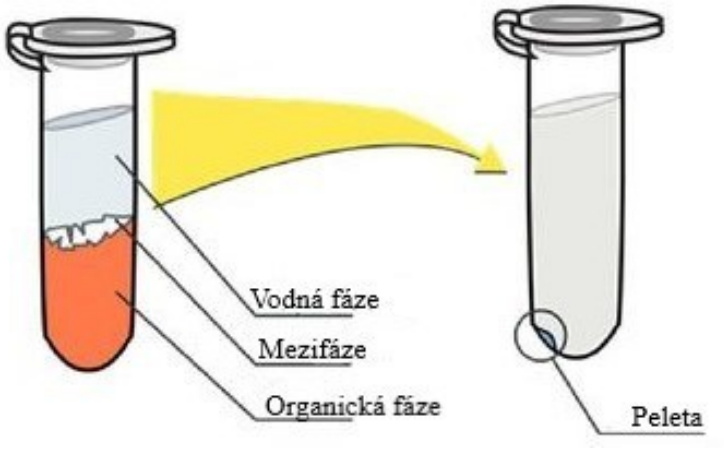
Obecný postup izolace RNA se skládá z několika základních kroků. Nejprve je třeba rozbít buněčnou stěnu a uvolnit RNA z buněk. Používají se fyzikální i chemické postupy. V případě fyzikálních postupů je příkladem rozrušení membrány pomocí ultrazvuku. Při chemické lýze se používají detergenty, například dodecylsulfát sodný (SDS), soli žlučových kyselin, nebo Triton X100. Dále je třeba zajistit inhibici RNáz. V některých případech jsou inhibitory RNáz obsaženy v lyzačním pufru, ale někdy je třeba inhibitory do směsi přidat.

Následně se musí RNA přečistit od detergentů a dalších složek, obsažených v lyzačním roztoku. Jedná se především o odstraněni proteinů, solí a dalších nečistot. K odstranění proteinů se používá například proteináza K, nebo opakovaná extrakce směsí organických rozpouštědel.

Posledním krokem izolace je precipitace RNA. Provádí se pomocí alkoholu, především ethanolu, nebo izopropanolu. Někdy se používá kombinace alkoholu se solí, čímž se zvýší účinnost srážení [116, 119, 120].

Častým problémem při izolaci je kontaminace DNA, která způsobuje falešně pozitivní výsledky. Z toho důvodu se k vyizolované RNA přidávají DNázy, odstraňující stopy genomové DNA [116, 120].

V dnešní době existuje mnoho metod pro izolaci RNA. Často se RNA izoluje pomocí fenolu, nebo Trizolu, což je směs guanidinium (iso)thiokyanátu a fenolu. Po přidání chloroformu ke směsi a odstředění se vytvoří tři vrstvy (obrázek 12). Spodní organická, střední obsahující proteiny a horní fáze obsahující RNA. Horní fáze se odebere, vysráží, promyje a rozpustí v RNáza free vodě [119, 120].



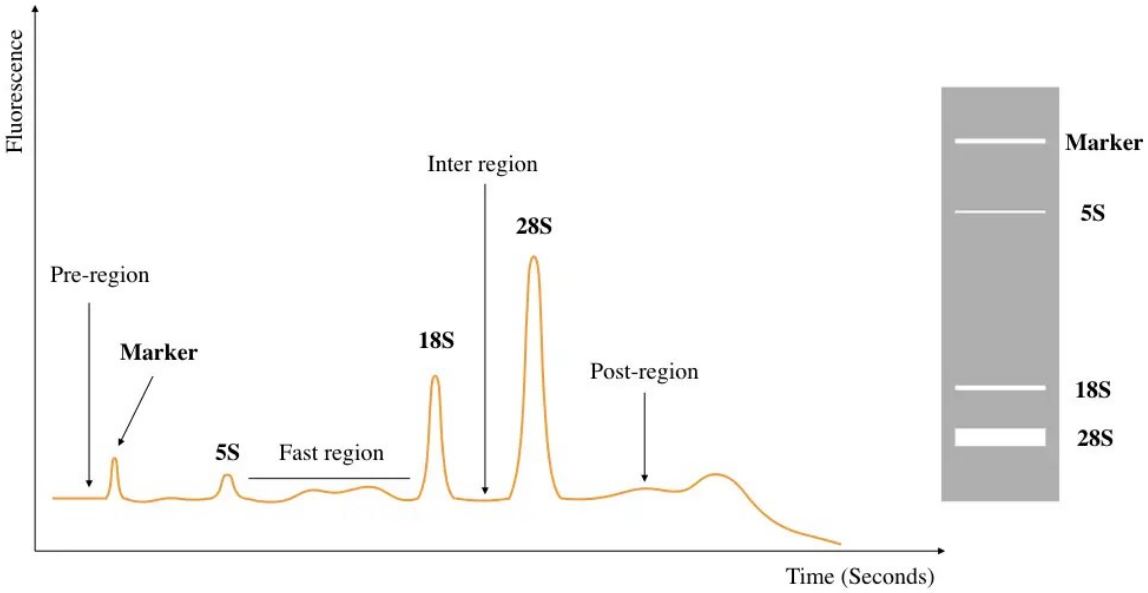
Obrázek 12: Izolace RNA pomocí fenol-chloroformu (převzato a upraveno z [121]).

Zároveň se již vyrábí sady na izolaci nukleových kyselin. Často jsou tyto sady založené na technologii kolonek, kdy se RNA uchytí na silikagelu při vysokém pH pufru. Když se odstraní všechny nečistoty a zbytky buněk, RNA se eluuje do čisté zkumavky. Takto získaná RNA je obvykle velmi čistá [119].

1.13.3. Stanovení koncentrace a čistoty

Pro stanovení čistoty a koncentrace nukleových kyselin se používá UV spektrofotometrie. Při spektrofotometrickém stanovení mají NK, kvůli přítomnosti dusíkatých bází, maximum při vlnové délce 260 nm. Proteiny mají maximum při 280 nm, a to z důvodu přítomnosti aromatických aminokyselin. Stupeň čistoty NK se tedy stanovuje z poměru absorbancí při 260 a 280 nm. V případě RNA by poměr měl mít hodnotu přibližně 2. Výrazně vyšší či nižší hodnoty znamenají kontaminaci, obvykle proteiny [122, 123, 124].

Jak již bylo psáno v kapitole 1.13.1. Manipulace s biologickým materiálem, RNA je velmi náchylná k degradaci. Po elektroforéze je možné měřit fragmenty 28S a 18S, které by měly být v poměru 2:1. Toto hodnocení však bývá nepřesné. Z toho důvodu bylo vyvinuto hodnocení podle čísla RIN (RNA integrity number), které přesněji určí kvalitu a integritu RNA. Integrita RNA představuje, jak je RNA neporušená. Hodnotí se na stupnici od 10 do 1, kdy číslo 10 znamená vynikající integritu a 1 horší integritu. Pro stanovení integrity se používá metoda vyvinutá společností Aligent Technologies. RIN se stanovuje pomocí kapilární elektroforézy, kde se pozorují pásy 18S a 28S rRNA [125, 126, 127]. Vyhodnocení RIN je znázorněno na obrázku 13.



Obrázek 13: Grafické znázornění vyhodnocení RIN (převzato z [125]).

1.13.4. Elektroforéza

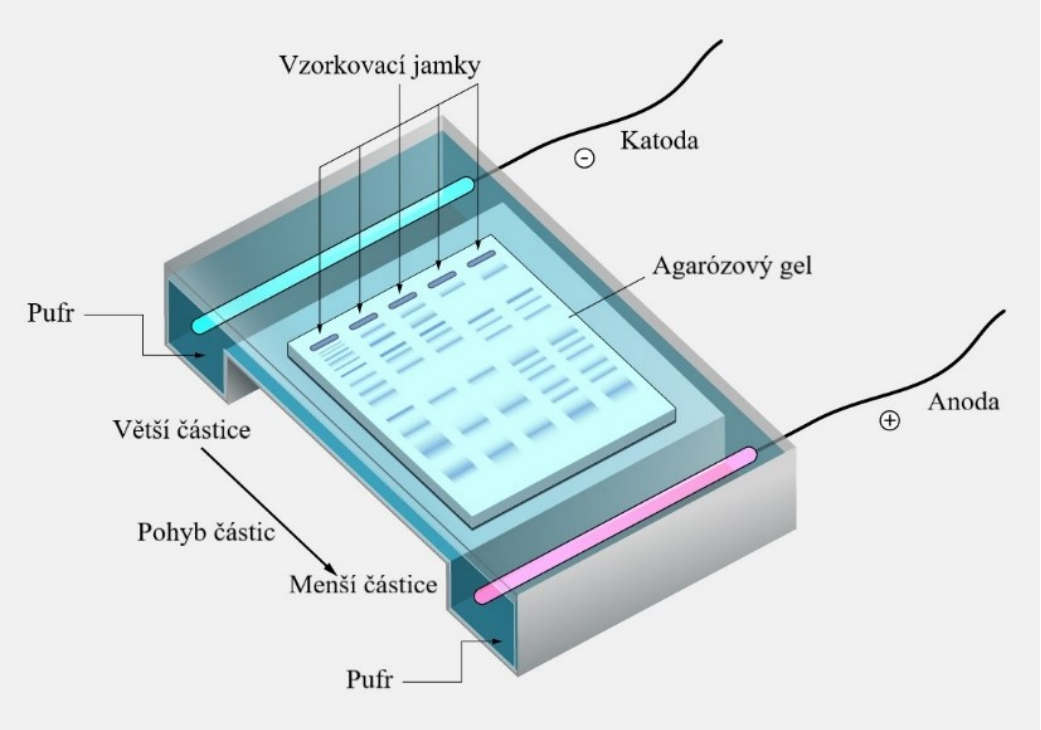
Gelová elektroforéza je metoda, používající se k separaci směsí DNA, RNA, nebo proteinů. Separace probíhá na základě velikosti a náboje částic. NK mají kvůli přítomnosti fosfátové skupiny záporný náboj a z toho důvodu se pohybují směrem ke kladné elektrodě, neboli anodě. Ve většině případů se delší fragmenty pohybují pomaleji než kratší fragmenty [128, 129, 130].

Gel může být vyroben například z agarózy. Agaróza je polysacharid, který se skládá z podjednotek agarobiózy a získává se z mořských řas. Za tepla se rozpustí v pufru, který je zároveň v elektroforetické vaně použit jako elektrolyt. Ochlazením roztok tuhne a vytváří se gel. Jednotky agarózy se nekovalentně spojují a vytváří síť. Velikost pórů v síti určuje vlastnosti gelu pro separaci. Po ztuhnutí se gel přemístí tak, aby směřoval ke správné elektrodě a zalije se pufrem. Pufr zajišťuje přenos proudu a udržování konstantního pH média [128, 129, 131, 132].

Vzorky NK se smísí s nanášecím pufrem, zajišťujícím klesnutí vzorků do jamek. Následně se takto upravené vzorky nanáší do jamek v gelu, které vznikly použitím hřebínku. Do jedné jamky se vkládá marker, sloužící k porovnání velikosti fragmentů. Do gelu se přidává barvivo, aby po proběhnutí elektroforézy bylo možné vzorky zviditelnit [128, 129, 131, 132].

Průběh elektroforézy může narušovat teplota gelu, která se zvyšuje s dobou trvání elektroforézy. Způsobuje zvýšení náhodného pohybu molekul a tím se snižuje ostrost

oddělených fragmentů. Dalším rušivým vlivem mohou být nespecifické adsorpční skupiny na gelu. Dochází k vazbě analytu na tyto skupiny a tím se snižuje jeho pohyblivost v gelu [128, 132]. Schéma elektroforézy je na obrázku 14.



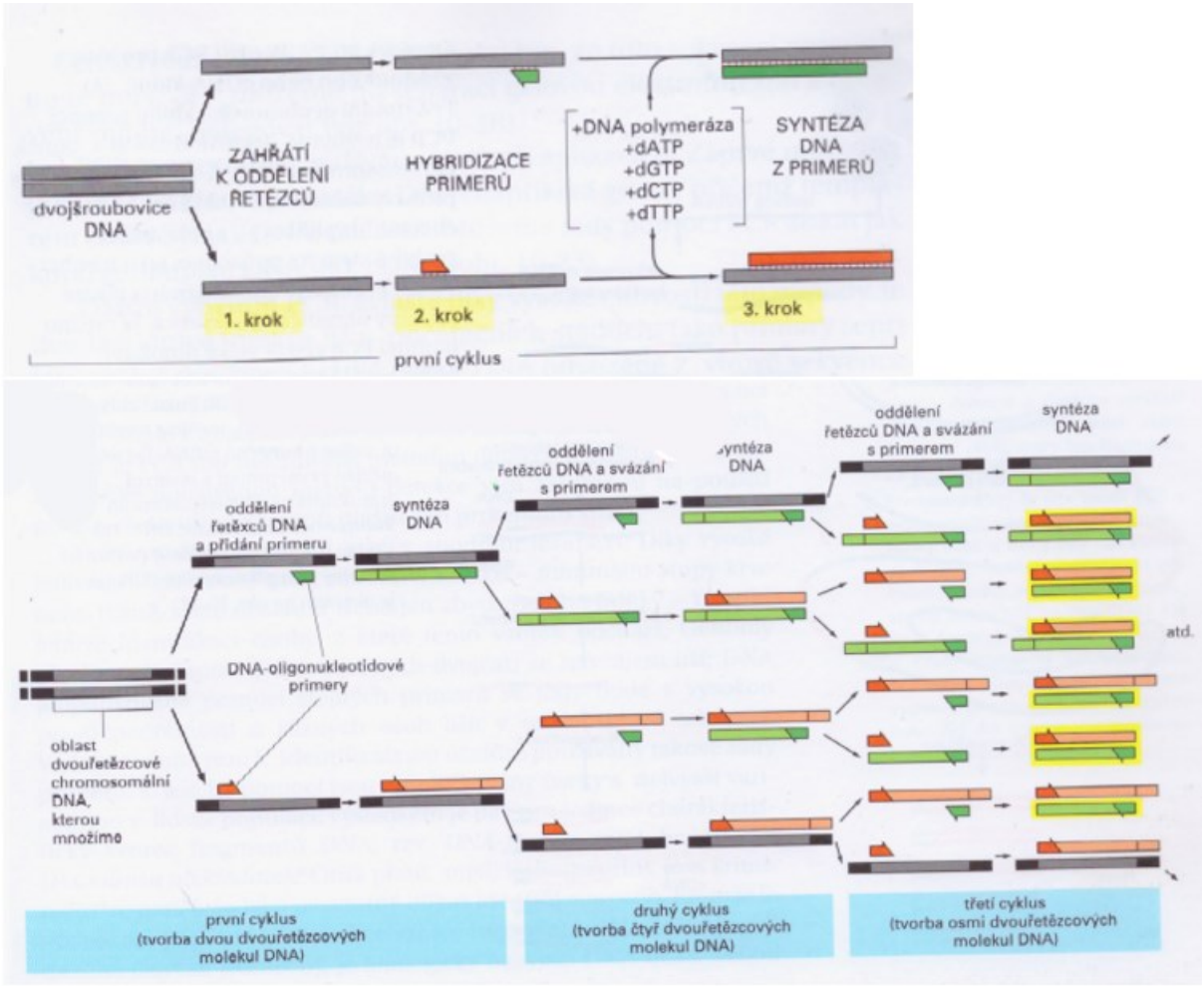
Obrázek 14: Schéma gelové elektroforézy (převzato a upraveno z [133]).

1.14. Polymerázová řetězová reakce

Polymerázovou řetězovou reakci (PCR) významně vylepšil v 80. letech minulého století Kary Mulis. Je důležitou metodou v molekulární biologii, protože exponenciálně amplifikuje nukleové kyseliny. Z jedné kopie DNA, nebo RNA vzniká několik milionů kopií DNA. Jedná se o cyklický proces, který je závislý na teplotě. Spojuje hybridizaci nukleových kyselin s jejich replikací [134, 135, 136].

Pro proběhnutí reakce musí směs obsahovat několik složek, a to templátovou DNA, primery, nukleotidy a polymerázu. Templátová DNA je vzorek obsahující danou sekvenci. Primery jsou úseky nukleové kyseliny o délce 20-25 nukleotidů, komplementární k dané sekvenci. Slouží jako výchozí bod pro syntézu druhého řetězce. Ohraničují část nukleové kyseliny, která má být namnožena. Nukleotidy slouží ke stavbě vlákna. Přidávají se za primer a tvoří tak komplementární řetězec k původnímu řetězci. DNA polymerázy jsou enzymy syntetizující nová vlákna NK komplementární k cílové sekvenci. Spojují jednotlivé nukleotidy, a tak vzniká produkt PCR [135, 136, 137].

Tyto složky se smíchají ve zkumavce a dají do termocykleru, kde se podle programu v cyklech mění teplota. Postup zahrnuje tři hlavní fáze a to denaturaci, annealing a elongaci. Nejdříve se reakční směs zahřeje na 95 °C. Při této teplotě dochází k disociaci vodíkových vazeb mezi bázemi ve dvouřetězcové DNA, a tedy k denaturaci. Následně se teplota sníží na 37-72 °C, čímž dochází k nasedání primerů na dané segmenty jednovláknové NK. Tato fáze se nazývá annealing. Posledním krokem je elongace, kdy se opět zvýší teplota. Pomocí DNA polymerázy dochází k prodlužování primeru postupným přidáváním nukleotidů na 3´konec a vznikají tak dvě molekuly dvouvláknové DNA. Tento proces se opakuje a s každým opakováním se počet NK zdvojnásobí (obrázek 15) [135, 137, 138, 139].



Obrázek 15: Schéma PCR, horní části 1. krok denaturace, 2. krok annealing a 3. krok elongace, v dolní části znázornění opakování PCR v cyklech (převzato z [140]).

PCR produkty se analyzují pomocí elektroforézy na agarózovém gelu, kde dochází k oddělení produktů podle jejich velikosti a náboje. Pro vizualizaci produktů se do gelu přidává ethidium bromid, který se vmezeří mezi dva řetězce. U některých typů PCR, jako je například

PCR v reálném čase, se značí primery, nebo nukleotidy pomocí fluorescenčních barviv, která se přidávají do reakční směsi před proběhnutím reakce [137, 141].

1.14.1. Druhy PCR

Technika PCR se vyvíjela, a to vedlo ke vzniku mnoha typů PCR. Některé jsou zde uvedeny.

Multiplexní PCR umožňuje současnou amplifikaci více cílů v jedné reakci pomocí dvou, nebo více párů primerů. Tímto způsobem se generuje více typů amplikonů, které se liší svou délkou. Výhodou je úspora času, práce i nákladů. Při vývoji hraje důležitou roli návrh primerů, které musí být navrženy tak, aby měly podobnou vhodnou teplotu annealingu. S počtem amplikonů se zvyšují nároky na celý systém. Produkty musí mít různé velikosti, aby byly snadno vizualizovatelné a odlišitelné na agarózovém gelu. Tato metoda se používá u různých genetických onemocnění, u nichž se zná více mutací ovlivňujících rozvoj nemoci [142, 143, 144, 145].

Kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR) umožňuje detekci produktů reakce a zároveň jejich kvantitativní stanovení během reakce. Lze stanovit výchozí koncentraci DNA, čímž se odstraňuje potřeba použití elektroforézy. K detekci a kvantifikaci se používají například fluorescenční barviva, vmezeřující se do DNA, nebo také specifické fluorescenčně značené DNA sondy. V obou případech platí, že se zvyšujícím se počtem kopií DNA úměrně roste fluorescence. Tímto způsobem je možné stanovit množství produktu v reálném čase [137, 146].

Další modifikací je digitální PCR (dPCR). Reakce se rozdělí do stovek až milionů menších dílčích reakcí. Toho je dosaženo použitím mikrotitračních destiček, čipů, nebo kapek olejové emulze. Amplifikace následně probíhá v každé části. Po proběhnutí reakce se vyhodnocuje každá část zvlášť. Hodnotí se pozitivita, nebo negativita výsledného signálu v každé části. Pokud v dané části reakce neproběhla, hodnotí se číslem 0. Pokud reakce proběhla, označí se číslem 1. Počáteční počet kopií a hustota cílové DNA se počítá pomocí počtu pozitivních reakcí [147, 148, 149].

Alelově specifická PCR je modifikace, pomocí níž lze na základě amplifikace PCR rozlišit alely, lišící se jedním a více nukleotidy [150].

1.14.2. Kvantitativní PCR s reverzní transkripcí (RT-qPCR)

Většina metod PCR se vztahuje pouze na DNA. Pokud chceme použít PCR pro stanovení a kvantifikaci RNA, je třeba použít reverzní transkripční PCR. Je to poměrně citlivá a nenákladná technika pro stanovení úrovně exprese cílových genů. Proces RT-PCR zahrnuje kombinaci reakce reverzní transkripce s reakcí založenou na PCR amplifikaci. Cílem je vytvoření cDNA z mRNA. Templátem pro reverzní transkriptázu je sekvence RNA. Vzniklá jednovláknová DNA v další reakci funguje jako templát pro PCR reakci. Za účelem cílení na specifické známé kódující oblasti se používají primery. Reakci je možné provádět v jednom, nebo dvou krocích. Pro detekci vzniklých produktů se používá fluorescenční barvivo. Se zvyšujícím se počtem kopií cDNA roste fluorescence a je tak možné stanovit množství produktu [151, 152, 153].

Pro kontrolu správného průběhu reakce se využívá křivka tání, která udává, jak se mění fluorescence při postupném zvyšování teploty. Případné vzniklé nespecifické produkty mají obvykle nižší teplotu tání než specifické produkty. Pokud má výsledná křivka tedy pouze jeden vrchol, vznikají pouze specifické produkty. Pokud však má vrcholů více, tak v reakci vznikají také nespecifické produkty [154].

2. Praktická část

2.1. Cíle práce

Cílem práce bylo kultivovat *C. albicans* a *C. parapsilosis* za různých stresových podmínek, konkrétně při různých zdrojích uhlíku. Z takto nakultivovaných kvasinek vyizolovat RNA a tu následně analyzovat pomocí RT-qPCR. Hlavním cílem bylo ze získaných dat zhodnotit, jak se liší transkripce za různých podmínek u obou kvasinek.

2.2. Chemikálie

2.2.1. Použité kity

DNase I, RNase-Free (Thermo Scientific)

EliZyme™ OneS Green Kit (Elisabeth Pharmacon)

EmeraldAmp® GT PCR Master Mix (Takara Bio)

Quick-RNA™ Viral Kit (Zymo Research)

2.2.2. Ostatní chemikálie

Agar (Sigma Aldrich)

Agaróza (Sigma Aldrich)

Diethylester kyseliny uhličité – DEPC (Carl Roth)

DNA marker 200-1500 (Top-Bio)

Ethanol (Penta)

Galaktóza (Sigma Aldrich)

Glukóza (Penta)

Glycerol (Sigma Aldrich)

Hovězí sérový albumin – BSA (Sigma Aldrich)

Hydroxid draselný (Penta)

Hydroxid vápenatý (Lachema)

Chlorid sodný (Lach-ner)

Chloroform (Penta)

Izopropylalkohol (Lach-ner)

Kyselina boritá (Lach-ner)

Kyselina ethylendiaminotetraoctová – EDTA (Sigma Aldrich)

Kyselina citronová (Penta)

Kyselina mléčná (Carl Roth)

Kyselina octová (Penta)

Lennox L Broth Base – LB (Invitrogen)

Močovina (Lach-ner)

PCR Ethidium bromid (Top-Bio)

PCR vkládací pufr (Top-Bio)

TRI Reagent Solution (Invitrogen)

Tris-borát-EDTA pufr - TBE(Trizma base 108 g, kyselina boritá 55 g a EDTA 9,3 g)

Trizma base (Sigma Aldrich)

Voda bez RNáz

Yeast Nitrogen Base Without Amino Acids - YNB (Sigma Aldrich)

2.3. Používané kmeny

Kmen *C. albicans*

- SC5314 – kontrolní kmen

Kmen *C. parapsilosis*

- P69 – mykologická sbírka Lékařské fakulty Univerzity Palackého, Olomouc

2.4. Použité primery

V tabulce 2 jsou uvedeny primery použité pro PCR a RT-qPCR.

Tabulka 2: Primery použité do RT-qPCR. Tm – teplota tání, CaPho15-F – forward primer *PHO15* pro *C. albicans*, CaPho15-R – reverse primer *PHO15* pro *C. albicans*, CpPho15-F – forward primer *PHO15* pro *C. parapsilosis*, CpPho15-r – reverse primer *PHO15* pro *C. parapsilosis*, CaAct F – forward primer aktinu pro *C. albicans*, CaAct-R – reverse primer aktinu pro *C. albicans*, CpAct-F – f orward primer aktinu pro *C. parapsilosis*, CpAct-R – reverse primer aktinu pro *C. parapsilosis.*

Jméno	**Sekvence 5´-3´**	**Délka produktu [bp]**	**Tm [°C]**	**Délka Primeru [bp]**
CaPho15-F	GGAATTGAACAGGAATTGCAC	151	50,3	21
CaPho15-R	ACACTAACCCACACAAAACAC	151	51,1	21
CpPho15-F	TGGGTATTGGGTGAAGAAGG	161	50,9	20
CpPho15-R	CCACAAACAACACAACCAAC	161	50,5	20
CaAct-F	TGAAGCCCAATCCAAAAGAG	153	50,1	20
CaAct-R	TCGGTCAACAAAACTGGATG	153	50,5	20
CpAct-F	CGAAGCCCAATCAAAGCGCG	153	50,8	20
CpAct-R	TCAGTCAACAAAACTGGGTG	153	50,3	20

2.5. Přístroje

Blokový termostat SBH 200D (Stuart)

Centrifuga HERMLE Z 383 (Biotech)

Centrifuga MiniSpin (Eppendorf)

Centrifuga Sorvall LYNX 6000 (Thermo Scientific)

Enviromental Shaker-Incubator ES-20/60 (Biosan)

FTIR spektrometr Nicolet 6700 s ATR nástavcem Pike MIRacle™ osazený krystalem ZnSe (Scinco)

Inkubátor INCU-Line (VWR)

Mikrovlnná trouba (LG)

PCR cykler Biometra Tadvanced (Analytik Jena)

pH metr Fisherbrand accumet AB150 (Fisher Scientific)

PowerPac Basic Power Supply (Bio-Rad)

Rotor-Gene RG-3000A (Corbett Research)

Třepačka Reax Top (Heidolph)

UV transluminátor (Ultra-Lum)

Váhy EMB 200-3 (Kern)

2.6. Ostatní materiály

Automatické pipety (Eppendorf Research)

Elektroforetická vana s příslušenstvím

Erlenmayerova baňka

Kádinka

Klávovací páska

Mikrofiltry (0,22 μm)

Odměrná láhev

Odměrný válec

Parafilm (Bemis)

Pinzeta

Plastový materiál na jednorázové použití (bakteriologické misky, pipetovací špičky, rukavice, mikrozkumavky, zkumavky)

2.7. Metodika

2.7.1. Příprava zásobních inokul

Do 50 ml sterilních zkumavek obsahujících 25 ml média YNB-Glu 1% se vyočkovaly buňky *C. albicans* a *C. parapsilosis*. Buňky rostly cca 18-24 hodin až do OD_{600} = 2. Do mikrozkumavek se napipetovalo 100 µl 50% glycerolu. Do glycerolu se přidalo 150 µl z kultur narostlých v médiu. Takto připravená inokula se skladovala při -80 °C.

2.7.2. Příprava Vaginal simulation fluid (VSF) média

VSF médium obsahovalo NaCl (3,51 g/l), KOH (1,4 g/l), $Ca(OH)_2$ (0,222 g/l), glycerol (0,16 g/l), kyselinu octovou (1 g/l), močovinu (0,4 g/l) a glukózu (5 g/l). Po úpravě pH na hodnotu 4,2 se roztok sterilizoval v autoklávu. Následně se v 5,6 ml destilované vody rozpustila kyselina mléčná (2 g/l) a BSA (0,018 g/l) a tento roztok byl pomocí stříkačky a mikrofiltru přidán do média.

2.7.3. Příprava YNB média s 2% glukózou, 2% galaktózou a 2% glycerolem

YNB médium se skládalo z 0,7% YNB, 20 mM citrátu a 2% glukózy. Pro přípravu média s galaktózou a glycerolem se místo glukózy přidávala 2% galaktóza, případně glycerol. Následně se pH upravilo na hodnotu 7 a médium se sterilizovalo v autoklávu.

2.7.4. Růstová křivka

Do šesti Erlenmayerových baněk o objemu 250 ml se nalilo 50 ml VSF média, YNB média s galaktózou, nebo YNB média s glycerolem. Do tří baněk se přidalo 80 µl ze zásobního inokula *C. albicans* a do dalších tří 80 µl ze zásobního inokula *C. parapsilosis.* Baňky se inkubovaly v třepačce a po určitých časových intervalech se měřila optická hustota.

2.7.5. Izolace RNA pomocí Trizol Reagentu

Buňky se resuspendovaly v 1 ml Trizol Reagentu, dobře se promíchaly a inkubovaly 5 min při laboratorní teplotě. Do mikrozkumavky s buňkami bylo přidáno 200 µl chloroformu a následně byl obsah mikrozkumavky promíchán třepáním. Suspenze se odstřeďovala 15 min při 13 000 RPM. Vniklé fázové rozhraní je tvořeno horní vodnou fází, která obsahuje RNA, mezifází a fenolovou fází, obsahující DNA a proteiny. Do čisté mikrozkumavky se odebrala vodní fáze, obsahující RNA, bylo k ní přidáno 500 µl isopropanolu a inkubovala se 10 min při laboratorní teplotě. Směs se odstřeďovala 10 min při 12 000 RPM. Na dně zkumavky vznikla průhledná peleta. Supernatant se opatrně odebral a peleta byla promyta 1 ml 75% ethanolu. Roztok se odstřeďoval 5 min při 7 500 RPM, odstranil se supernatant a otevřená zkumavka se nechala proschnout. RNA se resuspendovala v RNase-free vodě. Mikrozkumavka se inkubovala v termobloku při 55 – 60 °C po dobu 15 min. Výtěžek a čistota RNA se zjišťovala proměřením absorbance vzorku na spektrofotometru při vlnových délkách 260 a 280 nm.

2.7.6. Izolace RNA pomocí sady Quick-RNA^{TM} Viral Kit

Ze vzorku zásobního inokula bylo do mikrozkumavek odpipetováno 80 µl buněčné suspenze. K suspenzi se přidalo 120 µl sterilní vody. K suspenzi bylo přidáno 400 µl roztoku Viral RNA Buffer. Směs se promíchala a převedla do kolonky Zymo-Spin IC, která byla v mikrozkumavce. Směs se odstřeďovala 2 min při 7500 RPM. Kolonka se přenesla do nové mikrozkumavky, přidalo se na ni 500 µl promývacího pufru Viral Wash Buffer a odstřeďovala se 30 s při 7500 RPM. Roztok, který prošel kolonkou, se odstranil

a opakovalo se promývání. Následně bylo na kolonku přidáno 500 µl 96% ethanolu. Směs se odstřeďovala 1 min při 7500 RPM a následně se kolonka přenesla na sterilní mikrozkumavku. Na matrix kolonky se přidalo 15 µl RNAse-free vody a centrifugovalo se 30 s při 7500 RPM.

2.7.7. Odstranění DNáz

Vzorky byly vytemperovány na pokojovou teplotu. Ke každému vzorku se přidalo 100 µl/ml reakčního pufru, 0,5 µl DNázy a vše se dobře promíchalo. Směs se inkubovala 30 min při 37 °C. Následně se inaktivovala DNáza přidáním 100 µl/ml 50 mM EDTA. Směs se opět promíchala a inkubovala 10 min při 65 °C.

2.7.8. RNA elektroforéza

Veškeré náčiní se vypláchlo DEPC vodou a vypeklo ve vysoké teplotě. Elektroforetická vana se umyla v několika krocích. Nejprve 5% SDS po dobu 1 h. Následně 0,1 M NaOH po 30 min. Pak 1% H_2O_2 dalších 30 min. Takto umytá vana se vypláchla DEPC vodou a následně ethanolem a nechala se proschnout. Používala se ten samý den, nebo byla překryta alobalem do dalšího dne.

Do 60 ml TBE pufru se přidalo 0,6 g agarózy. Směs se zahřívala v mikrovlnné troubě do úplného rozpuštění agarózy. Směs se zchladila na 50 °C. Než gel ztuhl, přidaly se do něho 4 µl ethidium bromidu o koncentraci 10 mg/ml. Gel se nalil do elektroforetické vany s hřebenem a nechal 20 min ztuhnout. Ztuhlý gel se přemístil tak, aby startovní pozice byla blíže katodě. Zalil se TBE pufrem, do první jamky bylo napipetováno 6 µl markeru smíchaného s nanášecím pufrem a do ostatních jamek bylo napipetováno 10 µl vzorku s nanášecím pufrem. Elektroforéza probíhala přibližně 30-40 min při 120 V. Následně se vypnul zdroj proudu, gel se vyndal z vany a prosvítil na UV světle.

2.7.9. PCR

Do mikrozkumavek se naředily primery ze zásobních 100 µmol/l na 10 µmol/l. Komponenty se smíchaly (tabulka 3). Po přidání všech komponent se směs dala do cykleru s programem:

1. Úvodní denaturace: 95 °C, 1 min
2. Denaturace: 98 °C, 10 s
3. Annealing: 50 °C, 30 s
4. Polymerace: 72 °C, 20 s

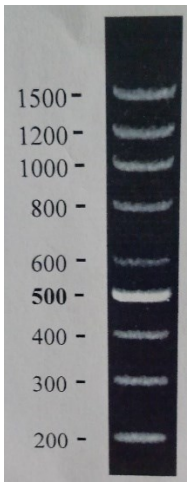
Denaturace, annealing a polymerace proběhly 30× a následovala závěrečná polymerace, 5 min při 72 °C. Následovala elektroforéza pro vizualizaci produktů.

Tabulka 3: Komponenty na jednu PCR reakci.

Reagencie	Objem [µl]
EmeraldAmp GT PCR Master Mix (2× Premix)	25
Templát	1
Forward primer	2
Reverse primer	2
PCR voda	20

2.7.10. DNA elektroforéza

Produkty z PCR reakce se vyjmuly z mrazáku a nechaly se rozmrznout. Do baňky bylo naváženo 0,6 g agarózového prášku. K agaróze se přidalo 60 ml TBE pufru. Směs se zahřívala v mikrovlnné troubě do rozpuštění agarózy. Pod tekoucí vodou byl roztok ochlazen na 50 °C. Následně se do roztoku přidaly 4 µl roztoku ethidium bromidu o koncentraci 10 mg/ml. Roztok se promíchal a přelil do elektroforetické vany s hřebínkem. Bubliny, které vznikly, se odstranily a gel se nechal 20 min ztuhnout. Nukleové kyseliny putují v alkalickém prostředí k anodě, a proto se gel natočil tak, aby jamky pro nanášení byly blíže katodě. Do elektroforetické vany se nalil TBE pufr, a tak došlo k vodivému spojení mezi elektrodami. Hřebínek byl z gelu vyjmut. Na parafilm se napipetovaly 2 µl nanášecího pufru a 10 µl vzorku. Po promísení kapek se do první jamky naneslo 6 µl markeru molekulových hmotností (obrázek 16) smíchaných se 2 µl nanášecího pufru. Do ostatních jamek se naneslo 10 µl vzorku. Po nanesení všech vzorků byla vana uzavřena elektroforetickým víkem a připojena ke zdroji elektrického napětí s nastavením na 110 V. Po několika minutách začala nukleová putovat směrem k anodě. Elektroforéza probíhala asi 40 min. Po uplynulém čase se vypnul zdroj elektrického napětí a odpojily se kabely. Gel se vyjmul z vany a přenesl se na UV transluminátor. V UV světle byly přes UV filtr vidět fluoreskující proužky nukleové kyseliny.



Obrázek 16: Použitý DNA marker 200-1500 bp (Top-Bio).

2.7.11. RT-qPCR

Primery se naředily na 10 μmol/l. Komponenty se smíchaly (tabulka 4). Pro každý vzorek se prováděly 2 stejné reakce. Jako standard se používaly primery aktinu. Do negativních kontrol se přidaly primery pro gen *PHO15*, ale nebyla přidána RTáza.

1. Reverzní transkripce: 50 °C, 10 min
2. Aktivace polymerázy: 95 °C, 2 min
3. Denaturace: 95 °C, 5 s
4. Annealing: 60 °C, 25 s

Denaturace a annealing proběhly 40×. Následně proběhla analýza křivky tání, která se prováděla při 50-95 °C.

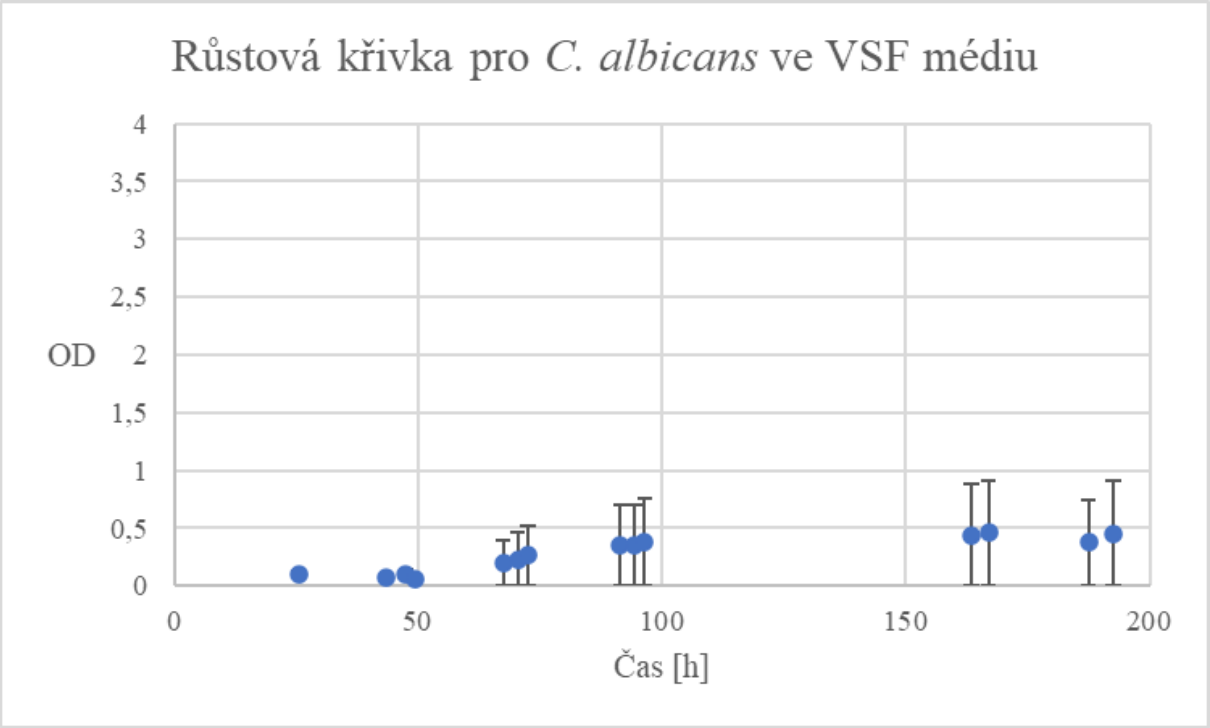
Tabulka 4: Komponenty na jednu reakci RT-qPCR.

Reagencie	Objem [µl]
EliZyme^{TM} OneS Green	10
Forward primer	0,8
Reverze primer	0,8
RTáza	1
Templát	1
PCR voda	6,4

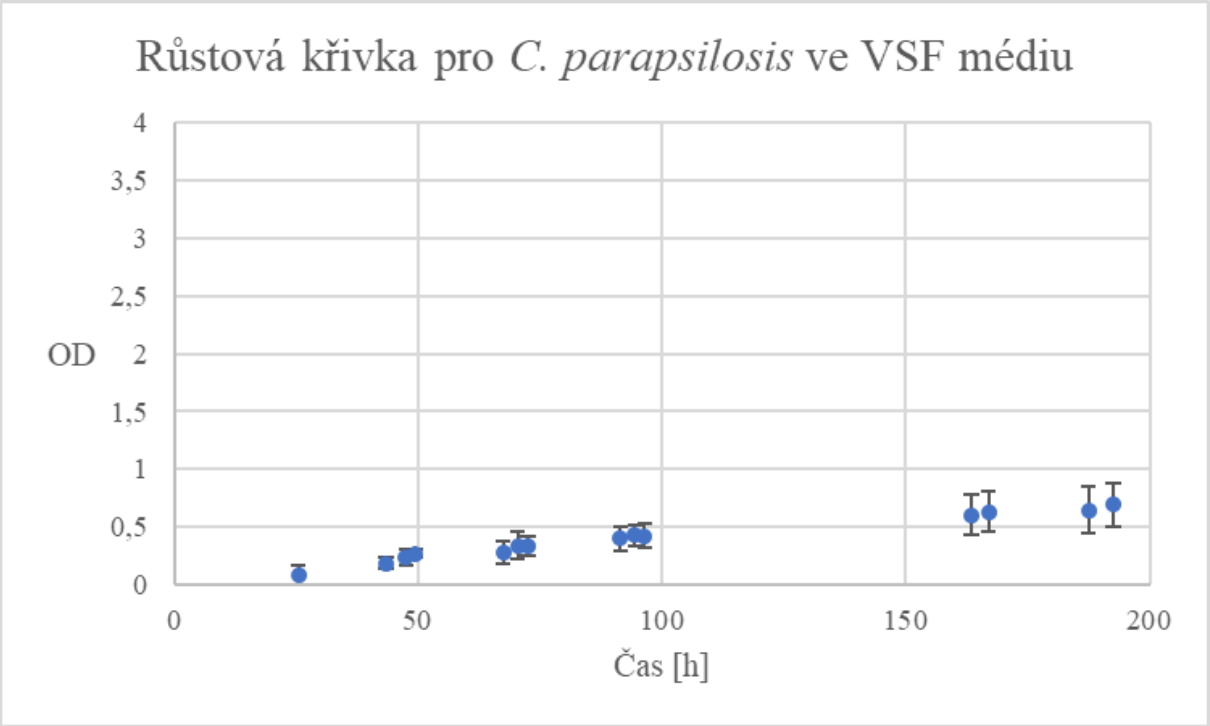
2.8. Výsledky a diskuze

2.8.1. Růstová křivka

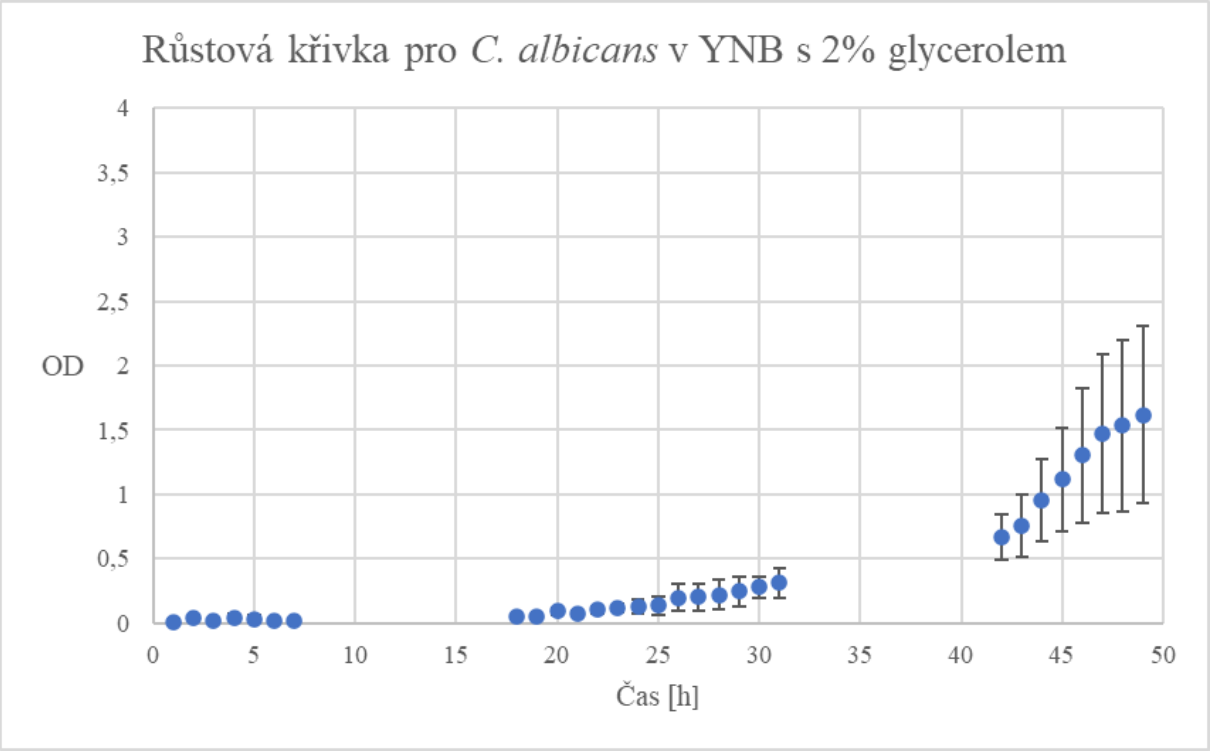
Abychom zjistili, jak dlouho je třeba *C. albicans* a *C. parapsilosis* kultivovat v různých médiích při použití různých zdrojů uhlíku, měřili jsme růstové křivky. Používalo se 50 ml média a 80 µl inokula dané kultury. Kvasinky se vždy inkubovaly při 37 °C. V určitých časových intervalech se měřila optická hustota (OD) kvasinek v médiu. Hodnoty jsme zpracovali jako růstovou křivku. Pro získání dostatečného množství RNA by bylo potřeba, aby OD dosahovala hodnoty 1. Jak je patrné z obrázků 17 a 18, v případě VSF média se nám nepodařilo dosáhnout hodnoty 1. Ovšem ze získaného množství bylo možné RNA vyizolovat. VSF médium jsme měřili pro *C. albicans* i *C. parapsilosis* a stanovili jsme optimální dobu růstu 96 h. Podle literatury jsme používali YNB médium s 2% glycerolem a 2% galaktózou. V případě YNB s glycerolem jsme použili *C. albicans*, která zde rostla poměrně lépe než ve VSF médiu (obrázek 19) a stanovili dobu růstu na 48 h. V případě YNB s galaktózou jsme použili *C. parapsilosis* (obrázek 20). Optimální dobu růstu jsme určili na 24 h [155].



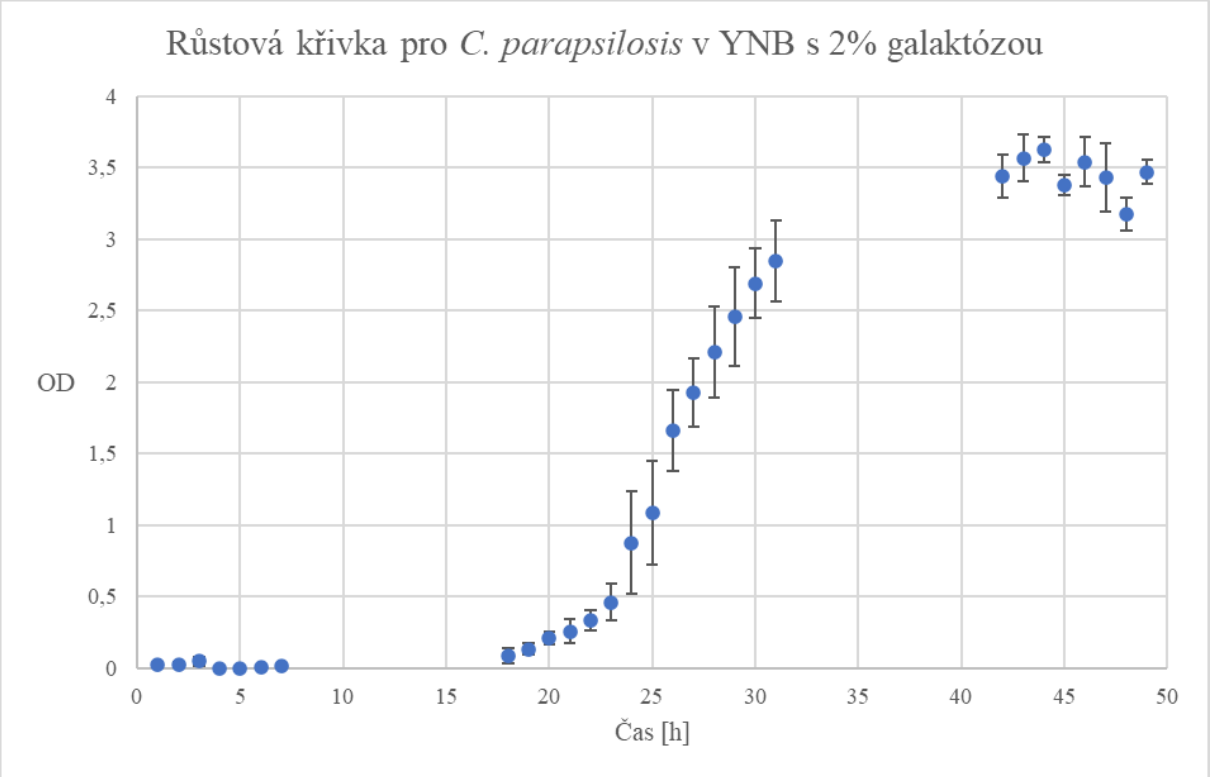
Obrázek 17: Růstová křivka *C. albicans* ve VSF médiu.



Obrázek 18: Růstová křivka *C. parapsilosis* ve VSF médiu.



Obrázek 19: Růstová křivka *C. albicans* v YNB médiu s 2% glycerolem.



Obrázek 20: Růstová křivka *C. parapsilosis* v YNB médiu s 2% galaktózou.

2.8.2. Izolace RNA pomocí sady Quick-RNA™ Viral Kit

Pro izolaci RNA jsme kromě Trizol Reagentu zkoušeli sadu od firmy Zymo Research. Získali jsme ovšem poměrně malé množství, které nevyhovovalo ani čistotou (tabulka 5). Mohlo to být způsobeno velkým množstvím buněk použitým pro izolaci. Došlo tak k zanesení kolonek, a to mělo za následek špatnou izolaci. Z tohoto důvodu jsme RNA pro další experimenty izolovali Trizol Reagentem, kterým jsme získali větší množství poměrně čisté RNA.

Tabulka 5: Koncentrace (c) a čistota (R) RNA vyizolované z *C. albicans* a *C. parapsilosis* pomocí sady Quick-RNA™ Viral Kit.

	C. albicans		***C. parapsilosis***	
	c [ng/µl]	**$R_{260/280}$**	**c [ng/µl]**	**$R_{260/280}$**
1	12,670	1,129	11,988	0,930
2	94,820	0,978	2,850	0,312
3	0,074	0,627	10,770	0,880
4	10,095	1,670	39,960	0,820
5	1,860	0,860	2,850	0,303
6	2,120	0,580	12,240	0,820

2.8.3. Izolace RNA pomocí Trizol Reagentu

Pro izolaci RNA z kvasinek bylo třeba je nejprve nakultivovat. Používali jsme YNB s 2% galaktózou, YNB s 2% glycerolem a VSF médium. Doba kultivace se odvíjela od růstové křivky v daném médiu. V tabulkách 6 a 7 jsou shrnuty naměřené hodnoty OD pro *C. albicans* a *C. parapsilosis* při růstu v různých médiích a podmínkách. Pokud byla hodnota OD vyšší, vzorky se rozdělovaly do více vzorků tak, aby ve výsledku obsahovaly podobné množství buněk.

Tabulka 6: Hodnoty OD po kultivaci *C. albicans* v různých podmínkách.

	Médium	**Doba kultivace**	**OD**
1	VSF	72 h	0,056
2	VSF	72 h	0,070
3	VSF	96 h	0,081
4	VSF	96 h	0,498
5	VSF	96 h	0,072
6	YNB 2 % gly	48 h	0,069
7	YNB 2 % gly	48 h	0,788
8	YNB 2 % gly	48 h	0,741
9	YNB 2 % gal	24 h	2,590
10	YNB 2 % gal	24 h	2,430
11	YNB 2 % gal	24 h	2,650
12	YNB 2% glu	24 h	1,710
13	YNB 2% glu	24 h	2,998
14	YNB 2% glu	24 h	1,380
15	YNB 2% glu	24 h	3,440

Tabulka 7: Hodnoty OD po kultivaci *C. parapsilosis* v různých podmínkách.

	Médium	**Doba kultivace**	**OD**
1	VSF	72 h	0,017
2	VSF	72 h	0,112
3	VSF	96 h	0,360
4	VSF	96 h	0,351
5	VSF	96 h	0,34
6	YNB 2 % gly	48 h	2,520
7	YNB 2 % gly	48 h	2,546
8	YNB 2 % gal	24 h	1,680
9	YNB 2 % gal	24 h	0,710
10	YNB 2 % gal	24 h	0,830
11	YNB 2% glu	24 h	2,620
12	YNB 2% glu	25 h	2,070
13	YNB 2% glu	26 h	2,950
14	YNB 2% glu	27 h	2,540

Po úpravě vzorků se izolovala RNA pomocí Trizolu. V tabulkách 8 a 9 jsou koncentrace a čistoty získané RNA z jednotlivých vzorků pro *C. albicans* a *C. parapsilosis*. Zároveň tabulky obsahují hodnoty koncentrací a čistot některých vzorků po přidání DNáz. Čistota byla měřena při vlnové délce 260 a 280 nm. Část vzorků měla příliš vysoké koncentrace a z toho důvodu se 10× naředily. Z výsledků je patrné, že po přidání DNáz došlo ke zlepšení čistoty vzorků RNA, zároveň se snížila jejich koncentrace. Z toho lze usuzovat, že na koncentraci po izolaci se podílela i DNA, která byla pomocí DNáz odstraněna.

Tabulka 8: Koncentrace (c) a čistota (R) RNA vyizolované z *C. albicans* pomocí Trizolu a po přidání DNáz.

	Po izolaci		**Po přidání DNáz**	
	c [ng/µl]	**R**	**c [ng/µl]**	**R**
1	11,99	1,86	29,73	2,43
2	107,39	2,11	155,73	2,34
3	96,29	2,194	43,51	2,499
4a	25,61	2,15	42,32	2,12
4b	41,29	2	35,93	2,23
5	17,76	1,8	24,999	2,16
6	18,487	3,58	9,78	2,28
7	98,5	2,08	119,27	2,21
8a	166,77	2,15	152,44	2,21
8b	114,11	2,19	136,67	2,19
9	886,79	2,203	128,98	2,17
10a	1758,4	2,19	1150,83	2,23
10b	2558,86	2,12	1268,62	2,23
11	2544,63	2,218	1453,63	2,23
12	1167,2	2,22	891,52	2,12
13	2851,33	1,87	3181,01	1,71
14	812,23	2,21	660,25	2,08
15a	1319,25	2,27	1892,91	2,16
15b	1654,698	2,23	1045,28	1,51
15c	3096,16	2,34	1947,8	2,14

Tabulka 9: Koncentrace (c) a čistota (R) RNA vyizolované z *C. parapsilosis* pomocí Trizolu a po přidání DNáz.

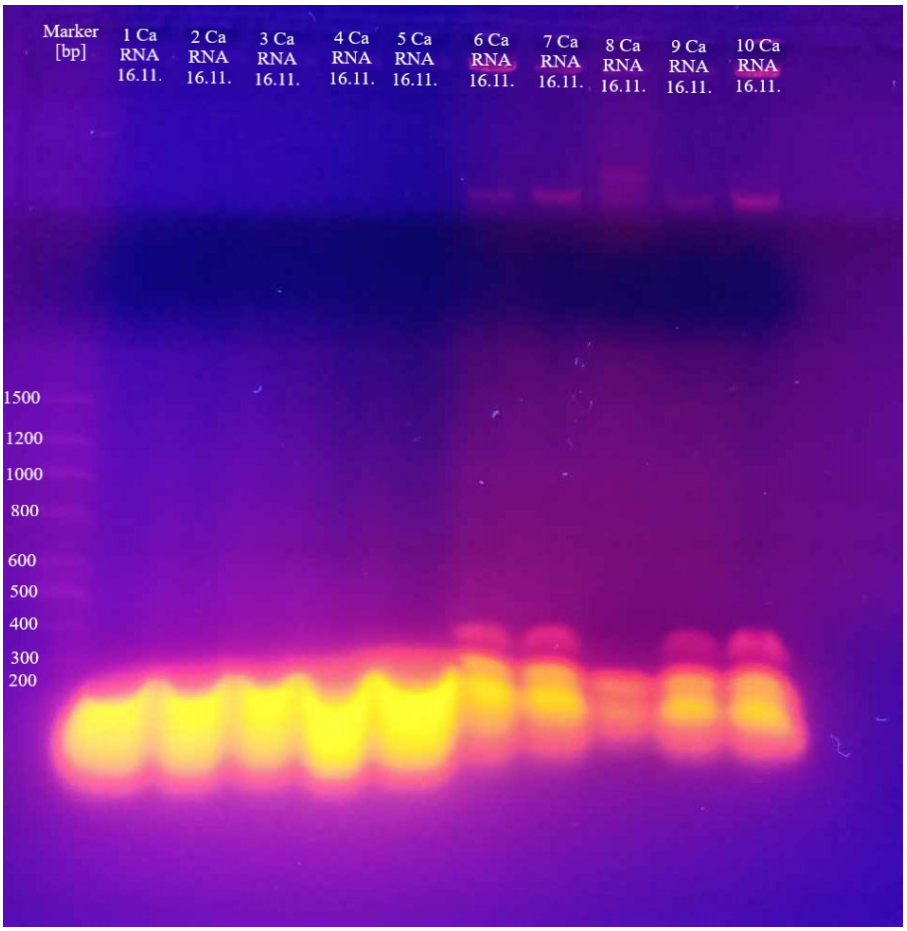
	Po izolaci		**Po přidání DNáz**	
	c [ng/µl]	**R**	**c [ng/µl]**	**R**
1	17,02	1,8	27,9	2,16
2	15,89	1,47	21,84	2,93
3	23,68	2,25	22,38	2,13
4a	34,97	1,97	35,28	2,24
4b	57,35	2,1	52,43	2,16
5	114,42	2,19	98,75	2,19
6	321,48	2,05	117,08	2,23
7a	50,03	1,91	51,88	2,14
7b	65,13	2,01	59,23	2,16
7c	42,49	1,86	37,57	2,16
8	10,91	1,86	19,58	2
9	68,14	1,996	58,11	2,17
10a	71,09	1,98	58,49	2,14
10b	58,39	1,93	61,31	2,12
11	608,58	2,28	470,8	2,05
12	90,33	2,16	78,96	1,61
13	702,16	2,3	661,8	2,07
14a	88,82	2,12	69,92	1,499
14b	135,18	2,13	107,37	1,63
14c	62,37	2,05	47,09	1,35

Se vzorky, do kterých byla přidána DNáza, bylo možné provést RT-qPCR.

2.8.4. RNA elektroforéza

Pro kontrolu celistvosti a čistoty vzorků jsme RNA rozdělili pomocí elektroforézy. Na obrázku 21 je vidět výsledný gel a je patrné, že obsahuje pouze degradační produkty. Ve vzorcích 6Ca – 10Ca je zároveň vidět přítomnost DNA. Protože hrozila kontaminace RNázami, vymývali jsme elektroforetickou vanu několika přípravky. V literatuře se uvádí jako vhodná činidla pro inaktivaci RNáz DEPC voda, SDS, NaOH a H_2O_2. I přes promývání vany před elektroforézou se nám nepodařilo provést RNA elektroforézu, kde by byla vidět rozdělená

RNA. Pravděpodobně se nám nepodařilo odstranit veškeré RNázy a došlo ke kontaminaci a následnému rozpadu RNA. Z toho důvodu jsme následně vzorky amplifikovali pomocí PCR a rozdělili je na DNA elektroforéze, kde případné RNázy nejsou tolik důležité, což je popsáno v další kapitole [156, 157, 158].

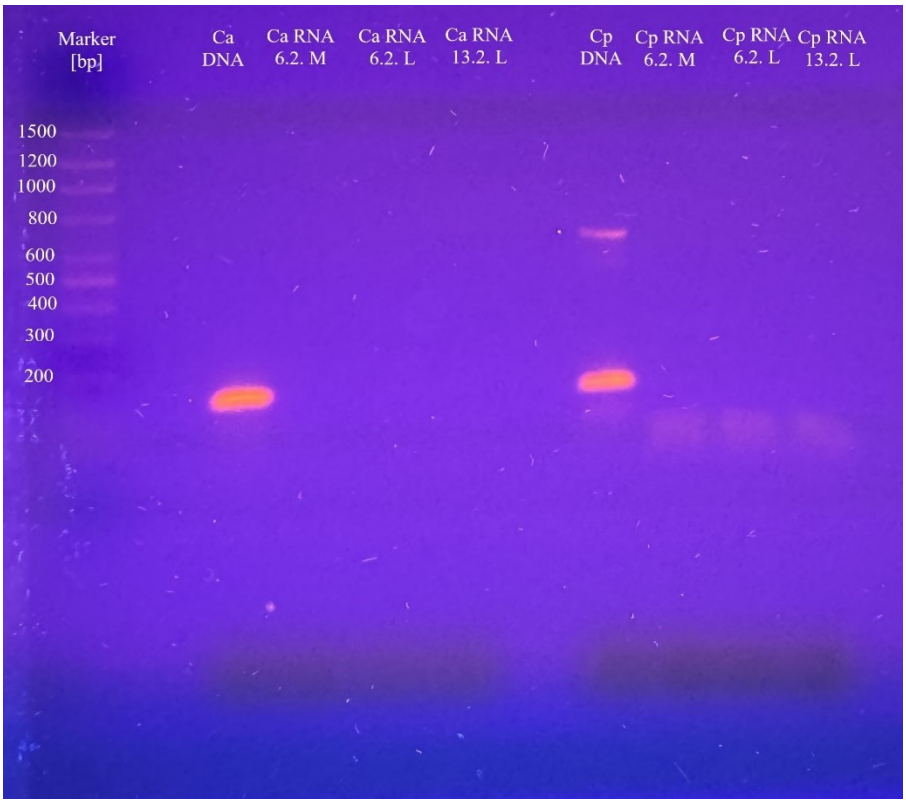


Obrázek 21: Elektroforetický gel obsahující vzorky RNA z kvasinky *C. albicans*. Ca RNA – RNA vyizolovaná z *C. albicans*.

2.8.5. Kontrolní PCR a elektroforéza

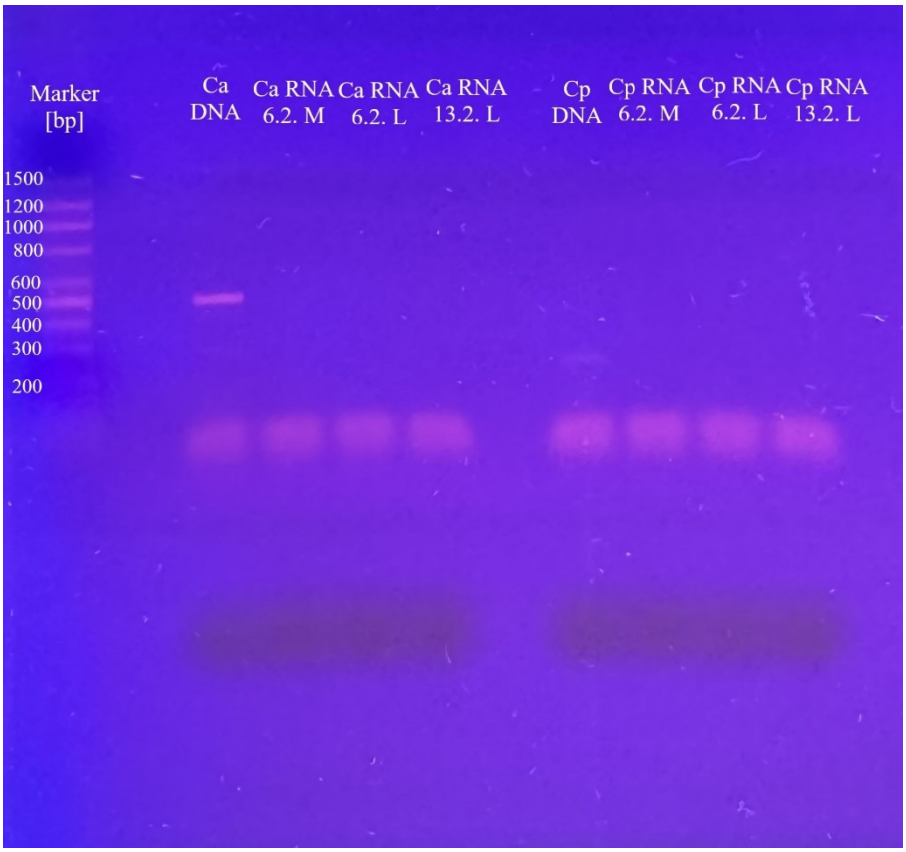
Protože kontrolní RNA elektroforéza nevyšla a bylo potřeba zjistit, zda nejsou vzorky kontaminované DNA, bylo třeba provést PCR s primery pro DNA. Cílem bylo, aby na gelu v jamkách se vzorky RNA nebyla žádná DNA, tedy aby se u vzorků RNA neobjevil žádný proužek signalizující DNA. Jako kontrola se používaly vzorky DNA vyizolované z *C. albicans* a *C. parapsilosis*. Na prvním gelu (obrázek 22) je vidět, že v jamce obsahující DNA z *C. parapsilosis* došlo k namnožení DNA o velikosti cca 800 bp. V případě *C. albicans* se DNA nenamnožila a jsou vidět pouze degradační produkty. Tento výsledek může být následkem staré DNA, která zdegradovala. U vzorků RNA z *C. albicans* je vidět, že nedošlo k namnožení DNA, lze tedy říct, že vzorky jsou čisté. Avšak z důvodu nepovedené kontroly

v podobě degradované DNA není možné s jistotou říci, že jsou vzorky čisté. V případě vzorků z *C. parapsilosis* kontrola vyšla správně, avšak je možné vidět malé množství degradačních produktů a je tedy možné, že vzorky obsahují DNA. Do všech vzorků použitých pro následnou RT-qPCR byly přidány DNázy a tím bylo zajištěno, že budou čisté.



Obrázek 22: Elektroforetický gel, obsahující vzorky RNA z *C. albicans* a *C. parapsilosis.* Ca DNA – DNA vyizolovaná z *C. albicans*, Ca RNA – RNA vyizolovaná z *C. albicans*, Cp DNA – DNA vyizolovaná z *C. parapsilosis*, Cp RNA – RNA vyizolovaná z *C. parapsilosis*.

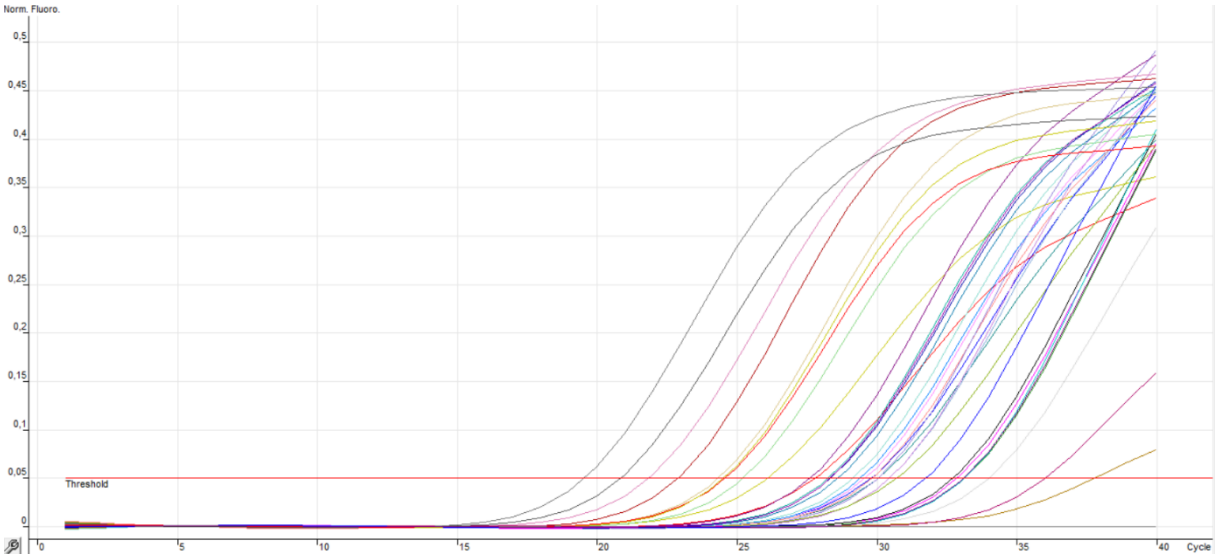
Aby se pro další PCR zajistila nedegradovaná DNA, vyizolovali jsme novou. Výsledky po PCR amplifikaci a následné elektroforéze jsou na obrázku 23. Na tomto gelu je vidět, že došlo k namnožení DNA o velikosti cca 500 bp u kontrolního vzorku *C. albicans*. U *C. parapsilosis* se namnožila DNA o velikosti cca 300 bp, což už jsou spíše ale degradační produkty. U všech vzorků RNA jsou vidět pouze degradační produkty a žádný proužek. Můžeme tedy říct, že vzorky RNA, do kterých byla přidána DNáza nám neobsahovaly žádnou DNA.



Obrázek 23: Elektroforetický gel obsahující vzorky RNA z *C. albicans* a *C. parapsilosis*. Ca DNA – DNA vyizolovaná z *C. albicans*, Ca RNA – RNA vyizolovaná z *C. albicans*, Cp DNA – DNA vyizolovaná z *C. parapsilosis*, Cp RNA – RNA vyizolovaná z *C. parapsilosis*.

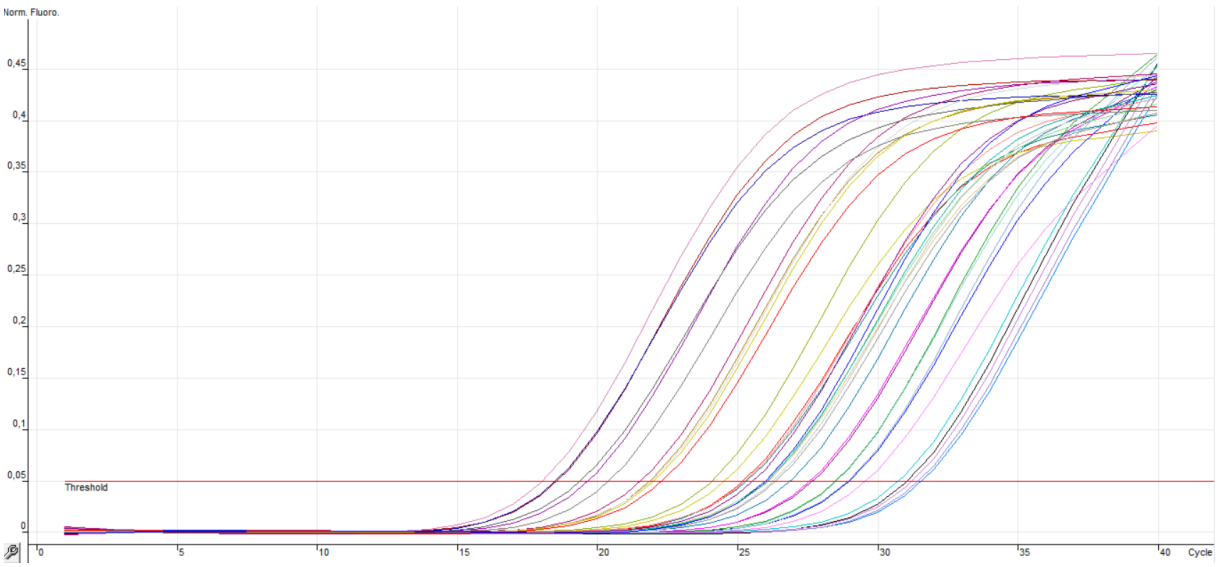
2.8.6. RT-qPCR

Jak je patrné z obrázku 24, při prvním RT-qPCR vycházela hodnota Ct ve většině vzorků téměř 30. Takové hodnoty znamenají, že je výsledek negativní. Vzorky použité na první RT-qPCR byly ošetřeny DNázou a inkubovány 60 min, což mohlo způsobit rozpad RNA a následná reakce z tohoto důvodu nevyšla.



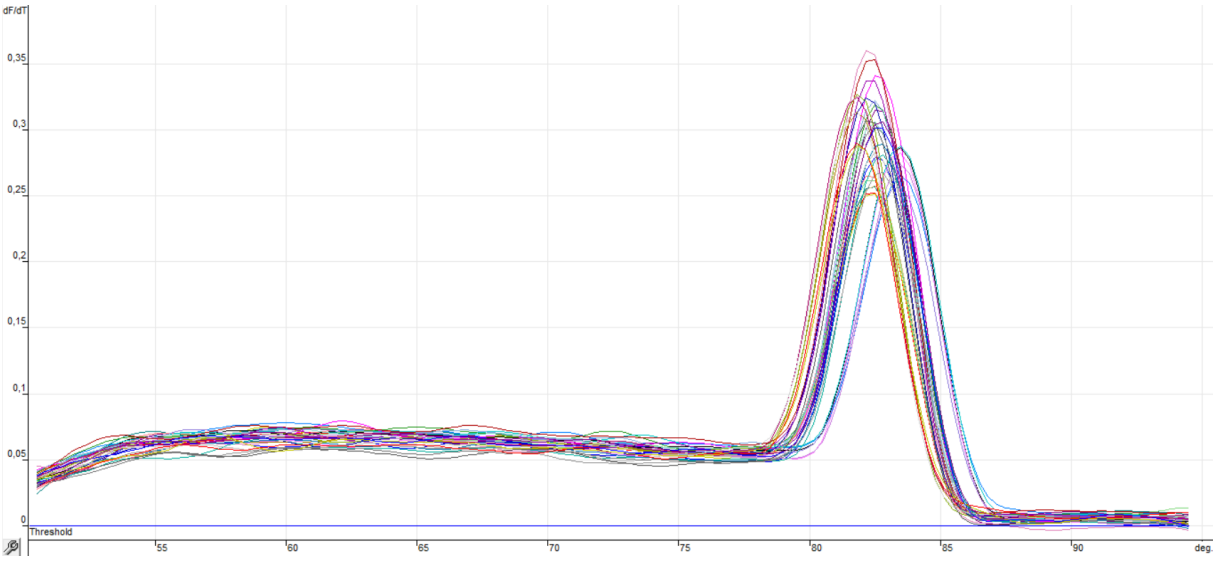
Obrázek 24: Křivka amplifikace RT-qPCR při první reakci.

Při dalším RT-qPCR jsme použili vzorky, které se s DNázou inkubovaly pouze 30 min. Na obrázku 25 je vidět, že tato reakce vyšla podstatně lépe. Hodnoty Ct jsou zde pod 30.



Obrázek 25: Křivka amplifikace RT-qPCR po úpravě teploty v kroku, který předcházel RT-qPCR

Analýza křivky tání probíhala při 50 – 95 °C, protože teplota tání u *C. albicans* a *C. parapsilosis* se pohybuje mezi 85 – 90 °C [159]. Na křivce tání na obrázku 26 je vidět pouze jeden pík a je tedy zřejmé, že při reakci nevznikaly vedlejší produkty.



Obrázek 26: Křivka tání při RT-qPCR.

V tabulkách 10 a 11 jsou výsledné hodnoty Ct pro *C. albicans* a *C. parapsilosis*. Z výsledných hodnot Ct byly odstraněny odlehlé hodnoty a následně z nich byla spočítána genová exprese. Pro výpočet byla použita metoda ΔΔCt [160]. Jako standard se použila RNA vyizolovaná z *C. albicans* a *C. parapsilosis* kultivovaných v YNB s 2% glukózou, 24 h při 37 °C. Jako referenční gen se používal aktin, u něhož nedochází k výrazným změnám genové exprese při stresových podmínkách [154].

Tabulka 10: Hodnoty Ct získané z RT-qPCR pro *C. albicans*. YNB 2% gal – YNB médium s 2% galaktózou, YNB 2% gly – YNB médium s 2% glycerolem, VSF – VSF médium, Aktin – použité primery s aktinem, Pho15 – použité primery s *PHO15*.

	YNB 2% gal	YNB 2% gly	VSF	Standard
Aktin	23,48	24,38	17,86	21,36
	23,37	24,04	17,95	21,25
	23,38	21,34	17,76	22,02
	22,83	22,03	17,55	21,97
	23,65	21,44	18,81	21,87
	23,17	20,75	16,92	22,02
Pho15	27,77	29,20	22,02	24,82
	27,48	26,52	22,06	24,58
	26,94	26,74	21,73	25,22
	27,31	26,02	21,66	24,67
	27,00	26,14	21,32	24,96
	27,13	26,30	21,26	24,92

Tabulka 11: Hodnoty Ct získané z RT-qPCR pro *C. parapsilosis*. YNB 2% gal – YNB médium s 2% galaktózou, YNB 2% gly – YNB médium s 2% glycerolem, VSF – VSF médium, Aktin – použité primery s aktinem, Pho15 – použité primery s *PHO15*.

	YNB 2% gal	YNB 2% gly	VSF	Standard
Aktin	20,41	21,20	19,60	18,90
	20,42	21,67	20,88	19,17
	20,76	21,46	16,89	20,45
	21,26	21,57	16,83	21,04
	20,00	21,11	17,14	18,37
	19,03	20,94	16,90	19,16
Pho15	25,18	25,10	24,61	22,43
	24,76	25,43	24,57	22,47
	24,86	25,75	20,63	23,57
	25,18	25,67	20,74	23,48
	24,02	25,59	20,76	23,04
	25,02	25,29	20,95	21,80

V tabulce 12 a 13 jsou spočítané hodnoty genové exprese pro *C. albicans* a *C. parapsilosis*. Z těchto výsledků je patrné, že oproti kontrolnímu médiu obsahujícímu glukózu došlo u ostatních médií ke snížení genové exprese, a to u obou kvasinek. V případě *C. albicans* klesla exprese u YNB média s galaktózou na 56 %, u YNB média s glycerolem na 39 % a u VSF média na 59 %.

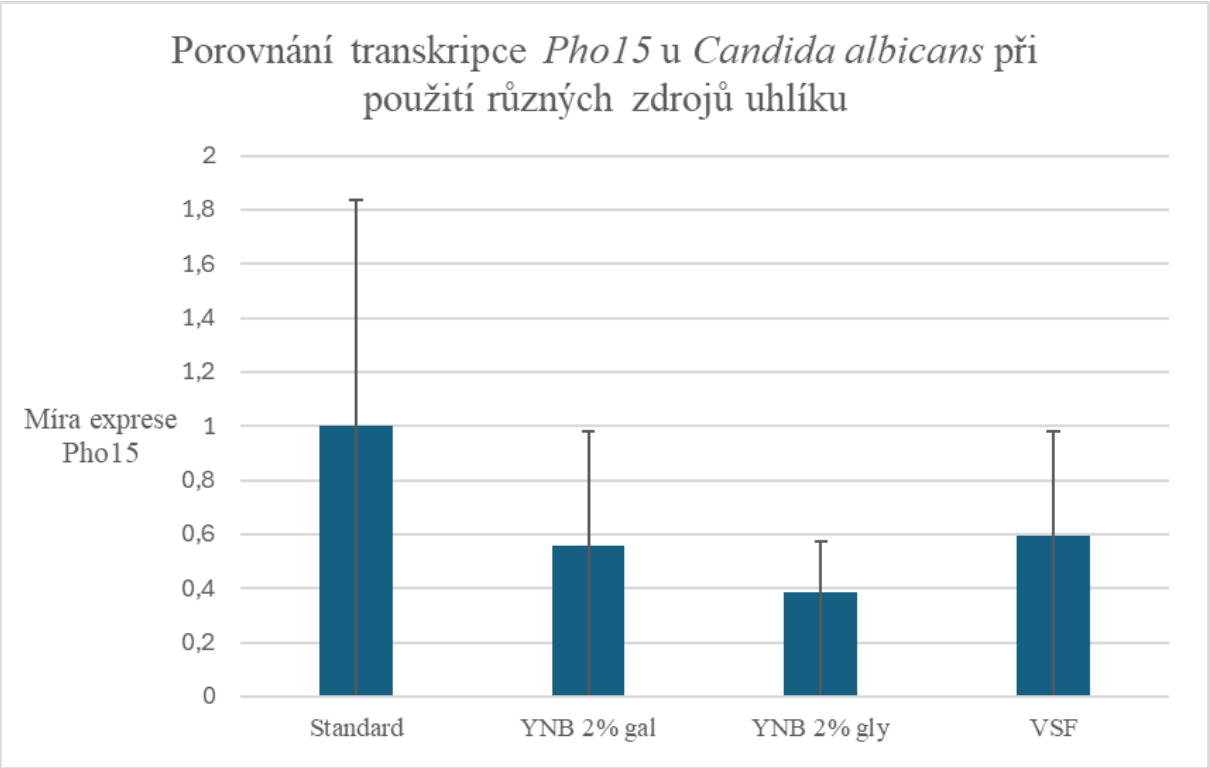
Tabulka 12: Vypočítané hodnoty transkripce *PHO15* pro RNA vyizolovanou z *C. albicans* z různých médií. YNB 2% gal – YNB médium s 2% galaktózou, YNB 2% gly – YNB médium s 2% glycerolem, VSF – VSF médium.

Médium	**Míra genové exprese [%]**
Kontrola	100,00
YNB 2% gal	55,67
YNB 2% gly	38,51
VSF	59,32

Tabulka 13: Vypočítané hodnoty transkripce *PHO15* pro RNA vyizolovanou z *C. parapsilosis* z různých médií. YNB 2% gal – YNB médium s 2% galaktózou, YNB 2% gly – YNB médium s 2% glycerolem, VSF – VSF médium.

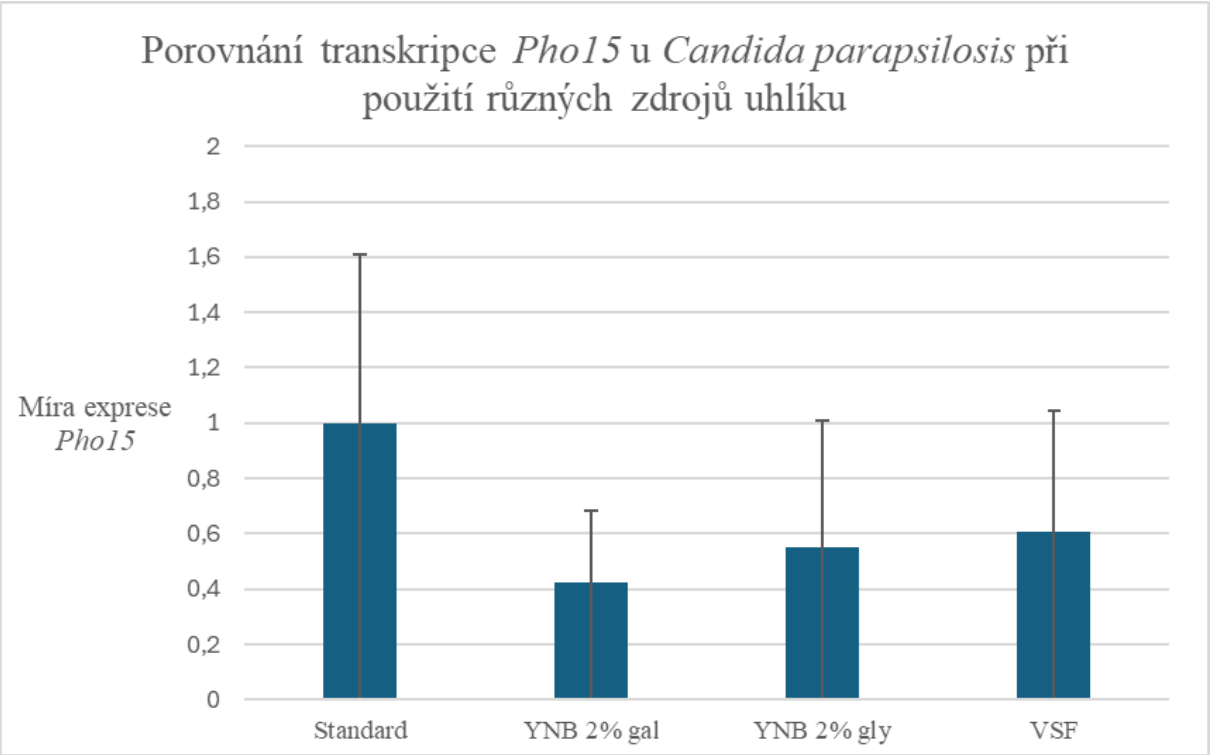
Médium	**Míra genové exprese [%]**
Kontrola	100,00
YNB 2% gal	42,34
YNB 2% gly	54,97
VSF	60,71

Na obrázku 27 je grafické znázornění změn genové exprese *PHO15* u *C. albicans* při použití různých médií s různými zdroji uhlíku. Nejnižší exprese *PHO15* je zde při použití YNB média s 2% glycerolem. O něco vyšší je exprese Pho15 při použití YNB média s 2% galaktózou. A nejvyšší při použití VSF média.



Obrázek 27: Porovnání změn genové exprese *PHO15* u RNA získané z *C. albicans* kultivované v různých médiích. YNB 2% gal – YNB médium s 2% galaktózou, YNB 2% gly – YNB médium s 2% glycerolem, VSF – VSF médium.

Na obrázku 28 je graficky znázorněna genová exprese Pho15 u *C. parapsilosis* při použití různých zdrojů uhlíku. V tomto případě je nejnižší genová exprese při použití YNB s 2% galaktózou. Druhá je exprese při použití YNB s 2% glycerolem a nejvyšší je exprese při použití VSF média.



Obrázek 28: Porovnání změn genové exprese *PHO15* u RNA získané z *C. parapsilosis* kultivované v různých médiích. YNB 2% gal – YNB médium s 2% galaktózou, YNB 2% gly – YNB médium s 2% glycerolem, VSF – VSF médium.

3. Závěr

Cílem této práce bylo porovnat míru transkripce fosfatázy Pho15 u *C. albicans* a *C. parapsilosis* při různých stresových podmínkách. Jako stresové podmínky byly vybrány různé zdroje uhlíku, konkrétně galaktóza, glycerol a kyselina mléčná s nízkým obsahem glukózy. Abychom zjistili, jak dlouho kvasinky kultivovat v jednotlivých médiích, měřili jsme jejich růstovou křivku.

Následovala izolace RNA. Jako vhodná se ukázala metoda izolace pomocí Trizol Reagentu, kterou jsme získali vhodné množství poměrně čisté RNA. Po izolaci bylo třeba ověřit čistotu a celistvost RNA. Pokusili jsme se RNA rozdělit pomocí RNA elektroforézy. I přes veškerou snahu o dokonalé vyčištění elektroforetické vany RNA elektroforéza nevyšla. Nejspíš to bylo zapříčiněno přítomností RNáz, které způsobily rozpad RNA.

Poněvadž RNA elektroforéza nebyla úspěšná, vzorky jsme amplifikovali pomocí PCR a rozdělili je na DNA elektroforéze. Pro kontrolu jsme použili vzorky DNA získané z *C. albicans* a *C. parapsilosis*. Z výsledků jsme zjistili, že vzorky RNA obsahující DNázy, neobsahují DNA a lze je tedy použít k dalším experimentům.

Následovala RT-qPCR, kde bylo třeba upravit dobu inkubace vzorků s DNázou. Při původních 60 min došlo pravděpodobně k rozpadu RNA a reakce nevyšla. V dalších reakcích byly použity vzorky inkubované s DNázou pouze 30 min. S takovými vzorky reakce vycházela. Kromě amplifikační křivky se měřila křivka tání. Ta obsahovala pouze jeden výrazný pík, což znamenalo, že nám nevznikají žádné vedlejší produkty. Z naměřených hodnot Ct pro obě kvasinky jsme metodou ΔΔCt spočítali změnu genové exprese pro jednotlivé podmínky. Spočítané hodnoty genové exprese byly zaneseny do grafu spolu s chybovými úsečkami.

Ze získaných výsledků lze usuzovat, že u obou kvasinek dochází při změně zdroje uhlíku ke snížení exprese genu *PHO15*. V případě *C. albicans* byla nejnižší exprese při použití YNB s 2% glycerolem a to přibližně 39 % oproti kontrolnímu médiu YNB s 2% glukózou. Při použití YNB s 2% galaktózou se exprese snížila na 56 % a při použití VSF média klesla na přibližně 59 % oproti kontrole. V případě *C. parapsilosis* byly výsledky mírně odlišné. Při použití VSF média se téměř shodovaly jako u *C. albicans* a exprese klesla na přibližně 60 % oproti kontrole. Rozdíl byl ovšem u YNB s glycerolem, kde genová exprese klesla na 55 % a tedy byla vyšší než u *C. albicans*. Naopak při použití YNB s 2% galaktózou došlo ke snížení genové exprese na 42 % oproti kontrole.

Z těchto výsledků je možné usuzovat, že při použití jiného zdroje uhlíku, než je glukóza, dochází k poklesu glykolýzy, což souvisí se vznikem menšího množství chyb. Pho15 jakožto enzym opravující metabolické chyby tedy není potřeba v takové míře a z toho důvodu exprese genu *PHO15* klesá. Zároveň je na výsledných grafech (obrázek 27 a 28) vidět poměrně velké odchylky. Ačkoli tedy pravděpodobně exprese s jinými zdroji uhlíku než je glukóza klesá, bez další analýzy je těžké říct, jak je tento pokles významný.

4. Seznam použité literatury

[1] KHAN, Sabir; BILAL, Hazrat; KHAN, Muhammad Nadeem; FANG, Wenjie; CHANG, Wenqiang et al. Interleukin inhibitors and the associated risk of candidiasis. Online- *Frontiers in Immunology*. 2024, **15**. ISSN 1664-3224. Dostupné z: https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1372693. [cit. 2024-04-14].

[2] BERTOLINI, Martinna; RANJAN, Amit; THOMPSON, Angela; DIAZ, Patricia I.; SOBUE, Takanori; MAAS, Kendra; DONGARI-BAGTZOGLOU, Anna a NOVERR, Mairi C. Candida albicans induces mucosal bacterial dysbiosis that promotes invasive infection. Online. *PLOS Pathogens*. 2019, **15**(4). ISSN 1553-7374. Dostupné z: https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007717. [cit. 2023-07-31].

[3] BROGDEN, Kim A. a GUTHMILLER Janet M. Polymicrobial Diseases. Online. 2002, ISBN 9781683672326. Dostupné z: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1128/9781555817947. [cit. 2023-07-31].

[4] CALDERONE, Richard A. a CLANCY, Cornelius J. *Candida* and candidiasis. 2nd ed. Online. ISBN 978-1-55581-717-6. Dostupné z: https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=9u6rBAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT9&ots=g-LdGIxhSL&sig=cctDlGBGyuO203oiTN39esX499U&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false. [cit. 2023-07-31].

[5] HOARAU, Gautier; MUKHERJEE, Pulok K.; GOWER-ROUSSEAU, Corinne, et al. Bacteriome and Mycobiome Interactions Underscore Microbial Dysbiosis in Familial Crohn's Disease. Online. *MBio*. 2016, **7**(5). ISSN 2161-2129. Dostupné z: https://doi.org/10.1128/mBio.01250-16. [cit. 2023-07-31].

[6] RICHARD, Mathias L., LAMAS, Bruno; LIGUORI, Giuseppina; HOFFMANN, Thomas W. a SOKOL Harry. Gut Fungal Microbiota. Online. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2015, **21**(3), 656-665. ISSN 1078-0998. Dostupné z: https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000261. [cit. 2023-07-31].

[7] MAYER, François L.; WILSON Duncan a HUBE Bernhar. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. Online. *Virulence*. 2014, **4**(2), 119-128. ISSN 2150-5594. Dostupné z: https://doi.org/10.4161/viru.22913. [cit. 2024-04-14].

[8] CHEN, Hui; ZHOU, Xuedong; REN, Biao a CHENG, Lei. The regulation of hyphae growth in *Candida albicans*. Online. *Virulence.* 2020, **11**(1), 337-348. ISSN

2150-5594. Dostupné z: https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1748930. [cit. 2024-04-14].

[9] BARTNICKI-GARCIA, Salomon. Cell Wall Chemistry, Morphogenesis, and Taxonomy of Fungi. Online. *Annual Review of Microbiology*. 1968, **22**(1), 87-108. ISSN 0066-4227. Dostupné z: https://doi.org/10.1146/annurev.mi.22.100168.000511. [cit. 2023-08-02].

[10] GARCIA-RUBIO, Rocio; DE OLIVEIRA, Haroldo C.; RIVERA, Johanna a TREVIJANO-CONTADOR, Nuria. The Fungal Cell Wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* Species. Online. *Frontiers in Microbiology*. 2020, **10**. ISSN 1664-302X. Dostupné z: https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02993. [cit. 2024-04-14].

[11] FLEET, Graham H. Composition and Structure of Yeast Cell Walls. Online. *Current Topics in Medical Mycology*. 1985, 24-56. ISBN 978-1-4613-9549-2. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-1-4613-9547-8_2. [cit. 2023-08-02].

[12] Kvasinky. Online. *Wikipedie.* Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Kvasinky#/media/Soubor:Yeast_cell_cs.svg. [cit. 2024-04-12].

[13] ANN CHAI, Louis Yi; DENNING, David W. a WARN Peter. *Candida tropicalis* in human disease. Online. *Critical Reviews in Microbiology*. 2010, **36**(4), 282-298. ISSN 1040-841X. Dostupné z: https://doi.org/10.3109/1040841X.2010.489506. [cit. 2023-08-01].

[14] KOTHAVADE, Rajendra J.; KURA, Mahendra M.; VALAND Arvind G. a PANTHAKI Mehroo H. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. Online. *Journal of Medical Microbiology*. 2010, **59**(8), 873-880. ISSN 0022-2615. Dostupné z: https://doi.org/10.1099/jmm.0.013227-0. [cit. 2023-08-01].

[15] YESUDHASON, Binesh L. *Candida tropicalis* as a Predominant Isolate from Clinical Specimens and its Antifungal Susceptibility Pattern in a Tertiary Care Hospital in Southern India. Online. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2015 ISSN 2249782X. Dostupné z: https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/13460.6208. [cit. 2023-08-01].

[16] PIMENTEL DE BARROS, Patrícia; ROSSONI, Rodnei D.; FREIRE, Fernanda; DE CAMARGO RIBEIRO, Felipe; DAS CHAGAS LOPEZ, Lucas A.; JUNQUEIRA, Julianna C. a JORGE, Antonio O. C. *Candida tropicalis* affects the

virulence profile of *Candida albicans*: an in vitro and in vivo study. Online. *Pathogens and Disease.* 2018, **76**(2) Dostupné z: https://doi.org/10.1093/femspd/fty014. [cit. 2023-08-01].

[17] *Candida auris*. Online. *Centers for Disease, Control and Prevention*. Dostupné z: https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/index.html. [cit. 2023-08-01].

[18] YUE, Huizhen; BING, Jian; ZHENG, Qiushi; ZHANG, Yulong; HU, Tianren; DU, Han; WANG, Hui a HUANG, Guanghua. Filamentation in *Candida auris* , an emerging fungal pathogen of humans: passage through the mammalian body induces a heritable phenotypic switch. Online. *Emerging Microbes and Infections* 2018, **7**(1), 1-13. ISSN 2222-1751. Dostupné z: https://doi.org/10.1038/s41426-018-0187-x. [cit. 2023-08-01].

[19] CHOWDHARY, Anuradha; SHARMA, Cheshta; MEIS, Jacques F. a HOGAN Deborah A. *Candida auris*: A rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally. Online. *PLOS Pathogens*. 2017, **13**(5). ISSN 1553-7374. Dostupné z: https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006290. [cit. 2023-08-01].

[20] ROSSATO, Luana a COLOMBO, Arnaldo Lopes. *Candida auris*: What Have We Learned About Its Mechanisms of Pathogenicity? Online. *Frontiers in Microbiology*. 2018, **9**. ISSN 1664-302X. Dostupné z: https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03081. [cit. 2023-08-01].

[21] DUGGAN, Seána; USHER, Jane a JABRA-RIZK, Mary Ann. *Candida glabrata*: A powerhouse of resistance. Online. *PLOS Pathogens*. 2023, **19**(10). ISSN 1553-7374. Dostupné z: https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011651. [cit. 2024-04-14].

[22] FIDEL, Paul L.; VAZQUEZ, Jose A. a SOBEL, Jack D. *Candida glabrata*: Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison to *C. albicans*. Online. *Clinical Microbiology Reviews*. 1999, **12**(1), 80-96ISSN 0893-8512. Dostupné z: https://doi.org/10.1128/CMR.12.1.80. [cit. 2024-04-14].

[23] SILVA, Sónia, HENRIQUES, Mariana; HAYES, Anthony; OLIVEIRA, Rosário; AZEREDO, Joana a WILLIAMS, David W. *Candida glabrata* and *Candida albicans* co-infection of an in vitro oral epithelium. Online. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 2011, **40**(5), 421-427. ISSN 09042512. Dostupné z: https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2010.00981.x. [cit. 2023-08-01].

[24] RODRIGUES, Célia F.; SILVA, Sónia a HENRIQUES, Mariana. *Candida glabrata*: a review of its features and resistence. Online. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2014, **33**(5), 673-688. ISSN 0934-9723. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s10096-013-2009-3. [cit. 2023-08-01].

[25] *Candida albicans*. Online. Ústav lékařské mikrobiologie. Dostupné z: http://mikrobiologie.lf3.cuni.cz/rep/caal.htm. [cit. 2023-09-07].

[26] BORKOVICH, Katherine A. a EBBOLE Daniel J. Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi. Online. *American Society for Microbiology (ASM)*, 2010 ISBN 978-1-61344-263-0. Dostupné z: https://app.knovel.com/kn/resources/kpCMBFF00V/toc?b-q=candida%20albicans&include_synonyms=no. [cit. 2023-09-04].

[27] *Candida albicans* – Morphology, Life Cycle, Pathogenesis, Treatment. Online. *Microbiology note.* Dostupné z: https://microbiologynote.com/candida-albicans-morphology-life-cycle-pathogenesis-treatment/#google_vignette. [cit. 2023-09-04].

[28] ARYAL, Sagar. *Candida albicans* – An Overview. Online. *Microbe Notes*. 2018. Dostupné z: https://microbenotes.com/candida-albicans/. [cit. 2023-09-04].

[29] CAROLUS, Hans; VAN DYCK, Katrien a VAN DIJCK, Patrick. *Candida albicans* and *Staphylococcus* Species: A Threatening Twosome. Online. *Frontiers in Microbiology*. 2019, **10**. ISSN 1664-302X. Dostupné z: https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02162. [cit. 2024-04-14].

[30] VOTAVA, Miroslav. Lékařská mikrobiologie speciální. Brno: Neptun, 2003. ISBN 80-902-8966-5. [cit 2024-04-20].

[31] TALAPKO, Jasminka; JUZBAŠIĆ, Martina; MATIJEVIĆ, Tatjana; PUSTIJANAC, Emina; BEKIĆ, Sanja et al. *Candida albicans*—The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. Online. *Journal of Fungi*. 2021, **7**(2). ISSN 2309-608X. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/jof7020079. [cit. 2024-04-14].

[32] Vzhled kolonií *Candida albicans* kultivovaných na krevním agaru. Online. *Microbiology pictures.* Dostupné z: https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria-photos/candida-albicans-photos/candida-blood-agar.html. [cit. 2024-04-12].

[33] Čistá kultura *Candida albicans* v Petriho misce. Online. *Microbiology pictures*. Dostupné z: https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria-photos/candida-albicans-photos/candida-albicans-pure-culture.html. [cit. 2024-04-12].

[34] BRANCO, Joana; MIRANDA, Isabel M. a RODRIGUES, Acácio G. *Candida parapsilosis* Virulence and Antifungal Resistance Mechanisms: A Comprehensive Review of Key Determinants. Online. *Journal of Fungi*. 2023, **9**(1) ISSN 2309-608X. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/jof9010080. [cit. 2023-09-08].

[35] ARYAL, Sagar a MOKOBI, Faith. *Candida parapsilosis* – An Overview. Online. *Microbe Notes*. 2018 Dostupné z: https://microbenotes.com/candida-parapsilosis/. [cit. 2023-09-08].

[36] GÓMEZ-MOLERO, Emilia; DE-LA-PINTA, Iker; FERNÁNDEZ-PEREIRA, Jordan; GROSS, Uwe; WEIG,Michael; QUINDÓS, Guillermo; DE GROOT, Piet W. J. a BADER, Oliver. *Candida parapsilosis* Colony Morphotype Forecasts Biofilm Formation of Clinical Isolates. Online. *Journal of Fungi*. 2021, **7**(1) ISSN 2309-608X. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/jof7010033. [cit. 2023-09-08].

[37] SHYAMALA, R.; PARANDEKAR, P. K. a TAKPERE, A. Y. Evaluation of hicrome agar – *Candida*, a new differential medium for isolation of *Candida* species from oral trush in hiv seropositive patients. Online. *International journal of current research and review.* 2012, **4**(23), 53-61. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/255173809_EVALUATION_OF_HICROME_AGAR_-_CANDIDA_A_NEW_DIFFERENTIAL_MEDIUM_FOR_ISOLATION_OF_CANDIDA_SPECIES_FROM_ORAL_TRUSH_IN_HIV_SEROPOSITIVE_PATIENTS. [cit. 2024-04-20].

[38] Kolonie *Candida parapsilosis* na dextrózovém agaru Sabouraud. Online. *Research Gate*. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/A-C-parapsilosis-colony-on-Sabouraud-Dextrose-Agar-SDA-B-R-mucilaginosa-control_fig2_332724644. [cit. 2024-04-12].

[39] ANTAL, Károly; GILA, Barnabás a PÓCSI, István. General stress response or adaptation to rapid growth in *Aspergillus nidulans*? Online. *Fungal biology*. 2020, **124**(5), 376-386. ISSN 1878-6146. Dostupné z: https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.10.009. [cit. 2024-02-19].

[40] EMRI, Tamás; FORGÁCS, Katalin a PÓSCI, István. Biologia futura: combinatorial stress responses in fungi. Online. *Biologia Futura*. 2022, **73**(2). 207-217. ISSN 2676-8607. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s42977-022-00121-8. [cit. 2024-02-19].

[41] COTTIER, Fabien; TAN, Alrina Shin Min a CHEN, Jinmiao. The Transcriptional Stress Response of *Candida albicans* to Weak Organic Acids. Online. *G3 Genes|Genomes|Genetics*. 2015, **5**(4), 497-505. ISSN 2160-1836. Dostupné z: https://doi.org/https://doi.org/10.1534/g3.114.015941. [cit. 2024-02-19].

[42] BROWN, Alistair J. P.; BUDGE, Susan; KALORITI, Despoina; TILLMANN, Anna a JACOBSEN, Mette D. Stress adaptation in a pathogenic fungus. Online. *Journal of Experimental Biology*. 2014, **217**(1), 144-155. ISSN 1477-9145. Dostupné z: https://doi.org/10.1242/jeb.088930. [cit. 2024-02-19].

[43] PRASAD, Rajendra. *Candida albicans*. Online. *Springer*. 1991. ISBN 13:978-3-642-75253-7. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-3-642-75253-7. [cit. 2024-03-11].

[44] GONG, Ying; LI, Tao; YU, Cuixiang a SUN, Shujuan. *Candida albicans* Heat Shock Proteins and Hsps-Associated Signaling Pathways as Potential Antifungal Targets. Online. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2017, **7**. ISSN 2235-2988. Dostupné z: https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00520. [cit. 2024-03-12].

[45] ENJALBERT, Brice; NANTEL, André a WHITEWAY, Malcolm. Stress-induced gene expression in *Candida albicans*: absence of a general stress response. Online. *Molecular Biology of the Cell*. 2003, **14**(4). Dostupné z: https://doi.org/https://doi.org/10.1091/mbc.e02-08-0546. [cit. 2024-03-12].

[46] IYER, Kali R.; ROBBINS, Nicole a COWEN, Leah. E. The role of *Candida albicans* stress response pathways in antifungal tolerance and resistance. Online. *IScience*. 2022, **25**(3). ISSN 25890042. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.103953. [cit. 2024-03-12].

[47] LUO, Lin; TONG, Xing Zhang a FARLEY, Peter C. The *Candida albicans* gene *HGT12* (orf19.7094) encodes a hexose transporter. Online. *Pathogens and Disease.* 2007, **51**(1), 14-17. ISSN 09288244. Dostupné z: https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00274.x. [cit. 2024-03-11].

[48] *HXK1 / YFR053C Overview*. Online. *Saccharomyces Genome Database*. Dostupné z: https://www.yeastgenome.org/locus/S000001949. [cit. 2024-03-23].

[49] HERRERO, Pilar; FLORES, Luis F.; DE LA CERA, Tamara a MORENO, Fernando. Functional characterization of transcriptional regulatory elements in the upstream region of the yeast *GLK1* gene. Online. *National Library of Medicine: National Center for Biotechnology information*. Dostupné z: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10510295/. [cit. 2024-03-23].

[50] SANDAI, Doblin; TABANA, Yasser a SANDAI, Rosline. Carbon Sources Attribute to Pathogenicity in *Candida albicans*. Online. *Candida albicans*. 2019. ISBN 978-1-83880-160-1. Dostupné z: https://doi.org/10.5772/intechopen.80211. [cit. 2024-03-23].

[51] JAKAB, Ágnes; TÓTH, Zoltán; NAGY, Fruzsina; NEMES, Dániel; BÁCSKAY, Ildikó et al. Physiological and Transcriptional Responses of C*andida parapsilosis* to Exogenous Tyrosol. Online. *Applied and Environmental Microbiology*. 2019, **85**(20), e01388-19. ISSN 0099-2240. Dostupné z: https://doi.org/10.1128/AEM.01388-19. [cit. 2024-03-26].

[52] KROČOVÁ, Eliška; NERADOVÁ, Sylva; KUPCIK, Rudolf; JANOVSKÁ, Sylva; BÍLKOVÁ, Zuzana et al. *PHO15* genes of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* encode HAD-type phosphatases dephosphorylating 2-phosphoglycolate. Online. *FEMS Yeast Research*. 2018. ISSN 1567-1364. Dostupné z: https://doi.org/10.1093/femsyr/foy112. [cit. 2024-03-26].

[53] *Phosphatase*. Online. *Mirriam-Webster.* Dostupné z: https://www.merriam-webster.com/dictionary/phosphatase. [cit. 2024-02-01].

[54] MAUNDERS, M. J. Alkaline Phosphatase (EC 3.1.3.1). Online. *Enzymes of molecular biology*. 331-341. ISBN 978-1-59259-503-7. Dostupné z: https://link.springer.com/protocol/10.1385/0-89603-234-5:331. [cit. 2024-02-01].

[55] COBURN, Stephen P.; MAHUREN, Dennis J.; JAIN, Manas; ZUBOVIC, Yvonne a WORTSMAN, Jacobo. Alkaline Phosphatase (EC 3.1.3.1) in Serum Is Inhibited by Physiological Concentrations of Inorganic Phosphate. Online. *The Journal of clinical endokrinology and metabolsim*. 1998, **83**(11), 3951-3957. ISSN 0021-972X. Dostupné z: https://doi.org/10.1210/jcem.83.11.5288. [cit. 2024-02-01].

[56] COLEMAN, J E. Structure and Mechanism of Alkaline Phosphatase. Online. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. 1992, **21**(1), 441-483. ISSN 1056-8700. Dostupné z: https://doi.org/10.1146/annurev.bb.21.060192.002301. [cit. 2024-02-01].

[57] LOWE, Dhruv; SANVICTORES, Terrence; ZUBAIR, Muhammad a JOHN, Savio. Alkaline Phosphatase. Online. *StatPearls*. 2024. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459201/. [cit. 2024-02-01].

[58] Purification and biochemical characterization of lysosomal acid phosphatases (EC 3.1.3.2) from blood stream forms, *Trypanosoma brucei*. Online. *Parasitology International*. **58**(3), 238-242. ISSN 1383-5769. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.parint.2009.05.001. [cit. 2024-02-01].

[59] ANAND, Asha a SRIVASTAVA, Pramod Kumar. A Molecular Description of Acid Phosphatase. Online. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2012, **167**(8), 2174-2197. ISSN 0273-2289. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s12010-012-9694-8. [cit. 2024-02-01].

[60] Acid Phosphatase. Online. *StatPearls*. 2024. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556039/. [cit. 2024-02-01].

[61] BROWN, Alistair J.P.; BROWN, Gordon D.; NETEA, Mihai G. a GOW, Neil A.R. Metabolism impacts upon *Candida* immunogenicity and pathogenicity at multiple levels. Online. *Trends in Microbiology*. 2014, **22**(11), 614-622. ISSN 0966842X. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.07.001. [cit. 2024-03-27].

[62] BARELLE, Caroline J.; PRIEST, Claire L.; MACCALLUM, Donna M.; GOW, Neil A. R.; ODDS, Frank C. et al. Niche-specific regulation of central metabolic pathways in a fungal pathogen. Online. *Cellular Microbiology*. 2006, **8**(6), 961-971. ISSN 1462-5814. Dostupné z: https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00676.x. [cit. 2024-03-27].

[63] PELLON, Aize; BEGUM, Neelu; SADEGHI NASAB, Shervin Dokht; HARZANDI, Azadeh; SHOAIE, Saeed et al. Role of Cellular Metabolism during *Candida*-Host Interactions. Online. *Pathogens*. 2022. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/patogeny11020184. [cit. 2024-03-27].

[64] BROWN, Alistair J.P.; ODDS, Frank C. a GOW, Neil A.R. Infection-related gene expression in *Candida albicans*. Online. *Current Opinion in Microbiology*.

2007, **10**(4), 307-313. ISSN 13695274. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.04.001. [cit. 2024-03-27].

[65] BEGUM, Neelu; LEE, Sunjae; PORTLOCK, Theo John; PELLON, Aize; SADEGHI NASAB, Shervin Dokht et al. Integrative functional analysis uncovers metabolic differences between *Candida* species. Online. *Communications Biology*. 2022, **5**(1). ISSN 2399-3642. Dostupné z: https://doi.org/10.1038/s42003-022-03955-z. [cit. 2024-04-15].

[66] BURGAIN, Anaïs; TEBBJI, Faiza; KHEMIRI, Inès; SELLAM, Adnane a MITCHELL, Aaron P. Metabolic Reprogramming in the Opportunistic Yeast *Candida albicans* in Response to Hypoxia. Online. *MSphere*. 2020, **5**(1), e00913-19. ISSN 2379-5042. Dostupné z: https://doi.org/10.1128/mSphere.00913-19. [cit. 2024-04-15].

[67] CHANDEL, Navdeep S. Glycolysis. Online. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2021, **13**(5). ISSN 1943-0264. Dostupné z: https://doi.org/10.1101/cshperspect.a040535. [cit. 2024-02-29].

[68] Glycolysis. Online. *Lumen Learning*. Dostupné z: https://courses.lumenlearning.com/wm-biology1/chapter/reading-glycolysis-2/. [cit. 2024-02-29].

[69] Glycolysis. Online. *Britannica*. 2024. Dostupné z: https://www.britannica.com/science/glycolysis. [cit. 2024-02-29].

[70] CHAUDHRY, Raheel a VARACALLO, Matthew. Biochemistry, Glycolysis. Online. *StatPearls*. 2023. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482303/. [cit. 2024-02-29].

[71] Glykolýza. Online. *Wikipedie.* Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Glykol%C3%BDza#/media/Soubor:Glycolyse.png. [cit. 2024-04-12].

[72] SÁNCHEZ-CLEMENTE, Rubén; GUIJO, M. Isabel; NOGALES, Juan a BLASCO, Rafael. Carbon Source Influence on Extracellular pH Changes along Bacterial Cell-Growth. Online. *Genes*. 2020, **11**(11). ISSN 2073-4425. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/genes11111292. [cit. 2024-03-11].

[73] SHIMIZU, Kazuyuki. 3 - Metabolic regulation by global regulators in response to culture environment. Online. *Bacterial Cellular Metabolic Systems*. 2013, 95-213. ISBN 978-1-907568-01-5. Dostupné

z: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9781907568015500037. [cit. 2024-03-11].

[74] XANG, Xin; XIA, Kang; YANG, Xiaojing a TANG, Chao. Growth strategy of microbes on mixed carbon sources. Online. *Nature*. 2019, ISSN 2041-1723. Dostupné z: https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41467-019-09261-3. [cit. 2024-03-11].

[75] DA SILVA, Gervásio Paulo; MACK, Matthias a CONTIERO, Jonas. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. Online. *Biotechnology Advances*. 2009, **27**(1), 30-39. ISSN 07349750. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.07.006. [cit. 2024-03-05].

[76] LIN, E. C. C. Glycerol dissimilation and its regulation in bacteria. Online. *Annual Review of Microbiology*. 1976, **30**(1), 535-578. ISSN 0066-4227. Dostupné z: https://doi.org/10.1146/annurev.mi.30.100176.002535. [cit. 2024-03-05].

[77] CHRISTOPH, Ralf; SCHMIDT, Bernd; STEINBERNER, Udo; DILLA, Wolfgang a KARINEN, Reetta. Glycerol. Online. *ULLMANN'S Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 2003. ISBN 9783527306732. Dostupné z: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14356007.a12_477.pub2. [cit. 2024-03-05].

[78] CHAI, Yunrong; BEAUREGARD, Pascale B.; VLAMAKIS, Hera; LOSICK, Richard a KOTLER, Roberto. Galactose Metabolism Plays a Crucial Role in Biofilm Formation by *Bacillus subtilis*. Online. *ASM Journals*. 2012, **3**(4). Dostupné z: https://doi.org/https://doi.org/10.1128/mbio.00184-12. [cit. 2024-03-05].

[79] *Galactose*. Online. Britannica. Dostupné z: https://www.britannica.com/science/galactose. [cit. 2024-03-05].

[80] MARTÍNEZ, Artemiza A.; CONBOY, Adrew; BUSKIRK, Sean W.; MARAD, Daniel A.; LANG, Gregory I. Long-Term Adaptation to Galactose as a Sole Carbon Source Selects for Mutations Outside the Canonical GAL Pathway. Online. *Journal of Molecular Evolution*. 2023, **91**, 46-59. Dostupné z: https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00239-022-10079-9. [cit. 2024-03-05].

[81] JIANG, Tianyi; GAO, Chao; MA, Cuiqing a XU, Ping. Microbial lactate utilization: enzymes, pathogenesis, and regulation. Online. Trends in Microbiology. 2014, **22**(10), 589-599. ISSN 0966842X. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.05.008. [cit. 2024-05-04].

[82] Lactic acid. Online. Britannica. Dostupné z: https://www.britannica.com/science/lactic-acid. [cit. 2024-05-04].

[83] OWEN, Derek H. a KATZ, David F. A vaginal fluid simulant. Online. *Contraception*. 1999, **59**(2), 91-95. ISSN 00107824. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/S0010-7824(99)00010-4. [cit. 2024-03-27].

[84] GESHNIZGANI, Ali M. a ONDERDONK, Andrew B. Defined Medium Simulating Genital Tract Secretions for Growth of Vaginal Microflora. Online. *Journal of Clinical Microbiology.* **30**(5). 1992. Dostupné z: https://doi.org/10.1128/jcm.30.5.1323-1326.1992. [cit. 2024-04-21].

[85] FALAVIGNA, Margherita. Složení VSF média. Online. *Research Gate.* Dostupný na: https://www.researchgate.net/figure/Composition-of-simulated-vaginal-fluid-SVF_tbl1_342305646. [cit. 27.3.2024].

[86] KUMAURA, Daiki; YAMAGUCHI, Ryo; HARA, Akane a NAKAOKA, Shinji. Disentangling the growth curve of microbial culture. Online. *Journal of Theoretical Biology*. 2023, **573**. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2023.111597. [cit. 2024-03-05].

[87] *Growth curve*. Online. Britannica. Dostupné z: https://www.britannica.com/science/growth-curve. [cit. 2024-03-05].

[88] TONNER, Peter D.; DARNELL, Cynthia L.; ENGELHARDT, Barbara E. a SCHMID, Amy K. Detecting differential growth of microbial populations with Gaussian process regression. Online. *Genome Research*. 2017, **27**(2), 320-333. ISSN 1088-9051. Dostupné z: https://doi.org/10.1101/gr.210286.116. [cit. 2024-03-05].

[89] BAILEY, Regina. Fáze křivky růstu bakterií. Online. *ThoughtCo*. Dostupné z: https://www.thoughtco.com/bacterial-growth-curve-phases-4172692 . [cit. 2024-03-05].

[90] Růstová křivka bakterií. Online. *Mikrobiologie*. Dostupné z: https://www.vovcr.cz/odz/zdrav/183/page05.html. [cit. 2024-04-12].

[91] RAO, Sakshi a Kavita ARORA. Recent trends in molecular techniques for food pathogen detection. Online, *Chemical Analysis of Food*. 177-285. ISBN 9780128132661. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813266-1.00005-X. [cit. 2023-08-07].

[92] ZADRAŽIL, Stanislav. Ribonukleové kyseliny: Věčné „druhé“ mezi nukleovými kyselinami. Online. *Živa*. Academia, 2007, (3), 98-100. Dostupné z:

https://ziva.avcr.cz/2007-3/ribonukleove-kyseliny-vecne-druhe-mezi-nukleovymi-kyselinami.html. [cit. 2023-08-07].

[93] CHATTERJEE, Kunal a Yao WAN. RNA. Online. *Britannica.* Dostupné z: https://www.britannica.com/science/RNA. [cit. 2023-03-15].

[94] WANG, David a FARHANA, Aisha. Biochemistry, RNA structure. Online. *National Center for Biotechnology Information: National Library of Medicine*. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK558999/#article-90914.s2. [cit. 2023-03-15].

[95] Dusíkaté báze molekulárních struktur. Online. *Myloview*. Dostupné z: https://myloview.cz/fototapeta-dusikate-baze-molekularnich-struktur-c-4C8B2B9. [cit. 2024-04-12].

[96] Beta-D-Ribofuranose. Online. *Wikimedia Commons*. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1825406. [cit. 2024-04-12].

[97] Messenger RNA. Online. *National Human Genome Research Institute*. Dostupné z: https://www.genome.gov/genetics-glossary/messenger-rna. [cit. 2023-08-16].

[98] THAPA, Rajat a ARYAL, Sagar. Messenger RNA (mRNA)- Definition, Structure, Processing, Types, Functions. Online. *Microbe Notes*. 2018. Dostupné z: https://microbenotes.com/messenger-rna/. [cit. 2023-08-23].

[99] Post-transcriptional Modification – Definition, Types, Process, Importance. Online. *Microbiology note.* Dostupné z: https://microbiologynote.com/post-transcriptional-modification/?utm_content=cmp-true#google_vignette. [cit. 2023-08-25].

[100] KRAHN, Natalie; FISCHER, Jonathan T. a SÖLL, Dieter. Naturally Occurring tRNAs With Non-canonical Structures. Online. *Frontiers in Microbiology*. 2020, **11**. ISSN 1664-302X. Dostupné z: https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.596914. [cit. 2023-08-17].

[101] THAPA, Rajat a ARYAL, Sagar. Transfer RNA (tRNA) – Definition, Structure, Processing, Types, Functions. Online. Microbe notes. 2018. Dostupné z: https://microbenotes.com/transfer-rna/. [cit. 2023-08-17].

[102] Struktura tRNA. Online. *Toppr.* Dostupné z: https://www.toppr.com/ask/question/draw-and-label-the-structure-of-trna/. [cit. 2024-04-12].

[103] RRNA. Online. *Multimediaexpo* Dostupné z: http://www.multimediaexpo.cz/mmecz/index.php/RRNA. [cit. 2023-08-23].

[104] MOKOBI, Faith a ARYAL, Sagal. 7 Types of RNA with Structure and Functions. Online. *Microbe Notes*. 2018. Dostupné z: https://microbenotes.com/types-of-rna/#2-ribosomal-rna-rrna-structure-and-functions. [cit. 2023-08-23].

[105] CRICHTON, Robert R. *Biological inorganic chemistry: a new introduction to molecular structure and function* . Online. 2008. ISBN 978-0-12-811741-5. Dostupné z: https://www.sciencedirect.com/book/9780444527400/biological-inorganic-chemistry. [cit. 2023-08-10].

[106] SHIJIE, Liu. *Bioprocess Engineering - Kinetics, Sustainability, and Reactor Design*. Online. 2020 ISBN 978-0-12-822383-3. Dostupné z: https://app.knovel.com/kn/resources/kpBEKSRDE3/toc?b-q=transcription&date_facets=%7B%21ex%3Dc%7Dcopyright_sort%3A%5B2019%20TO%202023%5D&facet_expanded=date&include_synonyms=no. [cit. 2023-08-10].

[107] ŠÍPEK, Antonín. Transkripce. Online. *Genetika - Biologie: Váš zdroj informací o genetice a biologii*. 2014. Dostupné z: http://www.genetika-biologie.cz/transkripce. [cit. 2023-08-10].

[108] Transcription. Online. *National Human Genome Research Institute*. Dostupné z: https://www.genome.gov/genetics-glossary/Transcription. [cit. 2023-08-13].

[109] Schéma transkripce. Online. *ELUC.* Dostupné z: https://eluc.ikap.cz/verejne/lekce/261. [cit. 2024-04-12].

[110] CASAMASSIMI, Amelia a CICCODICOLA, Alfredo. Transcriptional Regulation: Molecules, Involved Mechanisms, and Misregulation. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019, **20**(6). ISSN 1422-0067. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/ijms20061281. [cit. 2024-02-14].

[111] AHERN, Kevin a RAJAGOPAL, Indira. 5.4: Regulation of transcription . Online. *Libre Texts*. Dostupné z: https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Biochemistry/Book%3A_Biochemistry_Free_and_Easy_(Ahern_and_Rajagopal)/05%3A_Flow_of_Genetic_Information/5.04%3A_Regulation_of_Transcription. [cit. 2024-02-14].

[112] Regulace genové exprese. Online. *Biomach*. 2005. Dostupné z: https://www.biomach.cz/bun%C4%9B%C4%8Dn%C3%A1-a-

molekul%C3%A1rn%C3%AD-biologie/regulace-genov%C3%A9-exprese. [cit. 2024-02-14].

[113] MORIER, Douglas. Reverse transcriptase. Online. *Britannica.* Dostupné z: https://www.britannica.com/science/reverse-transcriptase. [cit. 2024-02-05].

[114] COFFIN, John M.; HUGHES, Stephen H. a VARMUS, Harold E. Retroviruses. Online. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1997. ISBN 10: 0-87969-571-4. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19376/. [cit. 2024-02-05].

[115] GREGOROVÁ, Dagmar. Retrovirus – genetický Jekyll a Hyde. Online. *OSEL (Objective Source E-Learning)*. 2002. ISSN 1214-6307. Dostupné z: https://www.osel.cz/12622-retrovirus-geneticky-jekyll-a-hyde.html#google_vignette. [cit. 2024-02-05].

[116] Izolace RNA. Online. *Lab Guide*. Dostupné z: https://labguide.cz/metody/izolace-nukleovych-kyselin-z-tkani/izolace-rna/. [cit. 2023-07-07].

[117] TAN, Siun Ch. a YIAP, Beow CH. DNA, RNA and Protein Extrantion: The Past and The Present. Online. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 2009. Dostupné z: https://doi.org/10.1155/2009/574398. [cit. 2024-04-21].

[118] Avoiding Ribonuclease Contamination. Online. *New England Biolabs.* Dostupné z: https://www.neb.com/en/tools-and-resources/usage-guidelines/avoiding-ribonuclease-contamination. [cit. 2024-04-21].

[119] Extrakce fenol-chloroform. Online. *SlidePlayer*. Dostupné z: https://slideplayer.cz/slide/13309272/#google_vignette. [cit. 2024-04-12].

[120] FARRELL JR., Robert E. Chapter 4 - RNA isolation strategies. Online. *RNA Methodologies*. 2022, 77-120. ISBN 978-0-323-90221-2. Dostupné z: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323902212000424. [cit. 2024-02-09].

[121] CHAUHAN, Tushar. RNA Extraction: Principle, Procedure, Protocol and Importance. Online. *Genetic Education*. Dostupné z: https://geneticeducation.co.in/rna-extraction-principle-procedure-protocol-and-importance/#Recent_advancements_in_RNA_extraction_technology. [cit. 2024-02-12].

[122] Spektrofotometrické vyhodnocení nukleových kyselin. Online. *Lab Guide.* Dostupné z: https://labguide.cz/metody/spektrofotometricke-vyhodnoceni-nukleovych-kyselin/. [cit. 2024-02-12].

[123] Izolace a purifikace nukleových kyselin. Online. *Multimediální učebnice DNA diagnostiky*. Dostupné z: https://kolweb.lf2.cuni.cz/projekty/prusa-dna/newlook/defa2.htm. [cit. 2024-02-12].

[124] OKAMOTO, T a OKABE, S. Ultraviolet absorbance at 260 and 280 nm in RNA measurement is dependent on measurement solution. Online. *International Journal of Molecular Medicine*. 2000. ISSN 1107-3756. Dostupné z: https://doi.org/10.3892/ijmm.5.6.657. [cit. 2024-02-12].

[125] CHAUHAN, Tushar. What is RNA Integrity Number (RIN)? and Why It Is Important? Online. *Genetic Education*. 2018. Dostupné z: https://geneticeducation.co.in/what-is-rna-integrity-number-rin-and-why-it-is-important/#google_vignette. [cit. 2024-02-18].

[126] LIGHTFOOT, S; SALOWSKY, R. a BUHLMANN, C. RNA integrity number: towards standardization of RNA quality assessment for better reproducibility and reliability of gene expression experiments. Online. *Breast Cancer Research*. 2005, **7**(2). ISSN 1465-542X. Dostupné z: https://doi.org/10.1186/bcr1197. [cit. 2024-02-18].

[127] KVASTAD, Linda; CARLBERG, Konstantin a LARSSON, Ludvig. The spatial RNA integrity number assay for in situ evaluation of transcriptome quality. Online. *Communications Biology*. 2021, **4**(1). Dostupné z: https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s42003-020-01573-1. [cit. 2024-02-18].

[128] Gelová elektroforéza. Online. *Molekulární biologie*. Dostupné z: https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-gelova_elektroforeza&lang=cz. [cit. 2023-11-29].

[129] Elektroforetická separace nukleových kyselin. Online. *Lab Guide*. Dostupné z: https://labguide.cz/metody/elektroforeticka-separace-nukleovych-kyselin/. [cit. 2023-11-29].

[130] Gel electrophoresis. Online. *Scitable*. Dostupné z: https://www.nature.com/scitable/definition/gel-electrophoresis-286/. [cit. 2023 11-29].

[131] LEE, Pei Yun; COSTUMBRADO, John; HSU, Chih-Yuan a KIM, Yong Hoon. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. Online. *Journal of Visualized Experiments*. 2012, (62). ISSN 1940-087X. Dostupné z: https://doi.org/10.3791/3923. [cit. 2023-11-29].

[132] SONAGRA, Amit D. a DHOLARIYA, Sagar J. Electrohoresis. Online. *National Center for Biotechnology Information*. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK585057/. [cit. 2023-11-29].

[133] Electrophoresis. Online. *National Human Genome Research Institute*. Dostupné z: https://www.genome.gov/genetics-glossary/Electrophoresis. [cit. 2024-04-12].

[134] Polymerase chain reaction (PCR). Online. *National Human Genome Research Institute*. Dostupné z: https://www.genome.gov/genetics-glossary/Polymerase-Chain-Reaction. [cit. 2023-10-31].

[135] DAHAL, Prashant. PCR- Definition, Principle, Enzymes, Steps, Types, Uses. Online. *Microbe Notes*. Dostupné z: https://microbenotes.com/pcr-principle-enzymes-steps-types-uses/. [cit. 2023-10-31].

[136] Polymerase Chain Reaction (PCR). Online. *National Center for Biotechnology Information.* Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/. [cit. 2023-11-10].

[137] GARIBYAN, Lilit a AVASHIA, Nidhi. Polymerase Chain Reaction. Online. *Journal of Investigative Dermatology*. 2013, **133**(3), 1-4. ISSN 0022202X. Dostupné z: https://doi.org/10.1038/jid.2013.1. [cit. 2023-11-10].

[138] AHRBERG, Christian D.; MANZ, Andreas a CHUNG, Bong Geun. Polymerase chain reaction in microfluidic devoces. Online. *Lab on a chip*. 2016, (20), 3866-3884. Dostupné z: https://doi.org/10.1039/c6lc00984k. [cit. 2024-04-21].

[139] NEIDLER, Sarah. What are the differences between PCR, RT-PCR, qPCR, and RT-qPCR? Online. *Enzo*. Dostupné z: https://www.enzolifesciences.com/science-center/technotes/2017/march/what-are-the-differences-between-pcr-rt-pcr-qpcr-and-rt-qpcr?/. [cit. 2023-11-10].

[140] ALBERTS, Bruce; BRAY, Dennis; JOHNSON, Alexander; LEXIS, Julian; RAFF, Martin; ROBERTS, Keith a WALTER, Peter. Základy buněčné biologie - Úvod do molekulární biologie buňky. 2005. ISBN 80-902906-2-0 [cit. 2024-04-12].

[141] WITTMEIER, Patrick a HUMMEL, Susanne. Agarose gel electrophoresis to assess PCR product yield: comparison with spectrophotometry, fluorometry and qPCR. Online. *BioTechniques*. 2022, **72**(4), 155-158. ISSN 0736-6205. Dostupné z: https://doi.org/10.2144/btn-2021-0094. [cit. 2024-04-20].

[142] WATSON, Ronald R. a PREEDY, Victor R. Multiplex PCR. Online. *Genetically Modified Organisms in Food - Production, Safety, Regulation and Public Health*. 2016. ISBN 978-0-12-802259-7. Dostupné

z: https://app.knovel.com/web/view/khtml/show.v/rcid:kpBAPAE001/cid:kt0050YDR1/viewerType:khtml//root_slug:biosensors-practical/url_slug:pcr-methods?b-q=types%20of%20PCR&include_synonyms=no&s_page_no=0&sort_on=default&view=collapsed&zoom=1&page=4&q=types%20. [cit. 2023-11-21].

[143] HOOFAR, J. Rapid Detection, Characterization, and Enumeration of Foodborne Pathogens – 2. Strenghts and Shortcomings of Advanced Detection Technologies. Online. *American Society for Microbiology (ASM),* 2011. ISBN 978-1-61344-269-2. Dostupné z: https://app.knovel.com/web/view/khtml/show.v/rcid:kpRDCEFP09/cid:kt0098GSU1/viewerType:khtml//root_slug:rapid-detection-characterization/url_slug:pcr?b-q=types%20of%20PCR&include_synonyms=no&s_page_no=0&sort_on=default&view=collapsed&zoom=1&page=9&q=type. [cit. 2023-11-21].

[144] PICO, Yolanda. Multiplex PCR. Online. *Chemical Analysis of Food - Techniques and Applications*. 2020. ISBN 978-0-12-813267-8. Dostupné z: https://app.knovel.com/web/view/khtml/show.v/rcid:kpCAFTAE02/cid:kt012LJFC3/viewerType:khtml//root_slug:chemical-analysis-food/url_slug:multiplex-pcr?b-q=types%20of%20PCR&include_synonyms=no&s_page_no=0&sort_on=default&view=collapsed&zoom=1&page=13&q=typ. [cit. 2023-11-21].

[145] BERÁNEK, Martin. *Molekulární genetika pro bioanalytiky*. Praha: Karolinum, 2016. ISBN 978-80-246-3224-7.

[146] ARYA, Manit; SHEGRILL, Iqbal S.; WILLIAMSON, Magali; GOMMERSALL, Lyndon; ARYA, Neehar; PATEL, Hitendra R. H. Basic principles of real-time quantitative PCR. Online. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2005, **5**(2), 209-219. Dostupné z: https://doi.org/10.1586/14737159.5.2.209. [cit. 2023-11-22].

[147] MORLEY, Alexander A. Digital PCR: A brief history. Online. *Biomolecular Detection and Quantification*. 2014, **1**(1), 1-2. ISSN 22147535. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.bdq.2014.06.001. [cit. 2023-11-23].

[148] TAYLOR, Sean C.; LAPERRIERE, Genevieve a GERMAIN, Hugo. Droplet Digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: from variable nonsense to publication quality data. Online. *Scientific Reports*. 2017, **7**(1). ISSN 2045-2322. Dostupné z: https://doi.org/10.1038/s41598-017-02217-x. [cit. 2023-11-23].

[149] MAO, Xiaodong; LIU, Chao; TONG, Hua; CHEN, Yajun a LIU, Kangsheng. Principles of digital PCR and its applications in current obstetrical and gynecological diseases. Online. *American yournal of Translational Research* . **11**(12), 7209-7222. 2019. ISSN 1943-8141. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6943456/ . [cit. 2023-11-23].

[150] UGOZZOLI, Luis a WALLACE, Bruce R. Allele-specific polymerase chain reaction. Online. *Methods*. 1991, **2**(1), 42-48. 2005. ISSN 10462023. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/S1046-2023(05)80124-0. [cit. 2023-11-23].

[151] BACHMAN, Julia. Reverse-Transcription PCR (RT-PCR). Online. *Laboratory Methods in Enzymology: RNA*. 67-74. 2013. ISBN 9780124200371. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420037-1.00002-6. [cit. 2023-11-29].

[152] FERRINI, Arianna. An Introduction to PCR. Online. *Technology Networks.* 2021. Dostupné z: https://www.technologynetworks.com/genomics/articles/an-introduction-to-pcr-345445. [cit. 2023-11-29].

[153] BUSTIN, Stephen A.; SHIPLEY, Gregory L.; KIRVELL, Sara; MUELLER, Reinhold a NOLAN, Tania. RT-qPCR Detection of SARS-CoV-2: No Need for a Dedicated Reverse Transcription Step. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022, **23**(3). ISSN 1422-0067. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/ijms23031303. [cit. 2024-04-18].

[154] Real-time PCR. Online. *Lab Guide*. Dostupné z: https://labguide.cz/metody/real-time-pcr/. [cit. 2024-04-18].

[155] ASKEW, Christopher; SELLAM, Adnane; EPP, Elias; HOGUES, Hervé; MULLICK, Alaka et al. Transcriptional Regulation of Carbohydrate Metabolism in the Human Pathogen Candida albicans. Online. PLoS Pathogens. 2009, **5**(10). ISSN 1553-7374. Dostupné z: https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000612. [cit. 2024-05-04].

[156] Protokol: Nothernova hybridizace. Online. LabGuide. Dostupné z: https://labguide.cz/wp-content/uploads/2022/05/PROTOKOL-Northernova-hybridizace.pdf. [cit. 2024-05-04].

[157] Don’t Let Ribonucleases Ruin Your Week(end): Establish a Ribonuclease-free Environment. Online. Promega Connections. Dostupné z: https://www.promegaconnections.com/dont-let-ribonucleases-ruin-your-weekend-establish-a-ribonuclease-free-environment/. [cit. 2024-05-04].

[158] BENDER, Andrew T.; SULLIVAN, Benjamin P.; LILLIS, Lorraine; POSNER, Jonathan D. Enzymatic and Chemical-Based Methods to Inactivate Endogenous Blood Ribonucleases for Nucleic Acid Diagnostics. Online. The Journal of Molecular Diagnostics. **22**(8). 2020. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2020.04.211. [cit. 2024-05-04].

[159] BERGMAN, A.; FERNANDEZ, V.; HOLMSTRÖM, K. O.; CLAESSON, B. E. B. a ENROTH, H. Rapid identification of pathogenic yeast isolates by real-time PCR and two-dimensional melting-point analysis. Online. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2007, **26**(11), 813-818. ISSN 0934-9723. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s10096-007-0369-2. [cit. 2024-05-04].

[160] 4 Easy Steps to Analyze Your qPCR Data Using Double Delta Ct Analysis. Online. Bitesize Bio. Dostupné z: https://bitesizebio.com/24894/4-easy-steps-to-analyze-your-qpcr-data-using-double-delta-ct-analysis/. [cit. 2024-05-04].