

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Opportunista humánpatogén gombák virulenciájának és patogenitásának komplex vizsgálata



DR. GÁCSER ATTILA

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Mikrobiológiai Tanszék

SZEGED

2016



TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉS.....	4
CÉLKITŰZÉSEK.....	5
EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS	6
A <i>C. parapsilosis</i> genetikai manipulációjára alkalmas rendszer kidolgozása	6
A szekretált lipázok szerepének vizsgálata a <i>C. parapsilosis</i> virulenciájában és a kiváltott betegség patomechanizmusában.....	7
A <i>C. parapsilosis</i> szekretált aszpartil proteináz 1 (Sapp1) virulenciában betöltött szerepének vizsgálata	11
Humán perifériás vérből izolált mononukleáris sejtek <i>C. parapsilosis</i> és <i>C. albicans</i> fertőzésre adott válaszreakciójának összehasonlítása, illetve a <i>C. parapsilosis</i> és <i>C. albicans</i> által indukált T helper sejt polarizáció összehasonlítása.....	14
TUDOMÁNYMETRIAI ADATOK	17
AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA.....	18
EGYÉB A DOLGOZAT TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA	20
IRODALOMJEGYZÉK.....	24

BEVEZETÉS

Az Egészségügyi Világszervezet jelentése szerint a fertőző betegségek még mindig az egyik leggyakoribb halállokként azonosíthatóak világszerte. Fontos megjegyezni, hogy míg a bakteriális vagy a vírus okozta megbetegedések folyamatosan nagy figyelmet kapnak mind a tudományos, mind a laikus közvélemény részéről, addig a gombák által kiváltott fertőzésekről sokkal kevesebbet hallani. Figyelemreméltó, hogy egyelőre nem létezik egy globális, gombák által okozott megbetegedéseket összesítő felmérés, így csupán becslésekre tudunk hagyatkozni. Brown és munkatársai által készített tanulmány alapján napjainkban az invazív mikózisok közel annyi halálesetet okoznak évente, mint a tuberkulózis (1,4 millió) vagy a malária (1,2 millió) [1, 2].

Egyértelmű tehát, hogy a gombák okozta fertőzések komoly egészségügyi problémát jelentenek elsősorban azért, mert igen magas mortalitással járnak, amely megközelítheti a 60–70 %-ot is [3, 4]. Az invazív mikózisok túlnyomó többségét ún. opportunistá patogén fajok okozzák, amelyek egészséges egyénekben nem váltanak ki megbetegedést, az immunrendszer legyengülése esetén azonban gyorsan elterjedhetnek a szervezetben. Ezért különösen veszélyeztetettek a hematológiai rendellenességekben (pl. neutropénia) szenvedők, szerv transzplantáción átesettek, HIV fertőzöttek, illetve kemoterápiában vagy immunszuppresszív kezelésben részesülő betegek [1, 5]. Az opportunistá mikózisok legnagyobb részéért világszerte a *Candida* fajok felelősek.

Noha az invazív candidiasis leggyakoribb okozója a *C. albicans*, a nem-*albicans* fajok által kiváltott fertőzések éves előfordulási gyakorisága az utóbbi évtizedekben folyamatos növekedést mutat. Az egyik klinikai szempontból legjelentősebb faj a *C. parapsilosis*, amely világszerte a szisztémás candidiasis esetek mintegy 17 %-át okozza [6]. Továbbá, míg a *C. albicans* által okozott fertőzések száma hasonló gyermekek és felnőttek esetében, a *C. parapsilosis* fiatalkorúakban, különösen újszülöttekben, sokkal gyakrabban fordul elő [7]. Noha az utóbbi években intenzíven vizsgálják az invazív candidiasis patogenezisét, a kórokozók virulencia faktorait, a tanulmányok túlnyomó többsége a *C. albicans* kutatására irányul, míg a *C. parapsilosis* által okozott fertőzések patomechanizmusának molekuláris hátteréről jelenleg kevés ismeretünk van.

Munkánk során célul tűztük ki, hogy megértsük a *C. parapsilosis* specifikus patomechanizmusokat, a gomba virulencia faktorait és a gazdaszervezet válaszreakcióinak fő komponenseit.



CÉLKITŰZÉSEK

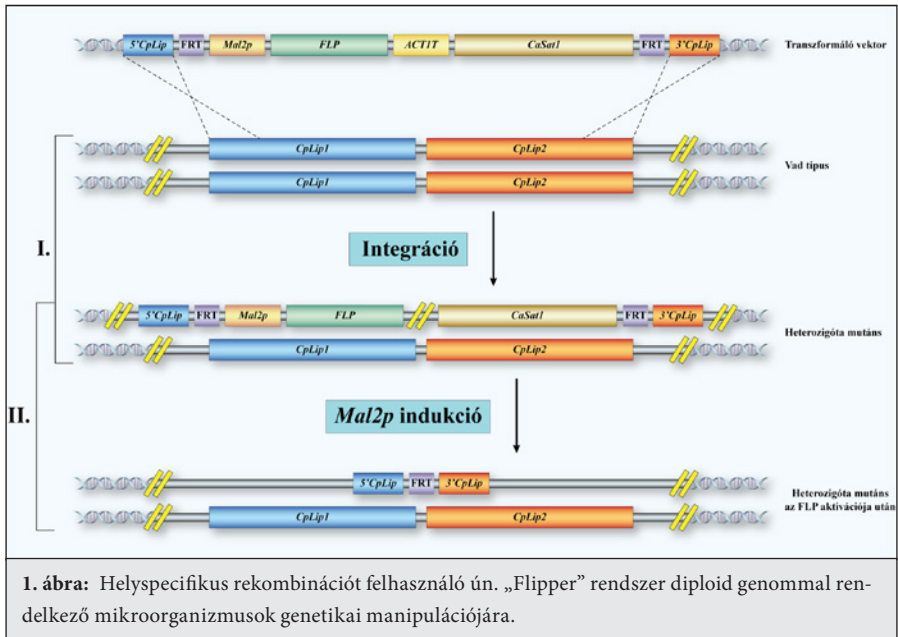
- I. Olyan eljárás kidolgozása, amely lehetővé teszi a *C. parapsilosis* genetikai manipulációját, célzott génkiütés alkalmazásával.
- II. *In vitro*, *ex vivo* és *in vivo* modellrendszerek kidolgozása, illetve továbbfejlesztése a *C. parapsilosis* virulenciájának és patomechanizmusainak vizsgálatára.
- III. A fenti eszközrendszerek felhasználásával a szekretált hidrolitikus enzimek (lipázok és proteinázok) szerepének vizsgálata a *C. parapsilosis* virulenciájában és a kiváltott betegség patomechanizmusában.
- IV. A *C. parapsilosis* által kiváltott immunválasz vizsgálata, egyrészt a *C. parapsilosis* és *C. albicans* által indukált T helper sejt polarizáció összehasonlítása, másrészt az immunológiai felismerésben szerepet játszó receptorok feltérképezése és a felismerést követő intracelluláris jeltovábbítás elemeinek vizsgálata.

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS

Ezen célkitűzések alapján elvégzett vizsgálataink főbb eredményei a következők:

A *C. parapsilosis* genetikai manipulációjára alkalmas rendszer kidolgozása

Egy hatékonyan működő transzformációs, illetve célzott génkiütésre alkalmas technika elengedhetetlen feltétele bármilyen olyan vizsgálatnak, amely egy tulajdonság molekuláris hátterét kívánja célozni. Különösen igaz ez olyan mikroorganizmusok tekintetében, ahol a szexuális ciklus ismeretlen és így a klasszikus genetikai módszerek nem, vagy nagyon korlátozottan alkalmazhatók. Munkánk kezdetén tehát elsődleges célunk egy hatékony, transzformáción alapuló génkiütési technika kidolgozása volt. Mindenekelőtt kidolgoztuk a *C. parapsilosis* elektroporáción alapuló transzformációját, majd bizonyítottuk, hogy domináns szelekcióra alkalmas génbeviteli módszert hoztunk létre. Ezt követően a diploid genomban megvalósítható génkiütéshez szükséges rendszert hoztuk létre. Az *E. coli* *SAT1* génje, amely sztreptotricin aciltranszferázt kódol, rezisztenciát biztosít a nourseothricinnel szemben. Ebben az esetben a CTG kodonokat CTT kodonokkal helyettesítették. A módosított *CaSAT1* szekvenciát sikeresen expresszáltatták *C. albicans*-ban, annak *ACT1* promóterét és *PCK1* terminátorát alkalmazva [8]. Egy évvel később, ezen optimalizált szekvenciának egy másik változatát is kidolgozták, ahol a *C. albicans* *ACT1* promóter és *URA3* terminátor szekvenciáját alkalmazták (*caSAT1*) [9]. Ugyanezen munka során a *caSAT1* marker flipper variánsát is kidolgozták, lehetőséget nyitva több gén deléciójához, ugyanabban az organizmusban. A módszert sikeresen adaptáltuk és ennek eredményeként lehetővé vált a *C. parapsilosis* célzott genetikai módosítása. (1. ábra)



A szekretált lipázok szerepének vizsgálata a *C. parapsilosis* virulenciájában és a kiváltott betegség patomechanizmusában

Az elmúlt években a patogén mikroorganizmusok szekretált extracelluláris enzimei egyre nagyobb figyelmet kaptak a patogenezisben betöltött valószínűsíthető szerepük miatt, illetve mert célpontjai lehetnek a fertőzések kezelésére alkalmazható szintetikus gátlószereknek. Ilyen enzimek például a szekretált proteázok és lipázok [10, 11, 12]. Eddigi munkánk alapján már tudjuk, hogy a szekretált lipázok a gazdaszervezetben elérhető szabad zsírsavak lipidekből történő felszabadítása mellett számos egyéb funkcióval rendelkeznek.

A dolgozatban bemutatott eredményeink és legújabb, még nem publikált adataink is arra utalnak, hogy a gomba által termelt szekretált lipázok virulenciában játszott szerepe sokrétű, mivel a gazda immunválaszt mind sejt szinten, mind pedig humorális szinten befolyásolják, ezáltal lehetőséget biztosítanak a gomba számára a gazdaszervezet kolonizációjához [13, 14, 15]. A gazdaszervezetből származó tápanyagok felhasználásán

kívül, hozzájárulnak még tovább a gazdaszöveteken történő kitapadásához, a kompetitív mikroflóra líziséhez, valamint modulálhatják a gazda gyulladásos folyamatait, ami további szövetkárosodáshoz vezethet [13, 14].

Mindezidáig *Candida albicans*-ban 10 különböző extracelluláris lipáz enzim kódoló gént azonosítottak [11]. Ezen gének fertőzést követően különbözőképpen szabályozottak, valamint expressziójuk leginkább a fertőzés egy adott stádiumától függ [16]. Továbbá az egyes gének különböző mértékben járulnak hozzá a gomba virulenciájához, melyek közül a *LIP5* és *LIP8* a leginkább kiemelték [16, 17].

A *C. albicans*-szal ellentétben, a *C. parapsilosis* esetében csupán két lipáz szekrécióért felelős gént azonosítottak be. Mivel ezen gének leginkább a *C. albicans* *LIP1*-gyel mutattak nagymértékű homológiát, ezért ezek a *LIP1* és *LIP2* elnevezést kapták [18]. Ezen gének *S. cerevisiae*-vel és *P. pastoris*-szal történő expresszáltatása során bebizonyult, hogy a két gén közül csak a *LIP2* kódol funkcionális fehérjét [18, 19].

Bár a *C. parapsilosis* *LIP1*, *LIP2* expressziós vizsgálatai hozzájárultak ismereteink ezen területének kibővítéséhez, nem adtak választ a gének virulenciában betöltött szerepének kérdésére. Később, az általunk bevezetett génmanipulációs technikák segítségével sikerült létrehozni az első lipáz deficiens *C. parapsilosis* deléciós mutáns törzset, mely segítségével megkezdődött a szekretált lipázok szerepének vizsgálata a gomba virulenciájában [14]. Itt kell megemlíteni, hogy mivel a *C. parapsilosis* esetében csak két lipáz kódoló gént ismertünk, lehetséges volt egy ún. „lipáz negatív” törzs létrehozása. Ennek köszönhetően a gomba eredetű extracelluláris lipázok szerepe vizsgálhatóvá vált a gazda-patogén kölcsönhatások során. Így egyfajta modellrendszert is létrehoztunk, ahol általános megfigyeléseket tehetünk, ugyanis a *C. albicans* esetében – ahogyan már említettem – 10 lipáz gént azonosítottak, amelyek egyidejű deléciója még ma is komoly kihívás. Már az első vizsgálatok során bizonyosságot nyert, hogy a szekretált lipázoknak fontos szerepe van a lipid gazdag tápanyag hasznosításában, biofilm képzésben, továbbá a gazda felületén történő kitapadásban, és az immunválasz módosításában is [14].

Kidolgoztunk és továbbfejlesztettünk számos, a gazda-patogén kölcsönhatás vizsgálatára alkalmas rendszert, többek között egér makrofág sejtvonalakat, humán primer makrofágokat és dendritikus sejteket felhasználó rendszereket [14, 13, 21]. Mind az egér, mind pedig a humán forrásból származó makrofágok nagyobb hatékonysággal pusztították el a lipáz deficiens sejteket a vad típusú gombasejtekhez képest, ezáltal bebizonyosodott a mutáns törzs csökkent virulenciája és bizonyításra került a gombasejtek szekretált lipázainak virulenciában betöltött szerepe [14, 13, 21]. Humán primer makrofágok és dendritikus sejtek citokin termelése során magasabb gyulladást

elősegítő citokin (IL-1 β , IL-6, TNF- α) és kemokin (IL-8, COX-2) szintet azonosítottunk, valamint primer makrofágok esetén módosult gyulladásgátló válasz (alacsony IL-10) volt mérhető a lipáz negatív törzs jelenlétében. A fenti adatokból arra a következtetésre jutottunk, hogy a *C. parapsilosis* által termelt lipázoknak gyulladáscsökkentő hatása van, amely kedvező lehet a patogén számára a fertőzés folyamán, mivel a hatékony gyulladásos válasz nélkülözhetetlen a patogén eliminációjához.

Ezzel összefüggésben, humán dendritikus sejtek esetében a fagocitózis hatékonysága is megnövekedett a mutáns sejtek jelenlétében, ellenben humán primer makrofágok esetén a fagocitózis hatékonyságában nem volt észlelhető szignifikáns különbség a lipáz deficiens és vad típusú törzsek között. Azonban a dendritikus sejtekkel egyetemben a mutáns törzsek esetében korai fago-lizoszóma aktiváció volt megfigyelhető [13, 21]. Ezzel igazoltuk a szekretált lipázok támogató szerepét a gomba intracelluláris túlélő stratégiájában.

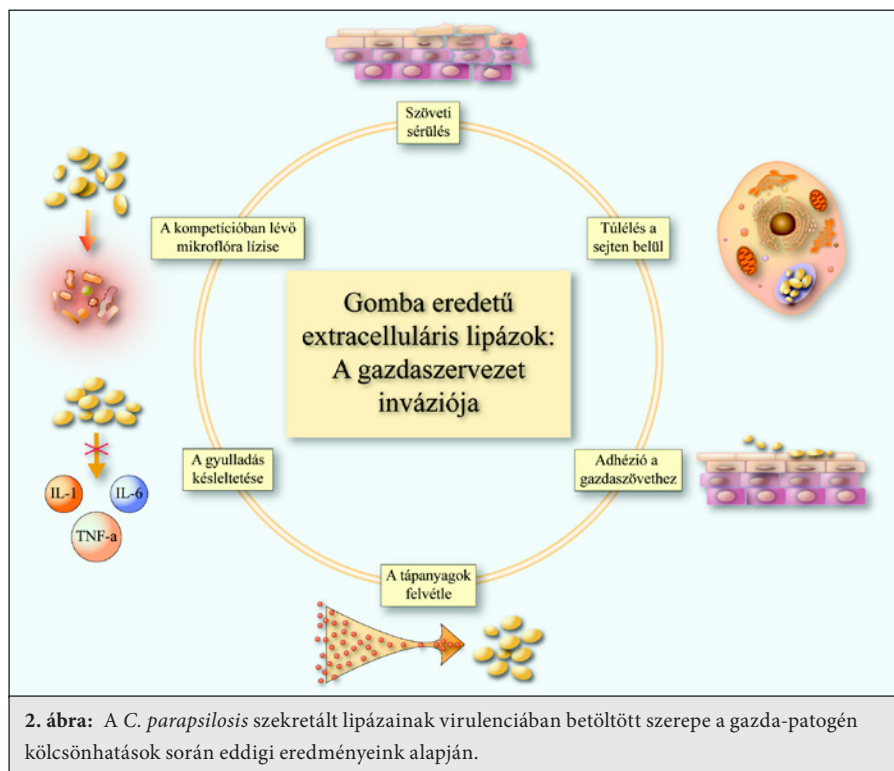
Rekonstruált humán szövetek *C. parapsilosis*-szal történő fertőzését követően súlyos hisztopatológiai elváltozások voltak megfigyelhetők, úgymint atrófia, ödéma, és hasadékok megjelenése valamennyi szövetrétegben, ezek mellett a gazdasejtek apoptózisa is megfigyelhető volt [22]. Ezzel ellentétben a lipáz negatív *C. parapsilosis* törzsszel történő fertőzés során a szövetkárosodás minimális mértékű volt, és a fertőzött szövet jellegét tekintve inkább a kezeletlen kontrolléhoz volt hasonlítható [22]. A sejtek epitél felszínhez történő kitapadása is lényegesen rosszabbnak bizonyult, mint a vad típusú törzs esetében. A szövetkárosodás laktát-dehidrogenáz (LDH) felszabadulással is mérhető, mely során a deficiens törzs esetén minimális LDH volt csupán kimutatható a vad típusú törzshöz képest [22]. Mindezen eredmények arra utaltak, hogy a *C. parapsilosis* szekretált lipázok jelentős szerepet játszanak a gomba szövetekhez történő adhéziójában és szövetkárosításában.

A rágszáló vagy humán sejteket felhasználó modellrendszerek alkalmazása számos hasznos információt szolgáltatott a lipázok gazda-patogén kölcsönhatások során betöltött szerepéről, azonban a patológias folyamatok megértéséhez szükség van az összetettebb *in vivo* fertőzési modellekre is. A *C. parapsilosis* ellentétben a *C. albicans*-szal nem képes letális fertőzés kiváltására egérmodellben. Így túlélési vizsgálatok ezzel a fajjal nem végezhetőek. A különböző szervekből kimutatható gombatelepek száma azonban korrelál a fertőzés súlyosságával, így immunkompetens állatokat felhasználó CFU (kolóniaképző egység) meghatározáson alapuló módszert dolgoztunk ki a *C. parapsilosis* fertőzések nyomonkövetésére. Ilyen modellek felhasználásával is alátámasztottuk a szekretált lipázok patogenitásban betöltött szerepét [22, 23]. Balb/c egerek vad típusú és lipáz

hiányos *C. parapsilosis* sejtekkel történő intraperitoneális fertőzését követően, a mutáns törzs esetén szignifikánsan csökkent a gomba szerv kolonizáló képessége (csökkent CFU) mely mind a lépből, veséből és májból egyaránt kimutatható volt, továbbá gyorsabb gomba elimináció volt megfigyelhető a vad típusú törzzsel szemben [22].

Mivel ismeretes, hogy a *C. parapsilosis* fertőzések előfordulását tekintve az újszülötteknél, főleg alacsony születési súlyú csecsemők körében a gyakoribb [24, 25], ezért egy olyan modellt is kidolgoztunk, ahol ezt a helyzetet kívántuk modellezni. Újszülött patkányok intravénás, intraperitoneális, valamint emésztőszervrendszerbe történő *C. parapsilosis* injektálását követően, a lipáz negatív törzs esetében ismételt alacsonyabbnak bizonyult a gomba szervkolonizáló képessége a vad típusú törzzsel szemben [23].

Tehát a *C. parapsilosis* szekretált lipázok virulenciában játszott szerepe, a sejt és szövet szintű interakció vizsgálatok mellett, komplex szervezetek esetén is alátámasztásra került (2. ábra).



A *C. parapsilosis* szekretált aszpartil proteináz 1 (Sapp1) virulenciában betöltött szerepének vizsgálata

A *C. albicans* által szekretált aszpartil proteinázok (Sap) virulenciában betöltött szerepe régóta tanulmányozott terület [26]. *C. albicans*-ban végzett vizsgálatok azt igazolták, hogy ebben a fajban a szekretált aszpartil proteinázok virulenciában betöltött szerepe igen sokrétű, számos, a gazdaszervezetben megtalálható strukturális és anti-mikrobiális proteinek bontására képesek, ezáltal elősegítve a mikroba szervezeten belüli terjedését [27], [28].

C. parapsilosis esetén ebben az időben (2009) Olga Hruskova-Heidingsfeldova és munkatársai sikeresen azonosították, tisztították és jellemezték a *C. parapsilosis* Sapp1 és Sapp2 fehérjét [29,30], ám a szekretált aszpartil proteinázok virulenciában betöltött szerepéről információ nem állt rendelkezésre. Az enzimológiai vizsgálatok szerint a mikroba fő szekretált aszpartil proteináza a Sapp1 fehérje, amely induktív körülmények közt legalább egy nagyságrenddel nagyobb mértékben termelődik, mint a Sapp2 fehérje, valamint szubsztrát specifitása is sokkal szélesebb [30].

Mindezen adatokból kiindulva munkánk kezdeteként célul tűztük ki a *C. parapsilosis* fő szekretált aszpartil proteinázának, a Sapp1 fehérjének virulenciában betöltött szerepének vizsgálatát. Előzetes vizsgálataink során felmerült annak a lehetősége, hogy a *SAPP1* gén két kópiában van jelen a genomban, ezért a rendelkezésünkre álló szekvencia adatok felhasználásával elvégeztük a *SAPP1* lókuszt *in silico* analízisét. Az analízis két identikus 2871 bp méretű szekvenciát azonosított egymástól 32 kb távolságra, amely szakaszok egy-egy kópiában tartalmazzák a *SAPP1* gént, így a két kópiát *SAPP1a* és *SAPP1b* néven különítettük el egymástól. Geraldine Butler és munkatársai 2009 végén publikálták a *C. parapsilosis* annotált genomszekvenciáját [31], amely adatok megerősítették az *in silico* vizsgálat helyességét.

Annak érdekében, hogy a Sapp1 fehérje virulenciában betöltött szerepéről felvilágosítást nyerjünk, a *caSAT1* flipper rendszer segítségével elvégeztük a *SAPP1a* és *SAPP1b* gének delécióját, valamint sikerrel létrehoztunk egy Δ/Δ *sapp1a*- Δ/Δ *sapp1b* dupla deléciós törzset is. A *SAPP1* gének elvesztését a Sapp1 és Sapp2 fehérjék enzimaktivitásának vizsgálatára alkalmas HPLC analízissel igazoltuk. A dupla deléciós törzs esetén sem RNS, sem enzim aktivitási szinten nem tudtunk kimutatni *SAPP1* génexpressziót, illetve Sapp1 fehérje aktivitást. Érdekes módon a dupla deléciós törzs esetén a vad típushoz képest emelkedett mértékű *SAPP2* génexpressziót, valamint enzim aktivitás emelkedést tapasztaltunk. Ezen jelenség hátterében valószínűsíthetően egy visszacsatoló mechanizmus

állhat, amely működésének eredményeként a Sapp2 fehérje emelkedett termelését vagy a már megtermelt enzim aktivitásának fokozódását eredményezte, amely mintegy kompenzációs mechanizmusként szolgál a *SAPP1* elvesztésére. Ez a jelenség felhívja a figyelmet arra, hogy akárcsak *C. albicans* esetén [28], *C. parapsilosis*-ban a szekretált aszpartil proteinázok kifejeződése szintén szigorú szabályozás alatt áll.

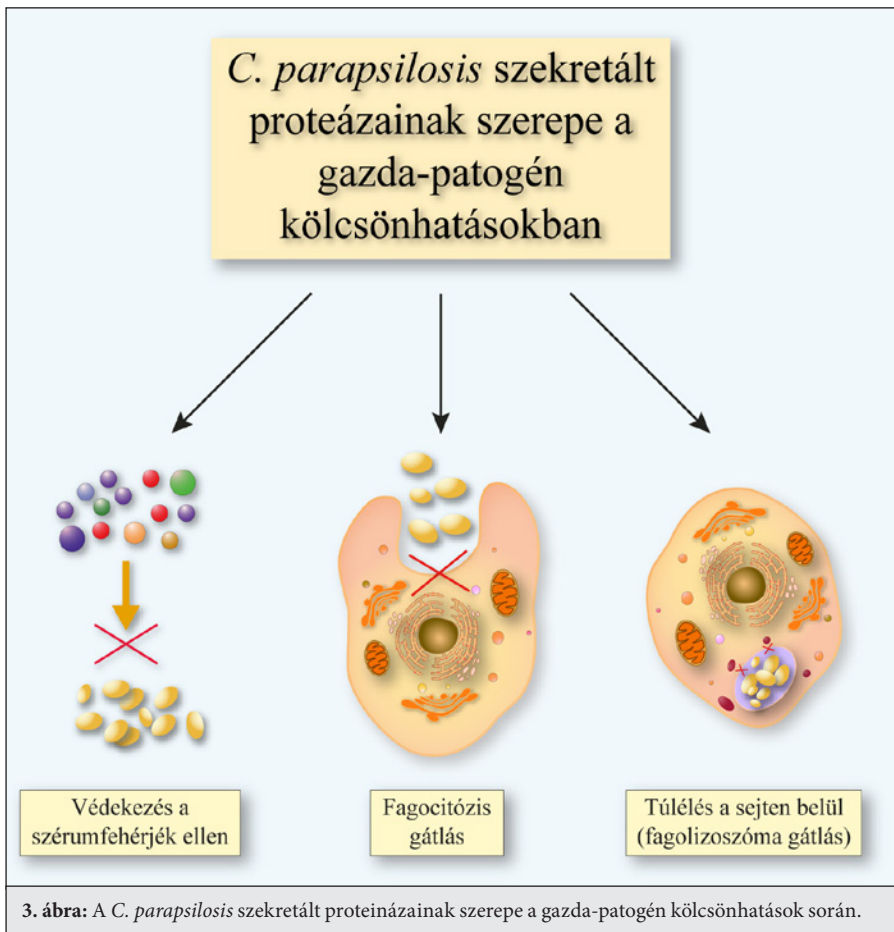
C. albicans esetén régóta tudott, hogy a szekretált aszpartil proteinázok képesek a szérumban található számos komplement komponens bontására, ezáltal semlegesítve a gazdaszervezet humorális védekezését [32]. Annak kiderítésére, hogy a Sapp1 fehérje rendelkezik-e hasonló szereppel, elvégeztük a vad típusú és a különböző Sapp1 mutáns törzsek szérumérzékenységének vizsgálatát. Eredményeink azt mutatták, hogy intakt humán szérum jelenlétében a vad típusú és a $\Delta/\Delta\text{sapp1a}$ és $\Delta/\Delta\text{sapp1b}$ törzsek növekedése közt nem mutatkozott különbség, viszont a *SAPP1* deléciós mutáns törzs esetén a növekedés mértéke jelentős mértékben visszaesett. Ez az eredmény arra enged következtetni, hogy a *C. parapsilosis* Sapp1 fehérjéjének, hasonlóan a *C. albicans* Sap fehérjéjéhez, szerepe lehet a szérumban megtalálható komplement komponensek bontásában. A jelenség pontos okának kiderítése további biokémiai vizsgálatokat igényel tisztított Sapp1 fehérje, valamint tisztított komplement komponensek és egyéb, szérumban található antimikrobiális peptidek (pl. defenzinek) bevonásával.

Egy fertőzés folyamatában a szervezetbe kerülő patogénnel elsőként makrofágok kerülnek kapcsolatba. A felismerést követően egyik legfontosabb celluláris antimikrobiális folyamat a mikroba fagocitózisa. A primer fagoszóma lizoszómával való fúziója pH csökkenéssel jár, melynek során megtörténik a patogén eliminációja [33]. Hogy ezeket a folyamatokat tanulmányozzuk, primer emberi sejteket használtunk modellként (PBMC és PBMC-DM sejtek). Áramlási citometriás méréseink szerint a vad típushoz képest a *SAPP1* deléciós törzsek fagocitózisa jóval eredményesebben valósult meg. A fagocitózis folyamatának részletesebb tanulmányozása érdekében fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatokat végeztünk PBMC-DM sejtek és vad típusú, valamint *SAPP1* mutáns *C. parapsilosis* törzsek felhasználásával. A vad típusúval fertőzött mintákhoz képest a Sapp1 fehérjét nem termelő mutáns törzzsel fertőzött PBMC-DM sejtek esetén emelkedett mértékű fago-lizoszóma fúziót figyeltünk meg. Ismeretes, hogy a fagoszóma lizoszómával történő fúziójához számos, a vezikulák felszínén található receptor-ligand kötődése szükséges [34]. Az általunk végzett megfigyelés felveti annak a lehetőségét, hogy a Sapp1 fehérjének szerepe van a mikroba fagocita sejten belüli túlélésében is.

PBMC és PBMC-DM sejtek alkalmazásával vizsgáltuk a gazdaszervezet vad típusú és deléciós mutánsokkal szembeni gombaölési képességét. Mind a PBMC, mind az ezekből

differentiáltatott primer makrofágok esetén a dupla deléciós mutánsokkal szembeni gombaölési képesség szignifikáns emelkedést mutatott. Ezzel párhuzamosan a *SAPP1* deléciós törzs gazdasejtet károsító képessége csökkenést mutatott a vad típusú törzzsel összevetve.

Összegezve eredményeink azt mutatják, hogy a *Sapp1* fehérje jelentős szereppel bír a mikroba virulenciájának kialakításában. Szerepe van a gazda antimikrobiális peptidjeinek semlegesítésében, a fagocitózis gátlásában, valamint nagymértékben hozzájárul a patogén fagocita sejten belüli túléléséhez egyaránt (3. ábra).



Humán perifériás vérből izolált mononukleáris sejtek *C. parapsilosis* és *C. albicans* fertőzésre adott válaszreakciójának összehasonlítása, illetve a *C. parapsilosis* és *C. albicans* által indukált T helper sejt polarizáció összehasonlítása

Az opportunista gombafertőzések következtében kialakuló immunválasz vizsgálata elsősorban a *C. albicans* okozta megbetegedésekre koncentrál. Kevés információval rendelkezünk az ún. „nem-*albicans*” fajok által kiváltott gazdaválaszról. Ezért megvizsgáltuk és összehasonlítottuk a hővel előlt *C. parapsilosis* és *C. albicans* által indukált pro-inflammatorikus citokin termelést humán perifériás vérből izolált mononukleáris sejtekben. Azt tapasztaltuk, hogy a *C. parapsilosis*-szal stimulált sejtek hasonló mértékű TNF α és IL-6, valamint mintegy 20%-kal alacsonyabb szintű IL-1 β termelést mutattak a *C. albicans*-szal fertőzött sejtekhez képest. A Th sejtcsinkinek vizsgálata esetén azonban eredményeink azt mutatták, hogy a *C. parapsilosis* 48 óra elteltével szignifikánsan alacsonyabb IFN γ , ugyanakkor magasabb IL-10 termelést indukált mononukleáris sejtekben, mint a *C. albicans*. Továbbá, a *C. parapsilosis* jelentősen kisebb mértékű IL-17 és IL-22 termelést váltott ki 7 napos stimulációt követően. Intracelluláris citokin festést követő áramlási citometriás analízissel megerősítettük, hogy a *C. parapsilosis*-szal stimulált mintákban 7 nap elteltével alacsonyabb volt az IL-17 termelő CD4⁺ Th sejtek aránya. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy míg a *C. albicans* fertőzés Th1/Th17-domináns T-sejt polarizációt indukál, *C. parapsilosis* fertőzés esetén ez az egyensúly Th2/Treg irányba tolódik el.

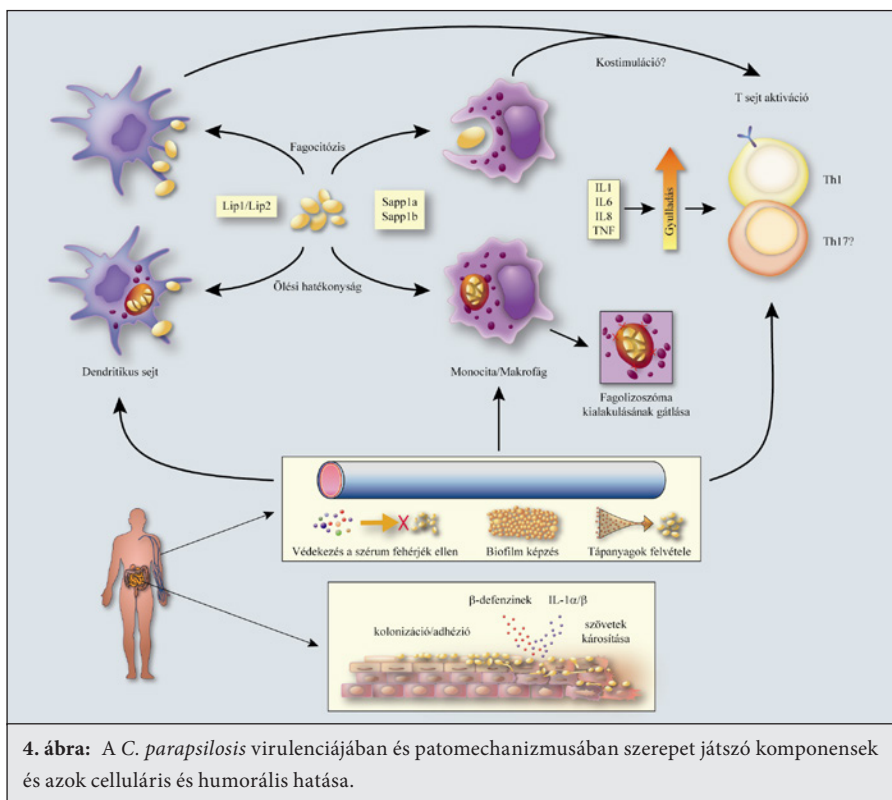
A továbbiakban megvizsgáltuk a Dectin-1, TLR4 és TLR2 receptorok szerepét a *C. parapsilosis* és *C. albicans* által indukált citokin termelésben. A Dectin-1 receptor gátlása esetén mind a *C. parapsilosis*-szal, mind a *C. albicans*-szal stimulált mononukleáris sejtek jelentősen csökkent citokin (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN γ) termelést mutattak, jelezve, hogy ez a receptor mindkét faj felismerésében fontos szerepet játszik. Ugyanakkor, míg a TLR4 blokkolása nem volt hatással a mononukleáris sejtek citokin termelésére, eredményeink alapján a TLR2 szerepet játszik az IL-1 β és IL-6 indukációjában. Nem tapasztaltunk azonban jelentős különbséget a *C. parapsilosis*-szal és *C. albicans*-szal stimulált mononukleáris sejtek citokin termelésében a receptor blokkoló alkalmazása során (noha a Dectin-1 gátlása esetén a *C. parapsilosis*-szal stimulált mintákban valamivel nagyobb mértékben csökkent a TNF α , IL-1 β , IL-6 és IL-10 szintje a *C. albicans*-szal fertőzött sejtekhez viszonyítva), ami arra utal, hogy egyé-

receptorok aktivációja lehet felelős a két faj által indukált citokin termelés különbségéért. A potenciális további receptorok szerepének intenzív vizsgálata a *C. parapsilosis* felismerésében jelenleg folyik laboratóriumunkban.

A MAPK kaskád mind a TLR-ek, mind a CLR-ek által indított jelátvitelben szerepet játszik, az egyes MAP kinázok szerepe a szignalizáció során azonban kevésbé tisztázott. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy mind a három klasszikus MAP kináz (p38, ERK, JNK) gátlása jelentősen csökkentette mind a *C. parapsilosis*-szal, mind a *C. albicans*-szal stimulált mononukleáris sejtek citokin (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN γ) termelését, jelezve, hogy mindhárom enzim szerepet játszik a két *Candida* faj felismerését követő jelátvitelben. Továbbá, míg a p38 és ERK inhibíció a *C. parapsilosis*-szal stimulált minták citokin (TNF α , IL-1 β , IL-6) termelését csökkentette nagyobb mértékben, a JNK gátlása a *C. albicans*-szal stimulált minták citokin szekréciójára volt nagyobb hatással. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az egyes MAP kinázok citokin indukcióban betöltött szerepe különbözik *C. parapsilosis* és *C. albicans* stimuláció esetén.

Összefoglalva tehát megállapíthatjuk, hogy a *C. parapsilosis* szekretált lipázainak és proteinázainak jelentős szerepe van a gazda-patogén interakciók során. Igazoltuk a szekretált mikrobiális hidrolázok jelentőségét a tápanyagforrások biztosításában, a gazdaszervezet sejtjeihez, szöveteihez történő adhézióban. Míg az extracelluláris lipázok esetében kimutattuk, hogy képesek csökkenteni a gyulladásos folyamatokat és szerepet játszanak a biofilmképzésben, addig megállapítottuk, hogy a szekretált proteinázok képesek a szérum antimikrobiális hatását csökkenteni. Mindkét extracelluláris komponens gátolja a dendritikus sejtek és makrofágok fagocita aktivitását, illetve a fago-lizoszóma fúziójának gátlásával azok gombaölő képességét. Különbségeket mutattunk ki a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* ellen kialakuló immunválaszban. Míg a *C. albicans* intenzív pro-inflammatorikus Th1/Th17 irányú T-sejt polarizációt indukál, a *C. parapsilosis* ellen kialakuló immunválasz csökkent IL-1 β termeléssel és Th2/Treg-domináns, tolerogén irányú T-sejt polarizációval jellemezhető. Megállapítottuk továbbá, hogy a *C. parapsilosis* is képes intenzív defenzin termelés indukcióra, amely fontos komponense a gazdaszervezet immunválaszának (4. ábra).

Ugyan számos további vizsgálatra van szükség annak érdekében, hogy részleteiben feltárjuk a *C. parapsilosis* specifikus virulencia faktorokat és gazdaválaszt, eddigi munkánk felhívja a figyelmet a különböző *Candida* fajok megbetegítő képessége mögött húzódó folyamatok hasonlóságaira és alapvető eltéréseire. Eredményeink rávilágítanak a különböző fajok tanulmányozásának fontosságára a *Candida* fertőzések mikrobiológiai és immunológiai hátterének kutatása során.





TUDOMÁNYMETRIAI ADATOK

Teljes tudományos cikk nemzetközi folyóiratban	48
Teljes tudományos cikk hazai idegennyelvű folyóiratban.....	2
Teljes tudományos cikk, rövid közlemény.....	1
Összes hivatkozás	935
Független hivatkozás.....	723
Összesített impakt faktor.....	211,2
Hirsch index	15
Az értekezés alapjául szolgáló közlemények összesített impakt faktora:.....	61,306

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

1. Gácsér A, Salomon S, Schäfer W: Direct transformation of a clinical isolate of *Candida parapsilosis* using a dominant selection marker. FEMS MICROBIOLOGY LETTERS 245:(1) pp. 117-121. (2005) Független idéző: 10 Függő idéző: 9 Összesen: 19
2. Gácsér A, Trofa D, Schäfer W, Nosanchuk J D: Targeted gene deletion in *Candida parapsilosis* demonstrates the role of secreted lipase in virulence. JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION 117:(10) pp. 3049-3058. (2007) Független idéző: 33 Függő idéző: 26 Összesen: 59
3. Gácsér A, Schäfer W, Nosanchuk J S, Salomon S, Nosanchuk J D: Virulence of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in reconstituted human tissue models. FUNGAL GENETICS AND BIOLOGY 44:(12) pp. 1336-1341. (2007) Független idéző: 63 Függő idéző: 9 Összesen: 72
4. Gácsér A, Stehr F, Kröger C, Kredics L, Schäfer W, Nosanchuk JD: Lipase 8 affects the pathogenesis of *Candida albicans*. INFECTION AND IMMUNITY 75:(10) pp. 4710-4718. (2007) Független idéző: 25 Függő idéző: 12 Összesen: 37
5. Trofa D, Soghier L, Long C, Nosanchuk JD, Gacsér A, Goldman DL: A rat model of neonatal candidiasis demonstrates the importance of lipases as virulence factors for *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*. MYCOPATHOLOGIA 172:(3) pp. 169-178. (2011) Független idéző: 8 Függő idéző: 1 Összesen: 9
6. Nagy I, Filkor K, Nemeth T, Hamari Z, Vagvolgyi C, Gacsér A: In vitro interactions of *Candida parapsilosis* wild type and lipase deficient mutants with human monocyte derived dendritic cells. BMC MICROBIOLOGY 11: Paper N°122. (2011) Független idéző: 10 Függő idéző: 4 Összesen: 14
7. Horvath P, Nosanchuk JD, Hamari Z, Vagvolgyi C, Gacsér A: The Identification of Gene Duplication and the Role of Secreted Aspartyl Proteinase 1 in *Candida parapsilosis* Virulence. JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES 205:(6) pp. 923-933. (2012) Független idéző: 12 Függő idéző: 8 Összesen: 20

8. Németh T, Tóth A, Szenzenstein J, Horváth P, Nosanchuk JD, Grózer Z, Tóth R, Papp C, Hamari Z, Vágvolgyi C, Gácsér A: Characterization of Virulence Properties in the *Candida parapsilosis Sensu Lato* Species. PLOS ONE 8:(7) Paper e68704. 10 p. (2013) Független idéző: 13 Fügő idéző: 5 Összesen: 18
9. Toth A, Csonka K, Jacobs C, Vagvolgyi C, Nosanchuk JD, Netea MG, Gacser A: *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* Induce Different T-Cell Responses in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES 208:(4) pp. 690-698. (2013) Független idéző: 5 Fügő idéző: 1 Összesen: 6
10. Gácsér A, Tiszlavicz Z, Németh T, Seprényi G, Mándi Y: Induction of human defensins by intestinal Caco-2 cells after interactions with opportunistic *Candida* species. MICROBES AND INFECTION 16:(1) pp. 80-85. (2014) Független idéző: 2 Összesen: 2
11. Toth R, Toth A, Papp C, Jankovics F, Vagvolgyi C, Alonso MF, Bain JM, Erwig LP, Gacser A: Kinetic studies of *Candida parapsilosis* phagocytosis by macrophages and detection of intracellular survival mechanisms. FRONTIERS IN MICROBIOLOGY 5: Paper 633. 12 p. (2014) Független idéző: 4 Fügő idéző: 1 Összesen: 5
12. Toth A, Nemeth T, Csonka K, Horvath P, Vagvolgyi C, Vizler C, Nosanchuk JD, Gacser A: Secreted *Candida parapsilosis* lipase modulates the immune response of primary human macrophages. VIRULENCE 5:(4) pp. 555-562. (2014) Független idéző: 3 Fügő idéző: 3 Összesen: 6
13. Tóth R, Alonso MF, Bain JM, Vágvolgyi C, Erwig L-P, Gácsér A: Different *Candida parapsilosis* clinical isolates and lipase deficient strain trigger an altered cellular immune response. FRONTIERS IN MICROBIOLOGY 6: Paper 1102. 11 p. (2015)

EGYÉB A DOLGOZAT TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA

1. Martinez L R, Ntiamoah P, Gácsér A, Casadevall A, Nosanchuk J D: Voriconazole inhibits melanization in *Cryptococcus neoformans*. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY* 51:(12) pp. 4396-4400. (2007) Független idéző: 7 Függő idéző: 2 Összesen: 9
2. Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk J D: *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS* 21:(4) pp. 606-625. (2008) Független idéző: 237 Függő idéző: 23 Összesen: 260
3. Tallóczy Z, Martinez J, Joset D, Ray Y, Gácsér A, Toussi S, Mizushima N, Nosanchuk J, Goldstein H, Loike J, Sulzer D, Santambrogio L: Methamphetamine inhibits antigen processing, presentation, and phagocytosis. *PLOS PATHOGENS* 4:(2) Paper e28. (2008) Független idéző: 53 Függő idéző: 9 Összesen: 62
4. Shi L, Albuquerque P C, Lazar-Molnar E, Wang X, Santambrogio L, Gácsér A, Nosanchuk J D: A monoclonal antibody to *Histoplasma capsulatum* alters the intracellular fate of the fungus in murine macrophages. *EUKARYOTIC CELL* 7:(7) pp. 1109-1117. (2008) Független idéző: 11 Függő idéző: 8 Összesen: 19
5. Nosanchuk J D, Gácsér A: *Histoplasma capsulatum* at the host-pathogen interface. *MICROBES AND INFECTION* 10:(9) pp. 973-977. (2008) Független idéző: 13 Összesen: 13
6. Lázár-Molnár E, Gácsér A, Freeman G J, Almo S C, Nathenson S G, Nosanchuk J D: The PD-1/PD-L costimulatory pathway critically affects host resistance to the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA* 105:(7) pp. 2658-2663. (2008) Független idéző: 31 Függő idéző: 7 Összesen: 38
7. Trofa D, Agovino M, Stehr F, Schäfer W, Rykunov D, Fiser A, Hamari Z, Nosanchuk J D, Gácsér A: Acetylsalicylic acid (aspirin) reduces damage to reconstituted human tissues infected with *Candida* species by inhibiting extracellular fungal lipases. *MICROBES AND INFECTION* 11:(14-15) pp. 1131-1139. (2009) Független idéző: 9 Függő idéző: 2 Összesen: 11

8. Nosek J, Holesova Z, Kosa P, Gacser A, Tomaska L: Biology and genetics of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *CURRENT GENETICS* 55:(5) pp. 497-509. (2009) Független idéző: 18 Függő idéző: 1 Összesen: 19
9. Martinez L R, Mihi M R, Gácser A, Santambrogio L, Nosanchuk J D: Methamphetamine enhances histoplasmosis by immunosuppression of the host. *JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES* 200:(1) pp. 131-141. (2009) Független idéző: 23 Függő idéző: 7 Összesen: 30
10. Nguyen LN, Gacser A, Nosanchuk JD: Secreted lipases supply fatty acids for yeast growth in the absence of de novo fatty acid synthesis. *VIRULENCE* 2:(6) pp. 538-541. (2011) Függő idéző: 2 Összesen: 2
11. Nguyen LN, Hamari Z, Kadereit B, Trofa D, Agovino M, Martinez LR, Gacser A, Silver DL, Nosanchuk JD: *Candida parapsilosis* Fat storage-Inducing Transmembrane (FIT) protein 2 Regulates Lipid Droplet Formation and Impacts Virulence. *MICROBES AND INFECTION* 13:(7) pp. 663-672. (2011) Független idéző: 6 Függő idéző: 6 Összesen: 12
12. NamNguyen L, Gacser A, Nosanchuk J D: The stearyl-coenzyme a desaturase 1 is essential for virulence and membrane stress in candida parapsilosis through unsaturated fatty acid production. *INFECTION AND IMMUNITY* 79:(1) pp. 136-145. (2011) Független idéző: 7 Függő idéző: 5 Összesen: 12
13. Valach M, Pryszcz LP, Tomaska L, Gacser A, Gabaldón T, Nosek J: Mitochondrial genome variability within the *Candida parapsilosis* species complex. *MITOCHONDRION* 12:(5) pp. 514-519. (2012) Független idéző: 3 Függő idéző: 2 Összesen: 5
14. Szenzenstein J, Gácser A, Grózer Zs, Farkas Z, Nagy K, Vágvolgyi Cs, Márki-Zay J, Pfeiffer I: Differential sensitivity of the species of *Candida parapsilosis* sensu lato complex against statins. *MYCOPATHOLOGIA* 176:(3-4) pp. 211-217. (2013) Függő idéző: 1 Összesen: 1
15. Pryszcz LP, Németh T, Gácser A, Gabaldón T: Unexpected genomic variability in clinical and environmental strains of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *GENOME BIOLOGY AND EVOLUTION* 5:(12) pp. 2382-2392. (2013) Független idéző: 4 Függő idéző: 1 Összesen: 5

16. Pammi M, Holland L, Butler G, Gacser A, Bliss JM: *Candida parapsilosis* is a significant neonatal pathogen: A systematic review and meta-analysis. *PEDIATRIC INFECTIOUS DISEASE JOURNAL* 32:(5) pp. e206-e216. (2013)
Független idéző: 12 Függő idéző: 7 Összesen: 19
17. Connolly LA, Riccombeni A, Grozer Z, Holland LM, Lynch DB, Andes DR, Gacser A, Butler G: The APSES transcription factor Efg1 is a global regulator that controls morphogenesis and biofilm formation in *Candida parapsilosis*. *MOLECULAR MICROBIOLOGY* 90:(1) pp. 36-53. (2013) Független idéző: 5
Függő idéző: 4 Összesen: 9
18. Singaravelu K, Gácser A, Nosanchuk JD: Genetic determinants of virulence - *Candida parapsilosis*. *REVISTA IBEROAMERICANA DE MICOLOGIA* 31:(1) pp. 16-21. (2014) Független idéző: 1 Összesen: 1
19. Pryszcz LP, Nemeth T, Gacser A, Gabaldon T: Genome comparison of *Candida orthopsilosis* clinical strains reveals the existence of hybrids between two distinct subspecies.. *GENOME BIOLOGY AND EVOLUTION* 6:(5) pp. 1069-1078. (2014)
Független idéző: 4 Függő idéző: 1 Összesen: 5
20. Nemeth T, Toth A, Hamari Z, Falus A, Eder K, Vagvolgyi C, Guimaraes AJ, Nosanchuk JD, Gacser A: Transcriptome profile of the murine macrophage cell response to *Candida parapsilosis*. *FUNGAL GENETICS AND BIOLOGY* 65: pp. 48-56. (2014) Független idéző: 2 Függő idéző: 1 Összesen: 3
21. Nagy LG, Ohm RA, Kovacs GM, Floudas D, Riley R, Gacser A, Sipiczki M, Davis JM, Doty SL, de Hoog GS, Lang BF, Spatafora JW, Martin FM, Grigoriev IV, Hibbett DS: Latent homology and convergent regulatory evolution underlies the repeated emergence of yeasts. *NATURE COMMUNICATIONS* 5: Paper 4471. 8 p. (2014) Független idéző: 5 Függő idéző: 2 Összesen: 7
22. Holland LM, Schroder MS, Turner SA, Taff H, Andes D, Grozer Z, Gacser A, Ames L, Haynes K, Higgins DG, Butler G: Comparative Phenotypic Analysis of the Major Fungal Pathogens *Candida parapsilosis* and *Candida albicans*. *PLOS PATHOGENS* 10:(9) Paper e1004365. 11 p. (2014) Független idéző: 4 Függő idéző: 3 Összesen: 7

23. Pryszcz LP, Nemeth T, Saus E, Ksiezopolska E, Hegedusova E, Nosek J, Wolfe KH, Gacser A, Gabaldon T: The Genomic Aftermath of Hybridization in the Opportunistic Pathogen *Candida metapsilosis*. *PLOS GENETICS* 11:(10) Paper e1005626. 29 p. (2015)
24. Grózer Zs, Tóth A, Tóth R, Kecskeméti A, Vágvolgyi Cs, Nosanchuk JD, Szekeres A, Gácser A: *Candida parapsilosis* produces prostaglandins from exogenous arachidonic acid and OLE2 is not required for their synthesis. *VIRULENCE* 6:(1) pp. 85-92. (2015) Független idéző: 1 Összesen: 1
25. Gácser A: Adhesins in *Candida parapsilosis*: understudied players in virulence. *VIRULENCE* Dec 29:0. [Epub ahead of print] (2016)
26. Estrada-Mata E, Navarro-Arias MJ, Pérez-García LA, Mellado-Mojica E, López MG, Csonka K, Gacser A, Mora-Montes HM.: Members of the *Candida parapsilosis* Complex and *Candida albicans* are Differentially Recognized by Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *FRONTIERS IN MICROBIOLOGY* Jan 13;6:1527. doi: 10.3389/fmicb.2015.01527 (2016)

IRODALOMJEGYZÉK

1. Brown GD, Denning DW, Gow NA, Levitz SM, Netea MG, et al. (2012) Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med* 4: 165rv113.
2. Murray CJ, Ortblad KF, Guinovart C, Lim SS, Wolock TM, et al. (2014) Global, regional, and national incidence and mortality for HIV, tuberculosis, and malaria during 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 384: 1005-1070.
3. Paramythiotou E, Frantzeskaki F, Flevari A, Armaganidis A, Dimopoulos G (2014) Invasive fungal infections in the ICU: how to approach, how to treat. *Molecules* 19: 1085-1119.
4. Brissaud O, Guichoux J, Harambat J, Tandonnet O, Zaoutis T (2012) Invasive fungal disease in PICU: epidemiology and risk factors. *Ann Intensive Care* 2: 6.
5. Low CY, Rotstein C (2011) Emerging fungal infections in immunocompromised patients. *F1000 Med Rep* 3: 14.
6. Pfaller MA, Moet GJ, Messer SA, Jones RN, Castanheira M (2011) *Candida* bloodstream infections: comparison of species distributions and antifungal resistance patterns in community-onset and nosocomial isolates in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2008-2009. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 561-566.
7. Pammi M, Holland L, Butler G, Gacser A, Bliss JM (2013) *Candida parapsilosis* is a significant neonatal pathogen: a systematic review and meta-analysis. *Pediatr Infect Dis J* 32: e206-216.
8. Roemer T, Jiang B, Davison J, Ketela T, Veillette K, et al. (2003) Large-scale essential gene identification in *Candida albicans* and applications to antifungal drug discovery. *Mol Microbiol* 50: 167-181.
9. Reuss O, Vik A, Kolter R, Morschhauser J (2004) The SAT1 flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*. *Gene* 341: 119-127.
10. Horvath P, Nosanchuk JD, Hamari Z, Vagvolgyi C, Gacser A (2012) The identification of gene duplication and the role of secreted aspartyl proteinase 1 in *Candida parapsilosis* virulence. *J Infect Dis* 205: 923-933.
11. Hube B, Stehr F, Bossenz M, Mazur A, Kretschmar M, et al. (2000) Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members. *Arch Microbiol* 174: 362-374.



12. Ghannoum MA (2000) Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 13: 122-143, table of contents.
13. Toth A, Nemeth T, Csonka K, Horvath P, Vagvolgyi C, et al. (2014) Secreted *Candida parapsilosis* lipase modulates the immune response of primary human macrophages. *Virulence* 5: 555-562.
14. Attila Gácsér DT, Wilhelm Schäfer, Joshua D. Nosanchuk (2007) Targeted gene deletion in *Candida parapsilosis* demonstrates the role of secreted lipase in virulence. *The Journal of Clinical Investigation* 117: 3049–3058.
15. Toth R, Toth A, Papp C, Jankovics F, Vagvolgyi C, et al. (2014) Kinetic studies of *Candida parapsilosis* phagocytosis by macrophages and detection of intracellular survival mechanisms. *Front Microbiol* 5: 633.
16. Stehr F, Felk A, Gacsér A, Kretschmar M, Mahnss B, et al. (2004) Expression analysis of the *Candida albicans* lipase gene family during experimental infections and in patient samples. *FEMS Yeast Res* 4: 401-408.
17. Gacsér A, Stehr F, Kroger C, Kredics L, Schafer W, et al. (2007) Lipase 8 affects the pathogenesis of *Candida albicans*. *Infect Immun* 75: 4710-4718.
18. Neugnot V, Moulin G, Dubreucq E, Bigey F (2002) The lipase/acyltransferase from *Candida parapsilosis*: molecular cloning and characterization of purified recombinant enzymes. *Eur J Biochem* 269: 1734-1745.
19. Brunel L, Neugnot V, Landucci L, Boze H, Moulin G, et al. (2004) High-level expression of *Candida parapsilosis* lipase/acyltransferase in *Pichia pastoris*. *J Biotechnol* 111: 41-50.
20. Trofa D, Gacsér A, Nosanchuk JD (2008) *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev* 21: 606-625.
21. Nagy I, Filkor K, Nemeth T, Hamari Z, Vagvolgyi C, et al. (2011) In vitro interactions of *Candida parapsilosis* wild type and lipase deficient mutants with human monocyte derived dendritic cells. *BMC Microbiol* 11: 122.
22. Gacsér A, Trofa D, Schafer W, Nosanchuk JD (2007) Targeted gene deletion in *Candida parapsilosis* demonstrates the role of secreted lipase in virulence. *J Clin Invest* 117: 3049-3058.
23. Trofa D, Soghier L, Long C, Nosanchuk JD, Gacsér A, et al. (2011) A rat model of neonatal candidiasis demonstrates the importance of lipases as virulence factors for *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*. *Mycopathologia* 172: 169-178.

24. Fridkin SK, Kaufman D, Edwards JR, Shetty S, Horan T (2006) Changing incidence of *Candida* bloodstream infections among NICU patients in the United States: 1995-2004. *Pediatrics* 117: 1680-1687.
25. Abelson JA, Moore T, Bruckner D, Deville J, Nielsen K (2005) Frequency of fungemia in hospitalized pediatric inpatients over 11 years at a tertiary care institution. *Pediatrics* 116: 61-67.
26. Hube B, Naglik J (2001) *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology* 147: 1997-2005.
27. Hube B (1998) Possible role of secreted proteinases in *Candida albicans* infections. *Rev Iberoam Micol* 15: 65-68.
28. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B (2003) *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 67: 400-428, table of contents.
29. Dostal J, Dlouha H, Malon P, Pichova I, Hruskova-Heidingsfeldova O (2005) The precursor of secreted aspartic proteinase SapPlp from *Candida parapsilosis* can be activated both autocatalytically and by a membrane-bound processing proteinase. *Biol Chem* 386: 791-799.
30. Hruskova-Heidingsfeldova O, Dostal J, Majer F, Havlikova J, Hradilek M, et al. (2009) Two aspartic proteinases secreted by the pathogenic yeast *Candida parapsilosis* differ in expression pattern and catalytic properties. *Biol Chem* 390: 259-268.
31. Butler G, Rasmussen MD, Lin MF, Santos MA, Sakthikumar S, et al. (2009) Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature* 459: 657-662.
32. Gropp K, Schild L, Schindler S, Hube B, Zipfel PF, et al. (2009) The yeast *Candida albicans* evades human complement attack by secretion of aspartic proteases. *Mol Immunol* 47: 465-475.
33. Netea MG, Brown GD, Kullberg BJ, Gow NA (2008) An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol* 6: 67-78.
34. Fernandez-Arenas E, Bleck CK, Nombela C, Gil C, Griffiths G, et al. (2009) *Candida albicans* actively modulates intracellular membrane trafficking in mouse macrophage phagosomes. *Cell Microbiol* 11: 560-589.

