

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Opportunista humánpatogén gombák virulenciájának és patogenitásának komplex vizsgálata



DR. GÁCSER ATTILA

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Mikrobiológiai Tanszék

SZEGED

2016



TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
2. ELŐSZÓ	8
3. BEVEZETÉS.....	10
4. IRODALMI HÁTTÉR	14
4.1 Gombák okozta fertőzések klinikai jelentősége	14
4.2 Az invazív <i>Candida</i> fertőzések epidemiológiája	15
4.3 Gombafertőzések gyakorisága Magyarországon	18
4.4 A <i>C. parapsilosis</i> fertőzés epidemiológiája	20
4.5 A <i>Candida</i> nemzetség és a <i>C. albicans</i> általános jellemzése.....	21
4.6 A <i>C. parapsilosis</i> általános jellemzése.....	23
4.7 <i>Candida</i> patogenezis	25
4.8 A <i>C. parapsilosis</i> virulencia faktorai.....	28
4.9 A gombák ellen kialakuló immunválasz.....	28
4.9.1 Patogén gombák elleni természetes immunitás.....	29
4.9.1.1 Toll-szerű receptorok	30
4.9.1.2 RIG-I-szerű receptorok.....	31
4.9.1.3 NOD-szerű receptorok	31
4.9.1.4 C-típusú lektin receptorok	32
4.9.1.5 A természetes immunitás effektor sejtjei	34
4.9.2 A gombák ellen kialakuló adaptív immunválasz	37
4.9.2.1 T-sejtes immunválasz.....	37
4.9.3 A <i>C. parapsilosis</i> elleni immunválasz.....	40
5. CÉLKITŰZÉSEK.....	41
6. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	42
6.1 Felhasznált <i>Candida</i> törzsek és humán sejt kultúrák.....	42
6.2 Kísérleti módszerek.....	43
7. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS.....	45
7.1 Genetikai manipuláció <i>C. parapsilosis</i> -ban.....	45
7.2 Lipázok szerepének vizsgálata a <i>C. parapsilosis</i> patomechanizmusában.....	47
7.3 Celluláris interakció <i>C. parapsilosis</i> és gazdasejtek között	64



7.4 Szekretált proteinázok szerepének vizsgálata a <i>C. parapsilosis</i> patomechanizmusában	67
7.5 A <i>Candida parapsilosis sensu lato</i> fajcsoport virulenciájának jellemzése	73
7.6 A <i>C. parapsilosis</i> által kiváltott immunválasz vizsgálata.....	78
7.6.1 A <i>C. parapsilosis</i> immunológiai felismerésében szerepet játszó receptorok azonosítása	86
7.6.2 A <i>C. parapsilosis</i> felismerését követő intracelluláris jeltovábbítás elemeinek vizsgálata	88
8. TOVÁBBI TERVEINK	93
9. A LEGFONTOSABB ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA.....	95
9.1 A <i>C. parapsilosis</i> genetikai manipulációjára alkalmas rendszer kidolgozása	95
9.2 A szekretált lipázok szerepének vizsgálata a <i>C. parapsilosis</i> virulenciájában és a kiváltott betegség patomechanizmusában.....	96
9.3 A <i>C. parapsilosis</i> szekretált aszpartil proteináz 1 (Sapp1) virulenciában betöltött szerepének vizsgálata	99
9.4 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.....	102
9.5 A <i>C. parapsilosis</i> immunológiai felismerésében szerepet játszó receptorok azonosítása.....	102
9.6 A <i>C. parapsilosis</i> felismerését követő intracelluláris jeltovábbítás elemeinek vizsgálata.....	103
10. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK ÉS TUDOMÁNYMETRIAI ADATOK.....	105
10.1 A dolgozatban felhasznált saját publikációk:	106
10.2 A dolgozat témájához kapcsolódó egyéb saját publikációk	108
11. Irodalomjegyzék.....	112

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AIDS	acquired immune deficiency syndrome (szerzett immunhiányos tünetegyüttes)
AP-1	activator protein 1 (aktivátor fehérje 1, transzkripció faktor)
APC	antigen presenting cell (antigén prezentáló sejt)
ASC	apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (inflammaszóma asszociált fehérje)
BCL10	B cell lymphoma 10 (B limfóma/leukémia 10 fehérje)
CARD	caspase-recruitment domain (kaspáz aktiváló/kötő domén)
CCL	CC chemokine ligand (CC kemokin ligand)
CGD	chronic granulomatous disease (krónikus granulomatózus betegség)
CIITA	class II transactivator (2-es osztályú transzaktivátor)
CLR	C-type lectin receptor (C-típusú lektin receptor)
CMC	chronic mucocutaneous candidiasis (krónikus mukokután candidiasis)
COPD	chronic obstructive pulmonary disease (krónikus obstruktív tüdőbetegség)
CR3	complement receptor 3 (komplement receptor 3)
CRD	carbohydrate recognition domain (szénhidrát felismerő domén)
CT	computed tomography (computer tomográfia)
CTLD	C-type lectin domain (C-típusú lektin domén)
CXCL	CXC chemokine ligand (CXC kemokin ligand)
DC-SIGN	dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule3-grabbing non-integrin (dendritikus sejt specifikus intracelluláris adhéziós molekula -3- nem integrint kötő)
DMSO	dimethyl sulfoxide (dimetil-szulfoxid)



ERK	extracellular signal-regulated kinase (extracelluláris szignál regulálta kináz)
FcγR	Fcγ receptor
FITC	fluorescein isothiocyanate (fluoreszcein-izotiocianát)
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (glicerinaldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz)
GATA-3	trans-acting T-cell-specific transcription factor GATA-3 (transzaktiváló T sejt specifikus GATA-3 transzkripció faktor)
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (granulocita-makrofág kolónia stimuláló faktor)
GPI	glycosylphosphatidylinositol (glikozil-foszfatidil-inozitol)
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells (Humán köldökzsínór vénából izolált endotél sejtek)
IFN	interferon
ILC	innate lymphoid cell (természetes limfoid sejt)
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif (immunoreceptor tirozin-alapú aktivációs motívum)
JNK	c-Jun N-terminal kinase (c-Jun N-terminális kináz)
KC	keratinocyte chemoattractant (keratinocita kemoattraktáns)
LDH	lactate dehydrogenase (laktát-dehidrogenáz)
LPS	lipopolysaccharide (lipopoliszacharid)
LRR	leucine-rich repeat (leucin-gazdag ismétlődés)
MALT1	mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1 (mukóza asszociált limfoid szövet limfóma transzlokációs fehérje 1)
MAPK	mitogen-activated protein kinase (mitogén-aktivált protein kináz)
MDA5	melanoma differentiation-associated protein 5 (melanóma differenciálódáshoz kötött fehérje 5)



MHC	major histocompatibility complex (fő hisztokompatibilitási komplex)
MINCLE	macrophage inducible C-type lectin (makrofág indukálható C-típusú lektin)
MKK	mitogen-activated protein kinase kinase (mitogén-aktivált protein kináz kináz)
MR	mannóz receptor
MTL	mating type locus (párosodási típus lókuszt)
MYD88	myeloid differentiation primary response protein 88
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát)
NET	neutrophil extracellular trap (neutrofil extracelluláris csapda)
NF κ B	nuclear factor κ B (nukleáris faktor κ B)
NK	natural killer (cell) (természetes ölő (sejt))
NLR	NOD-like receptor (NOD-szerű receptor)
NLRC4	NLR family CARD domain-containing protein 4 (NLR család CARD domént hordozó fehérje 4)
NLRP3	NLR family pyrin domain-containing protein 3 (NLR család pyrin domént hordozó fehérje 3)
NOD	nucleotide oligomerization domain (nukleotid oligomerizációs domén)
ORF	open reading frame (nyitott leolvasási keret)
PAMP	pathogen associated molecular pattern (patogén-asszociált molekuláris mintázat)
PBMC	peripheral blood mononuclear cell (perifériás vér mononukleáris sejtek)
PBMC-DC	peripheral blood mononuclear cell-derived dendritic cells (perifériás vér mononukleáris sejtekből differenciáltatott dendritikus sejtek)



PBMC-DM	peripheral blood mononuclear cell-derived macrophages (perifériás vér mononukleáris sejtekből differenciáltatott makrofágok)
PD-1/PD-L1	programmed cell death receptor 1, programmed cell death receptor ligand 1 (programozott sejthalál receptor 1, ligand 1)
PKC δ	protein kinase C δ (protein kináz C δ)
PLC γ 2	phospholipase C γ 2 (foszfolipáz C γ 2)
PRR	pattern recognition receptor (mintázatfelismerő receptor)
PYD	pyrin domain
qRT-PCR	quantitative real-time polymerase chain reaction (kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció)
RIG-I	retinoic acid-inducible gene-I
RLR	RIG-I-like receptor (RIG-I-szerű receptor)
ROR γ t	retinoic acid receptor-related orphan receptor γ T
ROS	reactive oxygen species (reaktív oxigéngyökök)
Syk	spleen tyrosine (Y) kinase
T-bet	T-box protein expressed in T cells (T sejteken kifejeződő T-box fehérje)
TGF β	transforming growth factor- β (transzformáló növekedési faktor- β)
Th	T helper (segítő T-sejt)
TIR	Toll/interleukin-1 receptor
TLR	Toll-like receptor (Toll-szerű receptor)
TRAF	tumor necrosis factor receptor-associated factor (tumor nekrosis faktor receptor-asszociált faktor)
Treg	regulátoros T-sejt
TRIF	TIR domain-containing adapter inducing IFN β (TIR domént hordozó IFN β -t indukáló adapter)

2. ELŐSZÓ

Az akadémiai doktori értekezés elkészítése a kutatói pálya egyik fontos állomása. Összefoglalja az eddig elért eredményeket és előrevetíti a jövő feladatait. Természetesen egy ilyen munka egyedül nem kivitelezhető, különösen nem az élettudományok területén, ahol a csapatmunka elengedhetetlen feltétele a sikernek. Nem volt ez másképp az én esetemben sem. Nem véletlen tehát, hogy a dolgozatban végig többes számot használok, hiszen a bemutatott eredmények nem jöhettek volna létre kitűnő kollégáim nélkül. A mikrobiológia iránti érdeklődésem már egyetemi éveim alatt nyilvánvalóvá vált. A Ferenczy Lajos akadémikus vezette tanszék kiváló iskola volt, ahol későbbi szakmai pályafutásomat alapvetően meghatározó kutatókkal dolgozhattam együtt. Kevei Ferenc tanár úrtól nagyon sokat tanultam és a mai napig hálás vagyok azokért az útmutatásokért, amelyeket tőle kaptam fiatal szakdolgozóként és PhD hallgatóként. PhD dolgozatomat a Szegedi Tudományegyetem (akkor József Attila Tudományegyetem) Mikrobiológiai Tanszékén Kucsera Judit szakvezetésével, a hidegtűrő *Cryptococcus hungaricus* faj filogenetikai viszonyainak, illetve bizonyos fiziológiai tulajdonságainak vizsgálata témájában írtam. Judit precizitása, tudomány iránti elkötelezettsége és nem utolsósorban végtelen türelme ma is példaként szolgál számomra. A doktori fokozat megszerzését követően, az EU Marie Curie ösztöndíjasaként a Hamburgi Egyetem, Klein Flottbek biológiai centrumába kerültem, ahol Prof. Wilhelm Schaefer vezetésével az opportunistá patogén gombák genetikai transzformációjának lehetőségeit kutattam. A Schaefer laborban eltöltött 3 év alatt bekapcsolódtam a szekretált lipázok patogenitásában betöltött szerepének vizsgálatát célzó kutatásokba. 2005-ben lehetőségem nyílt a New York-i Albert Einstein Orvosegyetemen Dr. Joshua Nosanchuk laboratóriumában dolgozni, ahol opportunistá patogén gombák (*Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida* fajok) virulenciájának és patomechanizmusainak vizsgálatát kezdtem meg. Az Einstein Egyetemen kitűnő immunológiai kutatások folynak olyan elismert kutatók közreműködésével, mint Matthew D. Scharff, vagy a nemrégiben elhunyt Stanley Nathenson. Így kerültem az immunológia közelébe, Nathenson professzor valamint Steve Almo laboratóriumainak munkatársaival, elsősorban Lázár-Molnár Eszterrel végezhettem nagyon izgalmas vizsgálatokat a PD-1/PD-L1 negatív kostimulációs útvonal szerepéről a *Histoplasma capsulatum* okozta fertőzésekben. A külföldi tapasztalatszerzés ideje alatt lehetőségem nyílt több felsőoktatási és kutatóintézet életébe történő betekintésre, azok működésének megismerésére. Számos

tudományos konferencián és továbbképzésen vehettem részt, amelyek meghatározó szerepet töltek be pályám későbbi alakulásában. 2008 tavaszán az EMBO Installation Grant és az OTKA posztdoktori ösztöndíjának segítségével az SZTE Mikrobiológiai Tanszékére térhettem haza egy olyan környezetbe, amely, túlzás nélkül mondhatom, hogy ideális körülményeket teremtett az új kutatócsoport létrehozásához. A tanszék vezetője Vágvölgyi Csaba professzor, aki az első pillanattól kezdve támogatta a csoport munkáját, hihetetlen munkabírása, élettapasztalata és éleslátása egyrészt példaként szolgált számomra, másrészt sokszor segített a helyes jövőbeni irány kiválasztásában. Segítsége nélkül nem sikerülhetett volna a kutatócsoport személyi és dologi háttérének megszilárdítása az elmúlt években. Kitűnő együttműködéseink vannak a Szegedi Biológiai Központ kutatóival (Dr. Pál Csaba, Dr. Nagy G. László, Dr. Vizler Csaba, Dr. Búzás Krisztina, Dr. Nagy István), illetve az SZTE Orvosi és Fogorvosi Karának kutatóival (Prof. Nagy Katalin, Prof. Mándi Yvette és munkatársaik). Közvetlen munkatársaim kitűnő szakmai felkészültsége nélkül ez a dolgozat nem születhetett volna meg. A labor alapítása óta munkatársam Szenzenstein Judit, akinek türelme és precizitása nélkülözhetetlen a mindennapok szervezésében, a kísérleti munka feltételeinek megteremtésében. Dr. Tóth Adél és Dr. Németh Tibor eredményei fontos részét képezik a dolgozatnak, a kezdetektől segítettek a munkámat és ma is nélkülözhetetlen a közreműködésük. A labor volt és jelenlegi tagjai, Dr. Horváth Péter, Dr. Grózer Zsuzsanna, Tóth Renáta, Csonka Katalin, Tanmoy Chakraborty, Papp Csaba, Zajta Erik, kitűnő munkájukkal segítettek az eredmények elérését, és lehetővé tették ennek a dolgozatnak a létrejöttét. Hálás vagyok nekik, hogy mindig baráti hangulatban tudtunk tudományról beszélni, együtt gondolkodva értelmeztük a kísérleteket. Köszönöm a rengeteg beszélgetéssel eltöltött órát Dr. Hamari Zsuzsának és Dr. Pfeiffer Ilonának, akik barátsága sokat jelent számomra. Köszönöm Dr. Palágyi Andrásné, Ila rengeteg munkáját és segítségét a bürokráciával vívott harcban, és hálás vagyok Neki barátságáért. Köszönöm Dr. Pírity Melinda évtizedes barátságát, támogatását. Köszönöm az SZTE Mikrobiológiai Tanszék minden munkatársának azt, hogy nyugodt, inspiráló légkört hoztak létre, ahol jó dolgozni. Köszönöm Dr. Kocsubé Sándor rendkívül sok és önzetlen segítségét az ábrák elkészítésében. De legfontosabb volt számomra családom, párom és barátaim támogatása, nélkülük nem érhettem volna el idáig, ezért mindig hálás leszek nekik.

3. BEVEZETÉS

Az Egészségügyi Világszervezet jelentése szerint a fertőző betegségek még mindig az egyik leggyakoribb halálokként 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. A számok azonban így is ijesztőek, 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].

Mivel a dolgozatban a gombák megbetegítő képességének vizsgálatával foglalkozom, ezért fontosnak tartom annak kissé talán filozofikus értelmezését, hogy mit is jelent ez a fogalom. A patogenitás, jelentését tekintve, a betegség kialakulása és annak lefolyása. A patogén fogalma az előbbi definíció szerint: egy organizmus, amely betegség kiváltására képes. Ez a meghatározás logikusnak és elegendően egyszerűnek tűnik ahhoz, hogy igaz legyen. A kérdés azonban ennél sokkal bonyolultabb.

Az alapvető probléma, miszerint miért csak egyes mikroorganizmusok képesek megbetegedéseket okozni, illetve hogy miért csak bizonyos gazdáiban virulensek, gyakorlatilag a 19. század óta foglalkoztatja a mikrobiológusokat. Robert Koch és Louis Pasteur óta tudjuk, hogy a betegségek kiváltásában mikroorganizmusok is szerepet játszhatnak, tulajdonképpen a kórokozó teória felállításával nyert értelmet a virulencia és a patogenitás fogalma. Az elmélet alapvetése az, hogy a patogén és nem patogén mikroorganizmusok között valamilyen jelentős különbségnek kell lennie, amely meghatározza a gazdában okozott károsodás mértékét. Ezt a megközelítést támasztja alá az a megfigyelés, miszerint egyes patogén mikroorganizmusok speciális faktorokat igényelnek (pl.: toxinokat, speciális burkot, stb.) ahhoz, hogy állati gazdát tudjanak megbetegíteni. Jóllehet ezt a megközelítést szinte megszületése óta számos kritika érte. A mikrobiológia fejlődésével bebizonyosodott, hogy a virulencia nem egy változatlan tulajdonság. A patogén mikroorganizmusok állati gazdáról *in vitro* körülmények közé kerülése megváltoztat számos olyan tulajdonságot, amelyek a virulenciában is szerepet játszhatnak, igazolva, hogy maga a virulencia nem egy statikus jelleg. A 20. században számos addig kommenzalistának, avirulensnek hitt mikrobáról igazolták, hogy megbetegedéseket

képes kiváltani. A *Candida albicans*, illetve a *Staphylococcus epidermis* mint klinikailag releváns kórokozók esete alátámasztja, hogy a virulencia, mint tulajdonság dinamikus és többek között a gazda immunrendszerének állapotától függ.

Nagyon valószínű, hogy a gazda-mikroba interakciók már azóta léteznek, mióta az élet sejtes formát öltött a Földön. Az ilyen kölcsönhatások egyike lehetett, amikor egy ősi „gazdasejt” és egy „ősbaktérium” interakciójából kialakult a ma ismert eukarióta sejtek őse. A kölcsönhatások eredménye lehet a mikroorganizmus, a gazda, vagy mindkét fél számára előnyös vagy káros. A mutualizmus vagy a kommenzalizmus példa a mindkét résztvevő számára hasznos interakcióra. Amikor egy mikroba a gazdán belül szaporodik, akkor a gazda pusztulása a mikroba további replikációját teheti lehetetlenné, végső esetben akár a mikroorganizmus halálát kiváltva. Ugyan a mikrobiális szaporodás képes a gazda károsodását okozni, akár betegséget kiváltani, ebben a tekintetben a károsodás és a betegség nem esszenciális feltétele a mikrobiális túlélésnek a gazdán belül. Azt gondolnánk, hogy a patogenitás az élő mikroba által okozott gazdakárosodás. Erre cáfol rá a *cysticercosis* vagy borsókakór, amely a sertésgalandféreg, a *Taenia solium* lárvájára adott gyulladásos válasz során kialakuló betegség. A kórkép kialakulása a parazita féreg pusztulásával, a peték kiszabadulásával, illetve a kikelő lárvák agyba kerülésével kezdődik. Egyes klinikai megfigyelések arra utalnak, hogy a féregellenes terápiák megnövelik a *cysticercosis* veszélyét. Ez utóbbi extrém példája lehet mind a mikroorganizmus, mind a gazda számára negatív következménnyel járó kölcsönhatásra. Azok a gazda-mikroba interakciók, ahol a szervezet kontrollálni vagy eliminálni képes a mikrobát, alapul szolgálnak mind a vakcináláson, mind pedig az immunválasz erősítésén nyugvó terápiás módszerek számára.

A gazda válasza is okozhat azonban sejt- vagy szövethárosodást, betegséget vagy akár halált is. Amikor a gazda számára káros hatást figyelhetünk meg, akkor beszélünk mikrobiális fertőzésről, mikroba által okozott megbetegedésről – ebben az értelemben tehát független attól, hogy a károsodást a mikroba, vagy a gazda válasza okozta. A kölcsönhatások elemzését tovább bonyolíthatja a gazda és mikroba közötti megkülönböztetés nehézsége. Bizonyos mikroorganizmusokat egyes amőbák előszeretettel kebeleznek be és azokat, mint tápanyagokat hasznosítják. Így számukra ez a kölcsönhatás hasznos. Más esetekben azonban bizonyos mikroorganizmusok, mint pl. a *Legionella pneumophila* vagy a *Cryptococcus neoformans* akár az őket bekebelező amőba, az *Acanthamoebae castellanii* pusztulását is okozhatják. Itt a gazda (amőba) számára káros hatású kölcsönhatásról beszélhetünk. Ugyanez az amőba ugyanakkor

egy másik kölcsönhatásban lehet mikroorganizmus, ami amőbás keratitiszt válthat ki, így okozva a gazda (ember) károsodását. Annak ellenére, hogy a gazda-mikroorganizmus kapcsolatok esetében a patogenezis a gazdát károsítja, gyakran találkozunk az úgynevezett „mikroorganizmus központú” patogenezis szemlélettel. Ezen elmélet hívei a megbetegítő képességet és a virulenciát elsősorban mikrobiális gének működésével és aktivitásával hozzák összefüggésbe. A teória szerint egyes mikroorganizmusok hordoznak olyan tulajdonságokat, amelyek patogénné teszik őket, míg másokból hiányoznak ezek a jellegek, így azok nem patogének. A mikroorganizmus központú szemlélet intellektuális bázisát a századforduló óta tett úttörő megfigyelésekben kell keresnünk. A virulinek, vagy más néven agresszinek, vagyis a patogének megbetegítő képességét elősegítő tulajdonságok (toxinok, enzimek, tok, stb.) felfedezése, a patogenitással összekapcsolható gének megismerése, a „patogenitás-szigetek” azonosítása mind-mind a mikroorganizmus központú szemléletet erősítették. Olyan mikrobiális faktorok léte, amelyek a virulenciában bizonyítottan szerepet játszanak, mint pl. a poliszacharid tok (*Cryptococcus neoformans*), vagy toxinok (*Bacillus anthracis*), alátámasztották azt, hogy géntermékek meghatározhatják a patogenitást. Nehéz azonban ezzel a szemlélettel magyarázni bizonyos gyakori kórokozók, mint pl. a *C. albicans* vagy a *Staphylococcus aureus* patogenitását, ugyanis a beteg, és a tüneteket nem mutató, de a mikroorganizmust hordozó egyedből izolált mikroba tulajdonságai nem, vagy alig térnek el. Így a fenti szemlélettel nem magyarázható, hogy az egyik miért patogén és a másik miért nem. A gazda központú szemlélet alapja a fentiekkel szemben az, hogy a gazda védekező rendszerének hibája teszi lehetővé bizonyos mikroorganizmusoknak a betegség kialakítását, végső soron tehát a gazda immunállapota határozza meg azok patogenitását. Az elmélet alapja az a tény, hogy a populáció nem minden tagja betegszik meg egy patogén mikroorganizmussal történő találkozás után. További megerősítés az, hogy az immunhiányos állapot elősegíti egyes fertőző betegségek kialakulását, amelyet ún. „gyenge” vagy „kevésbé virulens” kórokozók váltanak ki. A mikrobiális oportunizmushoz hasonlóan, a gazda szemléletű teória hívei a modern orvostudomány vívmányainak következményeivel magyarázzák egyes, korábban ritkán izolált kórokozók előretörését. A magyarázat abban áll, hogy a gyenge, nem megfelelő immunműködésű betegek is életben tarthatóak, azonban ezáltal lehetségessé válik bizonyos kórokozók elszaporodása. Ez a magyarázat azonban nem ad választ arra az esetre, amikor egyes kórokozók „egészséges” immunrendszerű gazdában is képesek megbetegedést kiváltani, mégsem betegszik meg a populáció minden tagja, így az oportunizmus mint

fogalom, ebben a tekintetben is relatív marad. A mikrobiális patogenezis definíciójának problémája talán az e témával foglalkozó két tudományág, a mikrobiológia és az immunológia hagyományosan eltérő megközelítési módjában keresendő. A mikrobiológia elsősorban a mikroorganizmus központú szemlélettel, míg az immunológia a gazda központú szemlélettel kívánja megválaszolni a kérdést. Talán az célravezetőbb lenne, ha a mikroba-gazda kölcsönhatásban résztvevő feleket, mint egységes rendszert vizsgálnánk, azaz egy mikrobiológus-immunológus megközelítés. A rendszerelvű vizsgálat tehát kiküszöbölheti azokat a korlátokat, amelyeket a csak mikrobiológus, illetve a csak immunológus szemlélet magában hordoz. A mikroba központú vizsgálatok alapja a patogén molekuláris manipulációja (mutációk létrehozása), majd ezen változások virulenciára gyakorolt hatásának vizsgálata úgy, hogy közben a kölcsönhatás másik tagja – a gazda – konstans állapotú, sokszor úgy, hogy immunológiailag legyengített vagy beltenyésztett. Az orvos-immunológus szemlélet éppen fordítva, a patogént tartja konstansnak, változatlan tényezőnek, és a gazda immunrendszerének manipulálásával vonja le a következtetéseket, például összehasonlítva egy normál (vad típusú) és egy deficiens (knock-out) egér reakcióját egy patogénre. Kétségtelen, hogy mind a két szemléletmód hozzájárul és hozzájárult a mikrobiális patogének elleni védekezés hatékonyabbá tételéhez, azonban egyenként egyik sem alkalmas a mikrobiális patogenitás szimulálására, ahol a gazda immunrendszere és a mikroba fitnesze egyaránt szerepet játszik a kölcsönhatásban. A kutatásaink során ezzel az összetettebb szemlélettel próbáljuk megérteni a *C. parapsilosis* virulenciáját. Munkánk kezdetén szinte semmilyen információ nem állt rendelkezésre a *C. parapsilosis* virulencia faktorairól, illetve az általa indukált védekezési mechanizmusokról. Mindössze néhány tanulmány foglalkozott a faj klinikai jelentőségével, immunológiai felismerésével, a gazda sejteivel való kölcsönhatásaival, az ellene kialakuló immunválaszt pedig egyáltalán nem vizsgálták. Munkánk kezdetén tehát elsődleges célunk a *C. parapsilosis* által okozott megbetegedések patomechanizmusának, illetve a gomba virulencia faktorainak komplex vizsgálata volt. Ez a munka jelenleg is folyamatban van, a dolgozatban arra vállalkoztam, hogy az elmúlt évek eredményeiből mutassak be néhányat, amelyek fontos szerepet játszanak a jövő kutatási irányvonalának meghatározásában is.

4. IRODALMI HÁTTÉR

4.1 Gombák okozta fertőzések klinikai jelentősége

Ahogyan a bevezetőben említettem, becslések állnak rendelkezésre a gombák okozta megbetegedések számának meghatározására, ezek szerint napjainkban az invazív mikózisok közel 1,3 millió halálesetet okoznak évente [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 egyénben 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 invazív gombás fertőzések több, mint 90 %-át *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus* és *Pneumocystis* fajok okozzák [1]. Az opportunistá mikózisok legnagyobb részéért világszerte a *Candida* fajok felelősek (részletesen ld. „Az invazív *Candida* fertőzések epidemiológiája” c. részt), amelyek a nozokomiális véráramfertőzések negyedik leggyakoribb kiváltó okai [6]. Az invazív infekciókon kívül a *Candida* fajok által okozott nyálkahártya fertőzések is komoly egészségügyi problémát jelentenek, becslések szerint ugyanis az orális candidiasis világszerte 9,5 millió, a *Candida* gombák által okozott hüvelygyulladás pedig évente 75 millió beteget érint [7, 8].

A súlyos gombás fertőzések magas mortalitása részben annak köszönhető, hogy jelenleg nem állnak rendelkezésünkre a pontos diagnózis felállításához szükséges optimális módszerek. A mikroorganizmusok vérből történő tenyésztése általában lassú és problémás, ráadásul az esetek legalább felében nem vezet eredményre. Ugyan egyes esetekben (pl. *Cryptococcus* fertőzések) a vérben jelenlévő gomba-antigének kimutatása célravezető lehet [9], ez a módszer sem mindig alkalmazható sikerrel, illetve számos gombafaj esetében nem áll rendelkezésünkre. Invazív aspergillosis esetén például a galaktomannán antigén kimutatásán alapuló teszt 80 %-os hatékonysággal képes detektálni a fertőzést abban az esetben, ha a beteg nem kapott antifungális szereket; azonban csak 20 %-os hatékonysággal, ha a páciens profilaxisként gombaellenes gyógyszereket szedett [10]. Bár a β -glükán kimutatásán alapuló teszt hatékonynak bizonyult a gombás fertőzések detektálására [11], alacsony specificitása miatt mégsem igazán terjedt

el [5]. Tüdő- vagy májfertőzés esetén gyakori a CT felvétel alapján felállított diagnózis, hátránya azonban, hogy a gombás fertőzés nem mindig azonosítható (a krónikus tüdőaspergillosis például röntgenfelvétel alapján könnyen összetéveszthető a tuberkulózissal). Általánosan elmondható, hogy a leggyakrabban alkalmazott diagnosztikai eljárások (PCR-alapú fajazonosítás, gomba-antigének kimutatása, röntgenfelvétel) nem elég specifikusak és érzékenyek, ráadásul a fejlődő országokban többnyire nem is hozzáférhetőek [1]. Ugyanakkor az invazív gombás fertőzések kezelése még időben felállított, pontos diagnózis esetén sem minden esetben hatékony. A jelenleg elérhető antifungális szerek gyakran súlyos mellékhatásokat okoznak, és egyéb gyógyszerekkel való interakcióik is problémát jelentenek [1]. Annak ellenére, hogy az opportunistá patogén gombák klinikai jelentősége egyre nő, a fertőzések patogenezisét, a gazda-kórokozó kölcsönhatások molekuláris hátterének sok aspektusát még mindig nem ismerjük. A következő fejezetben a *Candida* fajok által okozott fertőzésekről írok részletesebben.

4.2 Az invazív *Candida* fertőzések epidemiológiája

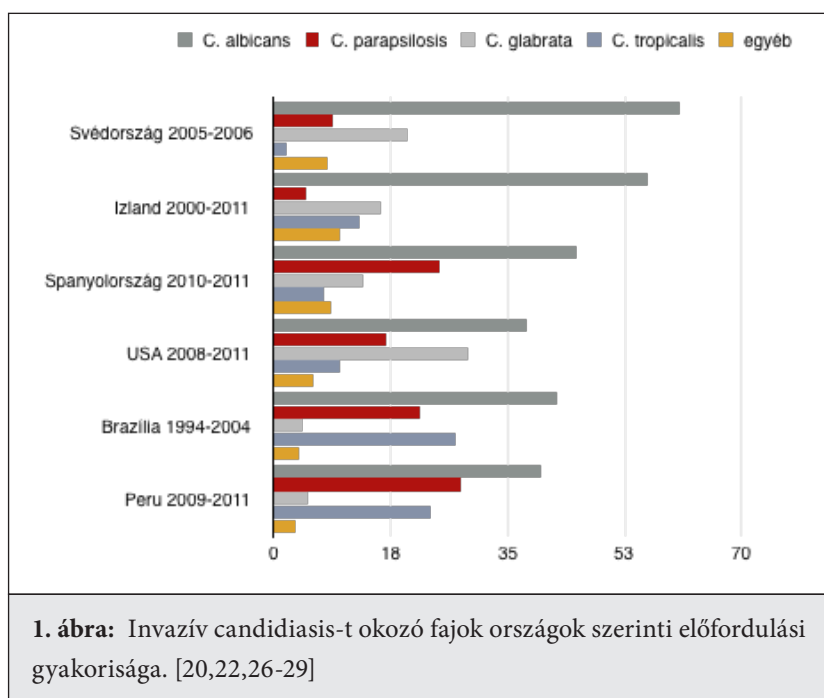
A *Candida* fajok a normál humán flóra tagjaként gyakran megtalálhatóak a szájüregben, a bélrendszerben, és egészséges egyéneknél általában nem okoznak megbetegedést [12, 13]. Az invazív candidiasis kialakulásának esélyét növelő kockázati tényezők két csoportra oszthatók: (1) különböző betegségeket (pl. hematológiai rendellenességek, daganatos megbetegedések, AIDS) vagy beavatkozásokat (pl. őssejt vagy szerv transzplantáció, immunuszuppresszív terápia) kísérő immunhiányos állapotok; (2) olyan invazív beavatkozások (pl. hasüregi műtétek, katéterek használata, parenterális táplálás), amelyek a szervezet fizikai védelmi vonalainak (nyálkahártya barrieriek) sérüléséhez vezetnek [14]. A fertőzést okozó *Candida* gombák származhatnak endogén forrásból (tápcsatorna, nyálkahártya felszínek), de lehetnek exogén eredetűek is (pl. egészségügyi dolgozók bőréről is átjuthatnak a betegre) [15].

Invazív candidiasis-ról akkor beszélünk, ha a kórokozók a véráramba kerülnek (candidemia), illetve ha a fertőzés szétterjed a szervezetben (disszeminált candidiasis), és az egyes szerveket érintő „mély” fertőzés alakul ki [16]. Az invazív candidiasis-nak sokféle klinikai manifesztációja lehet, okozhat endophthalmitis-t (szem belső rétegeinek gyulladása), endocarditis-t (szívbelhártya-gyulladás), osteomyelitis-t (csontgyulladás), peritonitis-t (hashártyagyulladás) és meningitis-t (agyhártyagyulladás) is. Mivel a

legtöbb esetben a vérből mutatják ki a kórokozókat, az invazív candidiasis-t gyakran a candidemia-val azonosítják. Globálisan a candidemia éves előfordulási gyakorisága 2–11/100.000 fő között változik [17], amely becslések szerint mintegy 400.000 új esetet jelent évente [1]. Az invazív candidiasis gyakoriságában régiók szerint is jelentős variancia figyelhető meg. Míg az USA-ban 2012-es adatok szerint 8/100.000 fő az invazív candidiasis előfordulási gyakorisága, Európában általában kevesebb fertőzés fordul elő [14]. Angliában és Walesben 100.000 főből 1,52-re jut egy fertőzés [18], míg Finnországban az invazív candidiasis gyakorisága 2,86/100.000 fő [19], Svédországban pedig 4,2/100.000 fő [20]. Kivételt képez azonban Európán belül Dánia, ahol 2004 és 2009 között 100.000 lakosból évente 8,6 esetben regisztráltak invazív *Candida* fertőzést [21], illetve Spanyolország, ahol a legújabb felmérések szerint 100.000 lakosra 8,1 eset jut [22].

Mivel invazív candidiasis leggyakrabban nozokomiális fertőzésként fordul elő, nagy jelentősége van a kórházban ápoltságban betegek körében előforduló fertőzések gyakoriságát felmérő tanulmányoknak. A nozokomiális véráramfertőzések mintegy 8–10 %-át *Candida* fajok okozzák [23]. Általában elmondható, hogy candidemia 1000 kórházi felvételtől 1 esetben fordul elő, bár a számok régióként erősen változóak lehetnek [14]. Egy a közelmúltban készült tanulmány szerint Spanyolországban 0,92 candidiasis eset jut 1000 betegre [24], míg például Latin-Amerikában ez a szám régiótól függően 0,33 és 1,95 között változik [25]. Az intenzív osztályon kezelt betegek különösen fogékonyak a gombás megbetegedésekre, a nozokomiális *Candida* véráramfertőzések felét ezeknél a betegeknél regisztrálják [23]. Fontos megemlíteni továbbá, hogy az invazív candidiasis gyermekek körében gyakrabban fordul elő mint felnőtteknél, az alacsony születési súlyal rendelkező csecsemők pedig különösen veszélyeztetettek [4].

Noha eddig több, mint 17 *Candida* fajról írták le, hogy képes humán megbetegedést kiváltani, a fertőzések több, mint 90 %-áért öt faj felelős: a *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* és *C. krusei* [6]. Gyakorlatilag minden betegcsoportban a *C. albicans* fordul elő leggyakrabban, átlagosan a invazív candidiasis esetek mintegy 50 %-át okozva [6]. Egy 79 orvosi centrumból származó mintákat feldolgozó globális tanulmány szerint 2008 és 2009 között a *C. albicans* a fertőzések 48,4 %-áért volt felelős, ezt követte a *C. glabrata* (18,2 %) és a *C. parapsilosis* (17,1 %), majd a *C. tropicalis* (10,6 %) és *C. krusei* (2,0 %) [16]. Fontos azonban megjegyezni, hogy a különböző fajok előfordulási gyakorisága geográfiai régiók szerint jelentős varianciát mutat (1. ábra).



A *C. glabrata* gyakrabban fordul elő egyes európai országokban és Észak-Amerikában, míg a *C. parapsilosis* Latin-Amerikában és Dél-Európában (Spanyolország) okoz több megbetegedést [30]. Figyelemre méltó, hogy az utóbbi évek folyamán a *C. albicans* előfordulási gyakorisága a többi fajhoz képest jelentős csökkenést mutat. Míg 1997 és 2000 között a *C. albicans* okozta világszerte az invazív candidiasis esetek 70,9%-át, ez a szám 2009-re 48,4%-ra csökkent [16, 31]. Ezzel párhuzamosan folyamatosan nő a nem-*albicans* fajok előfordulási gyakorisága, amelyet többek között a flukonazol klinikumba való bevezetésével, és a vénás katéterek egyre gyakoribb használatával hoznak összefüggésbe [14].

Nagy variancia figyelhető meg az invazív candidiasis-t okozó fajok előfordulási gyakoriságában különböző korcsoportok szerint is. Míg *C. parapsilosis* fertőzés gyakrabban fordul elő csecsemőknél mint felnőtteknél, a *C. glabrata* az idősebb korosztályt veszélyezteti. A fent említett, 2008 és 2009 között folytatott globális tanulmány szerint a 80-99 év közötti korosztályban az esetek 28,6%-ában *C. glabrata* okozta a candidemia-t, míg a 0-19 évesek körében ez a gombafaj mindössze a fertőzések 2%-áért volt felelős [32]. Ezzel szemben az utóbbi korcsoportban *C. parapsilosis* okozta a megbetegedések 28,5%-át [32]. Egy másik, az ezredfordulón készült globális felmérés hasonló statisztikát mutatott a *Candida* fajok korcsoportok szerinti megoszlását illetően.

Korcsoporttól függetlenül, *C. glabrata* fertőzés gyakrabban alakul ki rosszindulatú daganatos megbetegedésekben szenvedőkben, szervátültetettekben, illetve hosszantartó

antibiotikumos kezelés esetén [6, 14]. Ezzel szemben a *C. parapsilosis* fertőzés veszélyének különösen az intravaszkuláris katétert viselők és a parenterális táplálásban részesülő betegek vannak kitéve [6]. Egy friss, több mint 27.000 hematológiai rendellenességben szenvedő beteg bevonásával készült görög tanulmány szerint ezen betegek körében különösen magas a nem-*albicans* fajok által okozott candidemia előfordulási gyakorisága (az esetek 87,5 %-át nem *C. albicans* okozta), amelyek közül a *C. parapsilosis* volt a leggyakrabban (50 %) izolált faj [33], amelynek oka szinte bizonyosan katéter eredetű fertőzés lehet.

Összességében tehát megállapítható, hogy egyrészt a *Candida* fertőzések előfordulási gyakorisága világszerte növekedést mutat; másrészt, bár a legtöbb megbetegedésért továbbra is a *C. albicans* felelős, folyamatosan nő a nem-*albicans* fajok (különösen a *C. parapsilosis* és *C. glabrata*) okozta fertőzések előfordulási gyakorisága. Ez az epidemiológiai eltolódás egyre inkább ráirányítja a figyelmet a nem-*albicans* fajok által okozott fertőzések patogenezisének tanulmányozására, ami azért is fontos, mert *C. albicans*-hoz viszonyítva ezekről a patogénekről jelentősen kevesebb ismeretünk van.

4.3 Gombafertőzések gyakorisága Magyarországon

Hazánkban eddig nem készült átfogó tanulmány, amely a gombafertőzések országos előfordulási gyakoriságával foglalkozik. Kétségtelen azonban, hogy mind az enyhébb felületi fertőzések, mind a súlyos, szisztémás mikózisok jelentős egészségügyi problémát jelentenek Magyarországon is. Egy a közelmúltban készült közlemény szerint, amely a nemzetközi adatokat és a magyar populáció jellegzetességeit figyelembe vevő becslésekre támaszkodik, a különböző gombás megbetegedések (beleértve a felületi bőr- és nyálkahártya-fertőzéseket is) több, mint 1 millió beteget érinthetnek hazánkban évente [34]. A szerzők figyelmeztetnek, hogy minden évben legalább húszezer krónikus obstruktív tüdőbetegségben (COPD) szenvedő beteg van kitéve az invazív tüdőaspergillosis, és több, mint tízezer az allergiás bronchopulmonáris aspergillosis veszélyének. Ami a gombapatogének által kiváltott életveszélyes véráramfertőzéseket illeti, Sinkó és mtsi. becslései szerint az intenzív osztályon kezelt betegek körében évente több száz esettel kell számolnunk [34]. Mivel a szisztémás gombafertőzések gyakran nehezen kezelhetők és igen magas mortalitással járnak (ami megközelítheti a 70 %-ot is [4]), ezek a megbetegedések súlyos aggodalomra adnak okot.

A *Candida* fajok által okozott fertőzések hazai gyakoriságáról, többek között egy 2012-ben készült tanulmány szerint kaphatunk információkat: az 1996–2009 közötti periódusban a szegedi klinikán 10000 kórházban töltött napra vetítve átlagosan 0,41 volt a candidemia epizódok száma, a legtöbb fertőzés az intenzív osztályon kezelt betegek és az újszülöttek körében fordult elő [35]. A szerzők ugyanakkor megjegyzik, hogy a fertőzések előfordulási gyakoriságában növekedést figyeltek meg a 2005 előtti és utáni periódus összehasonlítása során [35]. Egy másik tanulmány arról számol be, hogy egy budapesti klinikán 2010 és 2014 között 10000 kórházi felvételre vetítve 1,7 és 3,5 között változott a candidemia epizódok száma [36].

Dóczi és mtsi. tanulmánya szerint Magyarországon a szegedi klinikán 1996 és 2009 között a candidemia epizódok 63,7 %-át okozta *C. albicans*, 11,5 %-át *C. parapsilosis*, szintén 11,5 %-át *C. glabrata*, ezeket követte a *C. tropicalis* (4,9 %), majd a *C. krusei* (3 %) [35]. Érdekes, hogy a *C. parapsilosis* előfordulási gyakoriságában növekedést figyeltek meg a 2005 előtti és utáni periódust összehasonlítva, ami tükrözi a globális trendeket [35]. A budapesti klinikán hasonló fajmegoszlási adatokról számoltak be: *C. albicans* volt felelős a fertőzések 63 %-áért, míg a *C. glabrata* és a *C. parapsilosis* az esetek 13 és 10,2, a *C. tropicalis* és *C. krusei* pedig a fertőzések 9,3, illetve 3,7 %-át okozta [36]. Az invazív *Candida* fertőzések különösen súlyos problémát jelentenek az alacsony születési súlyú csecsemők esetében. Egy 2010-es tanulmány szerint, amelyben a *Candida* fertőzések előfordulását vizsgálták egy budapesti újszülött intenzív osztályon, átlagosan a megbetegedések 73 %-át okozta *C. albicans*, míg 24 %-át *C. parapsilosis*, 3 %-át pedig *C. glabrata* [37]. Figyelemre méltó azonban, hogy míg az 1500 g feletti születési súlyú csecsemők esetében *C. albicans* okozta a fertőzések 94 %-át, a nagyon alacsony (1000–1500 g) súllyal születettekben ez az arány 66,6 %-ra csökkent, míg a fennmaradó 33,3 %-ért a *C. parapsilosis* volt felelős. Az extrém alacsony súllyal (<1000 g) született gyermekek esetében pedig a *C. parapsilosis* előfordulási gyakorisága (41,1 %) megközelítette a *C. albicans*-ét (52,9 %) [36].

Összességében elmondhatjuk, hogy a *Candida* fertőzések gyakoriságát tekintve a hazai adatok tükrözik a nemzetközi trendeket, bár átfogó tanulmányok hiányában nehéz az epidemiológiai adatok pontos összehasonlítása. Mindenképpen szükség lenne a gombás fertőzések gyakoriságát monitorozó átfogó programok bevezetésére, hogy képet kaphassunk a tényleges helyzetről. Bizonyos azonban, hogy ezek a megbetegedések súlyos kihívást jelentenek a klinikusok számára, és nagy szükség lenne a hatékonyabb gombaellenes terápiák kidolgozására.

4.4 A *C. parapsilosis* fertőzés epidemiológiája

Ahogyan az előzőekben említettem, a *C. parapsilosis* klinikai jelentősége nagymértékben megnőtt az elmúlt évek folyamán. Míg felmérések szerint 1997 és 2000 között világszerte az invazív candidiasis esetek 4,8 %-át okozta, ez a szám 2009-re 17,1 %-ra nőtt [16, 31]. A *C. albicans*-szal ellentétben a *C. parapsilosis* gyakran izolálható a környezetből, és könnyen terjed horizontálisan (pl. a kórházi ápolók kezéről a betegekre), ami növeli a nosokomiális fertőzések kockázatát. Veszélyt jelent továbbá, hogy jó biofilm képző képességgel bír különböző implantátumokon, katétereken, illetve egyéb orvosi eszközökön [6]. Figyelemre méltó, hogy a *C. parapsilosis* fertőzés igen gyakori újszülöttek körében, különösen az alacsony súllyal világra jött csecsemők esetében. Egy a közelmúltban közreműködésünkkel készült, 36 tanulmány adatait összesítő elemzés szerint a *C. parapsilosis* az újszülöttkori candidiasis esetek 33,47 %-áért felelős [38]. Egyre több közlemény számol be azonban a *C. parapsilosis* fertőzés még magasabb előfordulási gyakoriságáról, amely egyes esetekben a *C. albicans* okozta infekciók előfordulási gyakoriságát is meghaladja. Egy 2009 és 2010 között, 30 kórház bevonásával folytatott tanulmány szerint a 16 év alatti korcsoportban a *C. parapsilosis* okozta az invazív gombás fertőzések 46,8 %-át, míg a *C. albicans* a fertőzések 36,5 %-áért volt felelős [39]. Amint az fentebb már említésre került, a *C. parapsilosis* előfordulási gyakorisága geográfiai régiók szerint jelentős eltéréseket mutat. Míg a legtöbb európai országban (pl. Németország, Dánia, Egyesült Királyság) és Észak-Amerikában ritkábban fordul elő, Spanyolországban és Olaszországban a második leggyakrabban izolált candidemia-t okozó patogén a *C. albicans* után [14]. Igen magas továbbá az előfordulási gyakorisága Latin-Amerikában, ahol egyes területeken prevalenciája a *C. albicans*-ét is meghaladhatja [25, 40].

A *C. parapsilosis* fertőzéshez általában alacsonyabb mortalitás társul, mint a *C. albicans* okozta invazív candidiasis-hoz. Felnőttek körében az invazív *C. parapsilosis* fertőzés mortalitása átlagosan 25–30 % közé tehető, míg a *C. albicans* candidemia 40–50 %-os halálozási aránnyal jár [40, 41]. Érdekes módon gyermekek körében a mortalitás általában alacsonyabb: egy az USA-ban készült felmérés szerint a 13 év alattiakban a *C. albicans* fertőzés mortalitása átlagosan 29 %-nak adódott, szemben a 13 évnél idősebbek körében tapasztalt 47 %-os halálozási aránnyal, míg a *C. parapsilosis* candidemia mortalitása ezekben a korcsoportokban rendre 15, illetve 24 % volt [41]. Meg kell azonban jegyezni, hogy ezek a számok nagyban függenek a páciensek alapbetegségétől, illetve egyéb hajlamosító tényezőktől (pl. műtétek, immunszuppresszív terápia) jelenlététől is.

4.5 A *Candida* nemzetség és a *C. albicans* általános jellemzése

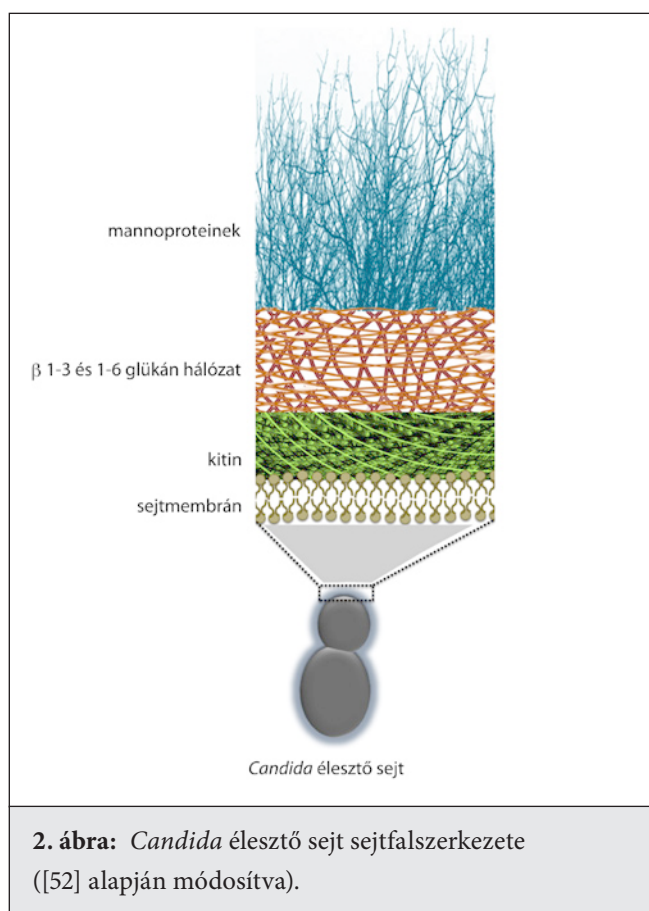
Az aszkuszos gombák (Ascomycota) törzsébe tartozó *Candida* nemzetség több, mint 200 fajt foglal magában. A csoport tagjai sarjadzással szaporodó élesztőgombák, amelyek között haploid és diploid genommal rendelkező organizmusokat egyaránt találunk. A nemzetségen belül számos patogén faj, többek között a *C. albicans* és a *C. parapsilosis* is az ún. „CTG klád”-ba tartozik, amelynek tagjaira jellemző, hogy esetükben a CUG kodon rendhagyó módon szerint kódol leucin helyett [42]. A *C. albicans*-t általában a nemzetség prototipikus tagjának tekintik, és jelenleg is ez a legintenzívebben vizsgált *Candida* faj. Az SC5314 jelű típus törzs genomja 14,3 Mb méretű, és mintegy 6107 gént tartalmaz [43].

A *Candida* sejtek morfológiájára a kerek vagy enyhén megnyúlt forma jellemző, méretük átlagosan 2–7 µm között változik. Agar lemezen nevelve a sejtek sima vagy gyűrött felszínű, többnyire fehér, esetleg krémszínű telepeket képeznek. A nemzetségben sok morfológiai váltásra képes faj található, amelyek bizonyos környezeti körülmények (pl. tápanyag- vagy oxigénellátottság) megváltozása esetén sejtalakjukat tekintve változáson mennek keresztül, és micéliumot vagy pszeudomicéliumot hoznak létre. Az élesztőszerű és fonalas növekedés közötti váltás képessége a *C. albicans* esetében igen fontos virulencia faktor [44]. A *Candida* fajok számos extracelluláris enzimet termelnek, amelyek közül többnek (pl. *C. rugosa* lipáz) biotechnológiai jelentősége van [45]. Ugyanakkor a különböző hidrolitikus enzimek termelésének képessége fontos virulencia faktor lehet; *C. albicans* esetén például jól ismert a lipázok és proteínázok patogenitásban betöltött szerepe [46, 47]. Az ilyen jellegű virulencia faktorokat a későbbiekben részletesen tárgyalom.

A *Candida* fajokra szaporodásukat tekintve jelentős diverzitás jellemző. A diploid fajok közül a *C. albicans* nem képes ivaros szaporodásra, csak paraszexuális ciklussal rendelkezik, amelynek során a diploid sejtek egyesülését követően meiózis helyett mitózis és kromoszóma-vesztés figyelhető meg [48]. Ezzel szemben a szintén diploid *Lodderomyces elongisporus* ivaros szaporodásra képes, homotallikus organizmus, míg a *C. parapsilosis* és *C. tropicalis* egyáltalán nem rendelkezik szexuális ciklussal [43]. A haploid fajok között homo- és heterotallikus szervezeteket egyaránt találunk [43].

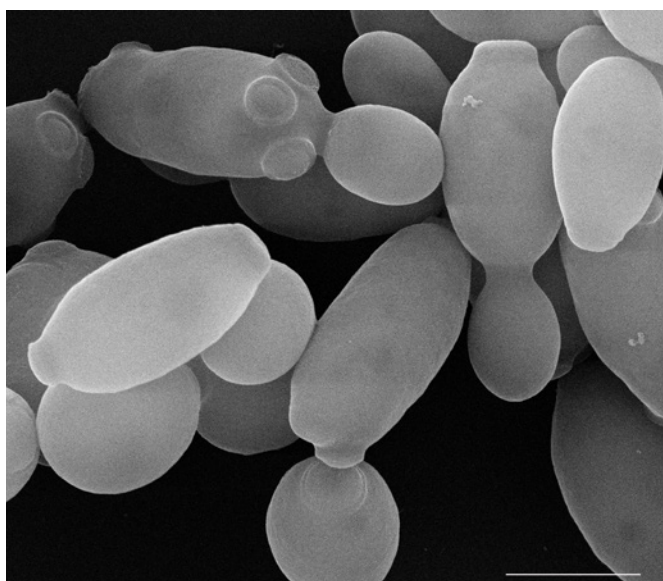
A *Candida* sejteket vastag, poliszacharidokból álló sejtfal veszi körül. A sejtfal szerkezetéről a *C. albicans* esetében van a legtöbb ismeretünk, de alapvetően a többi faj is

hasznos felépítésű sejtfallal rendelkezik. A sejtfall két, elektronmikroszkóposan is jól elkülönülő rétegre osztható: belül egy vékonyabb, kitint és β -glükánt tartalmazó réteg található, míg kívül egy mannoproteinekből álló réteg helyezkedik el [49]. A β -glükán réteg a sejtfall száraz tömegének mintegy 60 %-át alkotja, β -1,3- és β -1,6-glükánból áll, amelyek egymáshoz és a kitinhez kovalens kötésekkel kapcsolódnak [50]. A belső réteget kívülről teljesen befedi a mannoprotein rétege, így az csak az élesztők osztódása során kialakuló sarjhegeknél válik hozzáférhetővé [51]. A kívül található mannoprotein réteg (vagy egyszerűen mannán) erőteljesen glikozilált fehérjéket tartalmaz. A sejtfall fehérjék glikozil-foszfatidil-inozitol (GPI) egységekkel kapcsolódnak a β -1,3-glükánhoz vagy kitinhez [49]. A fehérjék lehetnek O-mannoziláltak, ebben az esetben a mannóz egységek szerinhez vagy treoninhoz kapcsolódnak, vagy N-mannoziláltak, ekkor aszparaginhoz kapcsolódnak a cukor egységek [49]. Míg az O-mannán egységek általában rövidek (maximum 5, α -1,2-kötéssel kapcsolódó mannóz egységből állnak), az N-mannán komplex szerveződésű, és α -1,2-, α -1,3-, és α -1,6-mannózt egyaránt tartalmaz (2. ábra) [49]. A *C. albicans* sejtfallában kis mennyiségben lipidek is előfordulnak. Immunológiai szempontból jelentős például a foszfolipomannán, amelyet β -1,2-mannóz egységekhez kapcsolódó foszfoinozitol-ceramid alkot [50]. Miután a gomba sejtfalla a gazda-patogén kölcsönhatások során kitüntetett szerepet játszik, ezért egyik kiemelt kutatási területünk a *C. parapsilosis* sejtfallfelépítésének vizsgálata. Prof. Hector Mora Montes (Mexikó) csoportjával együttműködve vizsgáljuk azokat a géneket, amelyek a különböző sejtfallkomponensek létrehozásában vesznek részt. Az előállított mutánsok immunológiai felismerését és a gazda-patogén kölcsönhatások során mutatott jellemzőit jelenleg is intenzíven kutatjuk.



4.6 A *C. parapsilosis* általános jellemzése

A *C. parapsilosis*-t (3. ábra) elsőként Ashford izolálta 1928-ban, és *Monilia parapsilosis*-ként írta le, majd az organizmust 1932-ben nevezték át *C. parapsilosis*-nak [53]. Később megállapították, hogy a *C. parapsilosis*-ként azonosított törzsek jelentős genetikai heterogenitást mutatnak, és három csoportra oszthatóak, amelyek közül klinikai mintákban leggyakrabban az I. csoport tagjai fordulnak elő [54]. További molekuláris vizsgálatok a három csoport három külön fajként történő definiálásához vezettek, így 2005 óta *C. parapsilosis sensu stricto*-ról (vagy egyszerűen *C. parapsilosis*-ról, korábban I. csoport), *C. orthopsilosis*-ről (II. cs.) és *C. metapsilosis*-ről (III. cs.) beszélünk [55]. A három faj virulenciájában jelentős különbségek figyelhetők meg: míg a *C. parapsilosis* okozza a klinikai esetek túlnyomó többségét, a *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* mindössze 1–10 %-ban izolálható [56].



3. ábra: *Candida parapsilosis* sejt scanning elektronmikroszkópos képe (30.000 × nagyítás, a méretskála 2µm-t jelöl) A felvételt Papp Csaba (PhD hallgató, SZTE Mikrobiológiai Tanszék) és Susanna Frases (Rio de Janeiro-i Egyetem, Brazília) készítette.

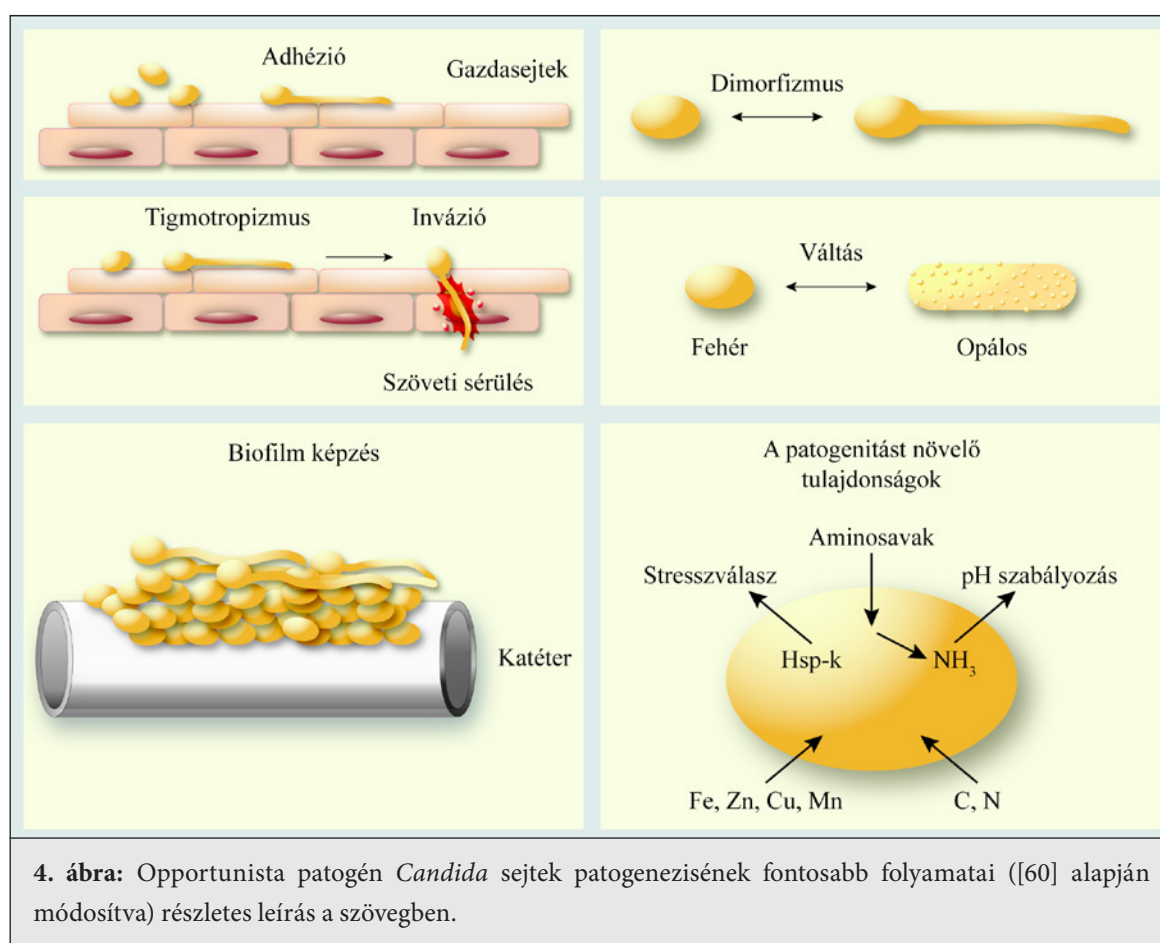
A *C. parapsilosis* a normál humán mikrobiális flóra tagját képezi, a kéz bőrén különösen gyakran megtalálható [6]. Gyakran előfordul azonban a környezetben is, izolálható például talajból vagy tengervízből is [53]. A *C. albicans*-szal ellentétben a *C. parapsilosis* valódi micéliumok képzésére nem képes, bizonyos körülmények között azonban pszeudohifákat, megnyúlt élesztősejtekből álló hifaszerű képleteket hozhat létre [53]. A *C. parapsilosis* egyik fontos biológiai tulajdonsága, hogy könnyen képez biofilmet magas glükóz, illetve lipid tartalmú médiumban, aminek különös jelentősége van parenterális táplálásban részesülő betegek esetén [53]. Az intenzív biofilm képzés ezen kívül katétereken, protéziseken és egyéb orvosi eszközökön is megfigyelhető [40].

A *C. parapsilosis* számos más patogén *Candida* fajjal együtt a fentebb már említett CTG kládba tartozik. Noha a szexuális ciklushoz köthető elemek megtalálhatók a genomjában, ivaros szaporodásra nem képes, ugyanis az idáig vizsgált összes izolátum ugyanarra a párosodási típusra jellemző (*MTLa*) allélt hordozza az *MTL* lókuszbán [57]. A CDC317 jelű *C. parapsilosis* izolátum teljes genom szekvenciája 2009 óta elérhető [43]. A haploid genom mérete 13,1 Mb, és mintegy 5700 ORF-et (open reading frame, nyitott leolvasási keret) tartalmaz [43]. Az azóta eltelt időben további izolátumok teljes genomszekvenciáját is meghatározta kutatócsoportunk számos érdekes megállapítás téve, amelyet terjedelmi korlátok miatt részletesen a dolgozatban nem tárgyalok [58].

Fontos kiemelni, hogy bár a *C. parapsilosis* filogenetikailag közel áll a *C. albicans*-hoz, a két faj között igen jelentős különbségeket találni. Egy 2005-ben készült összehasonlító elemzés szerint a CLIB214 *C. parapsilosis* törzs fehérje szekvenciái átlagosan 59 %-os homológiát mutatnak a *C. albicans*-specifikus megfelelőjükkel, ám a *C. parapsilosis* genom több olyan gént is tartalmaz, amelynek a homológja *C. albicans*-ban nem található meg [59]. Számos olyan *C. albicans*-specifikus szekvencia is létezik azonban, amely a *C. parapsilosis* genomjából hiányzik [53]. Többek között ezek az adatok is rávilágítanak arra, hogy ugyan a *C. albicans*-szal folytatott kutatások eredményei fontos iránymutatók lehetnek, nem minden esetben vonatkoztathatók a *C. parapsilosis*-ra is.

4.7 *Candida* patogenezis

A *Candida* nemzetség által kiváltott gombafertőzés és a patogenezis folyamatait a 4. ábra foglalja össze [60]. Az ábrán az opportunist gombafertőzések egy általános folyamata látható. A fertőzés előfeltétele a gazda szövetein történő megtapadás (adhézió). Ezt követi az invázió (gyakran szöveti sérülés mentén). Bizonyos gombafajok képesek különböző felületeken összetapadva egybefüggő rétegek, azaz biofilmek képzésére (ilyen biofilmek képződhetnek egyes orvosi eszközök, pl. katéterek felszínén). A biofilmet alkotó mikrobák ellenállóbbak lehetnek az antimikrobiális kezelésekkel szemben. A morfológiai plaszticitás (hifa-élesztő átmenet, vagy a „white” vagy fehér fenotípus és az „opaque” vagy opálos fenotípus közötti váltás) szintén a fertőzési folyamat része lehet. A gombasejt számos fiziológiai folyamata hozzájárulhat a patogenitáshoz, így pl. a mikroelemek felvétele (Zn, Fe stb., részletesen lásd később), a különböző pH viszonyokhoz történő alkalmazkodás, oxidatív és egyéb stressz körülményekre adott válasz, stb. [60].



A *C. albicans* esetében több növekedési forma is előfordul [62]. A morfológiai változásokat több környezeti tényező is befolyásolhatja. Az alacsony pH az élesztő, míg a magas pH a hifaszerű növekedési forma megjelenését segíti elő. Emellett fonalas növekedést eredményez szérum vagy N-acetilglükózamin jelenléte, illetve a fiziológiás hőmérséklet és CO_2 szint. A quorum sensing során termelődő molekulák (fernesor, tyrosol és dodecanol), illetve a mikrobák közti kommunikáció egyaránt szabályozó funkciót látnak el a morfogenezisben. A magas sejt denzitás élesztő-, míg az alacsony denzitás hifaszerű növekedést indukál. A dimorfizmus fontos szerepet tölt be a gomba patogenitásban. Az élesztő forma főleg az elterjedés, míg a fonalas forma a gazdaszervezetbe való behatolás szempontjából fontos. A hifa képzésére képtelen mutánsok rendszerint csökkent virulenciát mutatnak. Érdekes felfedezés volt, hogy a fonalas növekedés nem csupán egy morfológiai jellegzetesség, hanem sokkal inkább egy az élesztőétől eltérő sejtprogram beindítását jelenti, ennek bizonyítéka olyan gének expressziójának emelkedése, melyek közvetlenül nem vesznek részt a hifaképzésben. Ilyenek a Hwp1, Als3, Sap proteázok, Ece1 és Hyr1. A *Candida* sejtek különböző biotikus, illetve abiotikus

felszínekhez történő megtapadását speciális proteinek (adhezinek) biztosítják. Jelentős adhezinek alkotják a nyolc tagból álló ALS proteincsaládot. Az ALS gének GPI kapcsolt sejtfelszíni glycoproteineket kódolnak. A hifa asszociált Als3 különösen fontos szerepet tölt be az adhézióban. Ezekről a fontos fehérjéről 2016 elején jelent meg egy rövid összefoglaló tanulmányunk[63]. Fontos adhezin továbbá a Hwp1, mely az emlős sejtek transzglutaminázának szubsztrátja, így a kötődés kovalens kapcsolatot eredményez a hifa és a gazdasejt közt. A Hwp1 deléciós mutáns csökkent adhéziós képességet mutat szájüregi epitheliális sejtekhez, valamint *in vivo* modellben mérsékelt virulencia jellemzi. További, a morfológia kialakulásától független fehérjék is kapcsolatba hozhatók az adhézióval (Eap1, Mp65, Phr1, Sap9 és 10). A patogén *Candida* gombasejtek gazdasejtekbe való bejutását két alapvető folyamat biztosítja: az indukált endocitózis, valamint a sejtekbe történő aktív behatolás.

Az invazinok a gombasejt által expresszált sejtfelszíni fehérjék, melyek előidéznek a patogén kötődését a gazda ligandjához (E-cadherin, N-cadherin), és passzív módon endocitózist indukálnak. Eddig azonosított invazinok az adhezinként is funkcionáló Als3, valamint az Ssa1 (Hsp70- hősokk protein). Mind az Als3 mind az Ssa1 a gazda E-cadherinjéhez kötődve indukál clatrin-dependens endocitózist. Az aktív behatolás molekuláris mechanizmusa még feltérképezetlen, de az élő hifa jelenléte mindenképpen szükséges a folyamat lezajlásához. A legújabb kutatások alapján ennek a folyamatnak a háttérében az első *Candida* sejtekben azonosított ún. „Candidalizin” nevű pórusképző toxin állhat. A még nem közölt tanulmány alapján a hifa-specifikus *ECE1* gén terméke képes a humán epitél sejtek direkt roncsolására azáltal, hogy a membránba ágyazódva pórusokat képez és ezzel elpusztítja azokat (Bernhard Hube és Julian Naglik személyes közlés). A biotikus és abiotikus felszíneken képződött biofilm szintén fontos virulencia faktor. Képződésének első lépése az élesztősejt kötődése a szubsztráthoz, majd osztódás és a felső rétegekben a fonalas növekedési forma megjelenése. A morfológiai változások után extracelluláris mátrix halmozódik fel, majd a komplexből élesztősejtek szabadulhatnak ki, elősegítve ezzel a patogén terjedését. A biofilm komplex felépítése, valamint a drog efflux pumpák megnövekedett expressziója és a metabolikus plaszticitás biztosítja az antimikotikumokkal szembeni megnövekedett rezisztenciát. Könnyű belátni, hogy a fagocitált *Candida* sejtek számára a tápanyagok korlátozott mennyiségben érhetőek el, továbbá hatást gyakorolnak a bekebelezett sejtekre a fagociták által termelt reaktív oxigén gyökök. A gazdasejtben a gomba glikolízisról glükoneogenezisre vált, és lipideket valamint aminosavakat használ tápanyagforrásként. Alacsony glükóz

tartalmú szövetekben szintén alternatív metabolikus útvonalak aktiválódnak. Az alternatív szénforrások használata növeli a gomba stressz rezisztenciáját és növeli a virulenciát. Az immunrendszer fagocita sejtjei oxidatív és nitroztatív stresszorként hatnak a gombasejtekre. A stresszválasszal kapcsolatos gének deléciója a virulencia csökkenését eredményezi. A hősokk proteinek olyan chaperonok, melyek a fehérjék helyes térmorfológiájának fenntartásában játszanak szerepet.

4.8 A *C. parapsilosis* virulencia faktorai

Mielőtt lehetségessé vált a *C. parapsilosis* genetikai módosítása, meglehetősen kevés információ állt rendelkezésünkre a gomba virulencia faktorairól. A 2005 előtti, *C. parapsilosis*-szal foglalkozó tudományos munkák között túlnyomórészt epidemiológiai tanulmányokat találunk, amelyek a gomba által okozott fertőzések előfordulási gyakoriságát, a fertőzésre hajlamosító rizikófaktorokat, illetve a gomba antifungális rezisztenciáját vizsgálják [64, 65]. Szemben a ma elérhető egyre gazdagabb irodalommal, az ezredforduló előtt elenyésző számú tanulmány készült, amely behatóbban foglalkozott a *C. parapsilosis* patogenitásért felelős faktoraival. Ezen munkák túlnyomórészt leíró jellegűek, és a gomba adhéziós képességét [66–68] vagy extracelluláris enzimtermelését jellemzik [68–70]. Egyik fő motiváció munkánk kezdetén tehát az volt, hogy megteremtsük a *C. parapsilosis* specifikus virulencia faktorok vizsgálatának lehetőségét.

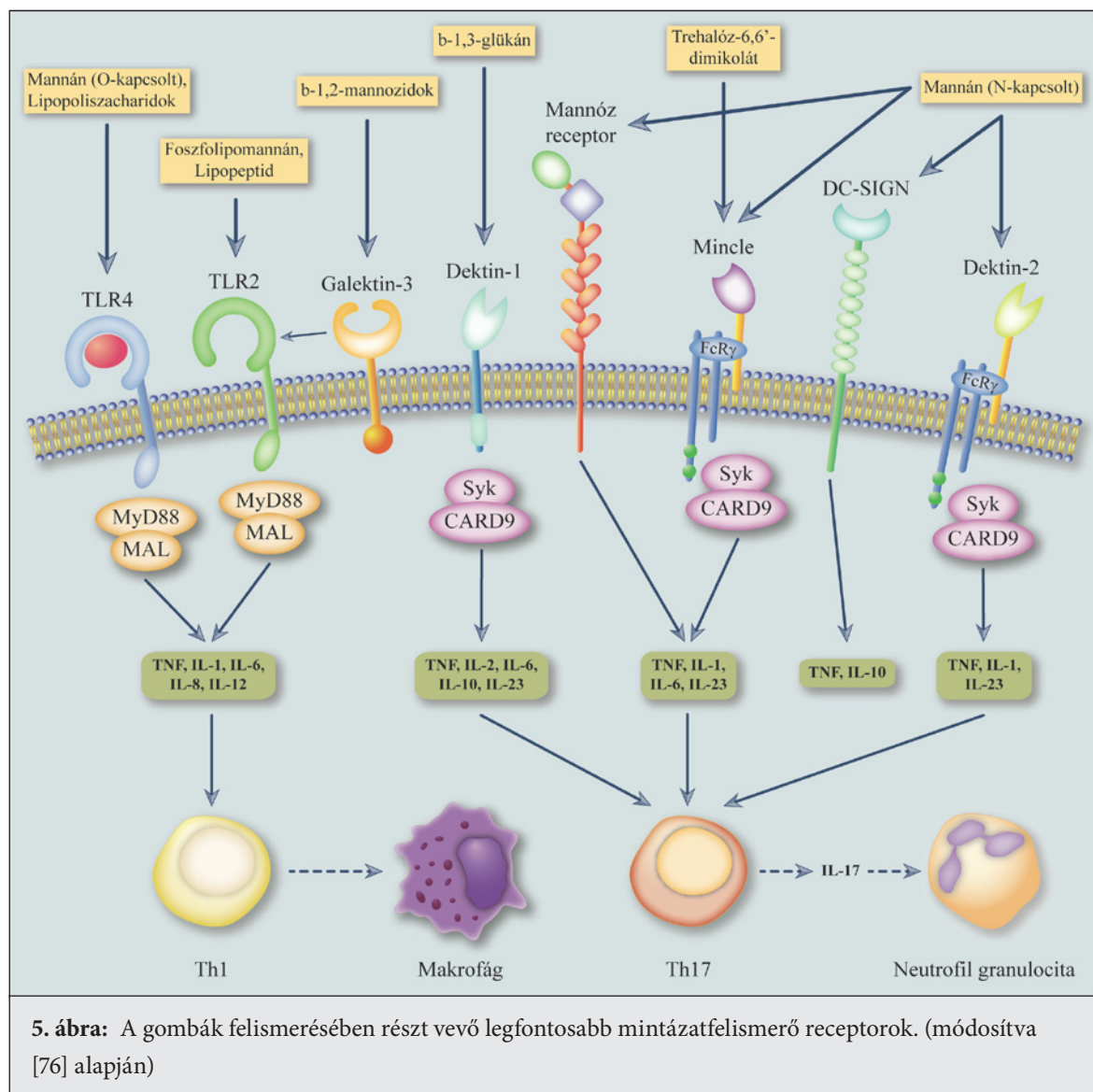
4.9 A gombák ellen kialakuló immunválasz

A gombás fertőzések immunológiai hátterének kutatása az elmúlt két évtized során kezdődött meg igazán intenzíven. Nagy áttörést jelentett például a különböző mintázatfelismerő receptorok (pattern recognition receptor, PRR), köztük a Dectin-1, mint fő β -glükán receptor azonosítása [71]. Ugyanakkor rohamosan bővülni kezdtek ismereteink a gombák ellen kialakuló adaptív immunválaszról is, nyilvánvalóvá vált például a Th17 (T helper 17) sejtek esszenciális szerepe a gombák elleni védekezésben, elsősorban a mukóza fertőzések során [72, 73]. Újabb kutatások arra is rámutattak, hogy a patogének PRR-ek általi felismerése szorosan összefügg a kiváltott adaptív immunválasz effektor funkcióival; a Dectin-1 aktivációja például elősegíti a Th17 sejtek differenciációját [74].

Mára tehát világossá vált, hogy a gombák elleni védekezésben mind a természetes (veleszületett), mind az adaptív (szerzett) immunitás elemei fontos szerepet játszanak. A természetes immunitás effektor sejtjei (monociták, makrofágok, dendritikus sejtek, neutrofil granulociták stb.) számos mintázatfelismerő receptort hordoznak, amelyek lehetővé teszik a patogének érzékelését a vérben és a szövetek között egyaránt [49]. Az idegen molekuláris mintázatok felismerése a receptor típusától, illetve sejttípustól függően különböző gyulladásos mediátorok termeléséhez vezet, illetve indukálja a patogén közvetlen eliminációját [75]. Ugyanakkor a patogének antigén prezentáló sejtek (antigen presenting cell, APC), például dendritikus sejtek általi bekebelezése az adaptív immunválasz iniciációjában játszik kulcsszerepet [76].

4.9.1 Patogén gombák elleni természetes immunitás

Az immunválasz kiváltásának első lépése a mikrobák felismerése, amely a mintázatfelismerő receptorok révén valósul meg. A mintázatfelismerő receptor (pattern recognition receptor, PRR) fogalmát Janeway vezette be 1989-ben [77]. Definíciója szerint a PRR-ek olyan evolúciósan konzervált receptorok, amelyek képesek különböző patogén-asszociált molekuláris mintázatok (pathogen associated molecular patterns, PAMPs) felismerésére. Mára hatalmas ismeretanyag gyűlt össze a PRR-ekről, és világossá vált, hogy igen komplex szerepet töltenek be az immunválasz különböző folyamataiban. Jelenleg a PRR-ek négy nagy családját különíthetjük el, ezek a Toll-szerű receptorok (Toll-like receptors, TLRs), C-típusú lektin receptorok (C-type lectin receptors, CLR), RIG-I-szerű receptorok (RIG-I-like receptors, RLRs), valamint a NOD-szerű receptorok (NOD-like receptors, NLRs) [78]. A gombák felismerésében részt vevő fontosabb receptorok és azok ligandjai az 5. ábrán láthatóak.



4.9.1.1 Toll-szerű receptorok

Ugyan mára bebizonyosodott, hogy a gombák felismerésében a C-típusú lektin receptorok játsszák a legfontosabb szerepet, bizonyos TLR-ek is kiemelkedő jelentőséggel bírnak a gombaellenes immunitásban. Ezt támasztja alá az, hogy a *myd88*^{-/-} egerek fogékonyabbak a *C. albicans* és *A. fumigatus* fertőzésre, mint a vad típusú állatok [79]. A TLR-ek közül idáig a TLR2-ről, TLR4-ről, TLR6-ról, TLR7-ről és TLR9-ről bizonyították, hogy szerepet játszanak a *C. albicans* elleni védekezésben. A TLR4 az egyik legjobban tanulmányozott Toll-szerű receptor, kulcsszerepet játszik a Gram- baktériumok sejtfalában található lipopoliszacharid (LPS) felismerésében [80]. Képes azonban érzékelni a

C. albicans sejtfalában található O-mannán-t is [81]. Egy korábbi tanulmányban megállapították, hogy *tlr4*^{-/-} egerek fogékonyabbak a disszeminált candidiasis-ra, ami a kemo-kin termelés defektjével volt magyarázható [82]. Ugyanakkor fontos kiemelni, hogy a TLR4 nem minden *C. albicans* törzs felismerésében játszik szerepet [83]. A TLR2 többek között a bakteriális peptidoglikán felismerésében játszik fontos szerepet, de számos más ligandja is ismert [80]. A TLR2 *C. albicans* elleni védekezés során betöltött szerepével kapcsolatban szintén felmerültek bizonyos ellentmondások. Ezeket azonban némileg feloldotta az a felfedezés, hogy a TLR2 több más PRR-ral (pl. Dectin-1) is képes együttműködni, és a kölcsönhatások függvényében specifikus citokin választ kiváltani [78]. A TLR2 a TLR6-tal együttműködve valószínűleg a *C. albicans* foszfolipomannánt ismeri fel [84]. A TLR7 és TLR9 szerepe az antifungális immunitásban kevésbé tisztázott, de mindkettőt kapcsolatba hozták a *C. albicans* felismerésével [85, 86].

Összességében elmondható, hogy ugyan a Toll-szerű receptorok sok esetben redundáns szerepet töltenek be a gombák elleni védekezésben, más receptorokkal együttműködve fontos szerepük van az immunválasz finomhangolásában [78]. Ugyan a dolgozatban nem tárgyalom részletesen, de folyamatban van laborunkban a TLR4 *C. parapsilosis* elleni immunválaszban betöltött szerepének vizsgálata *tlr4*^{-/-} egerek felhasználásával Prof. Karl Kuchler (Bécs) laboratóriumával együttműködésben.

4.9.1.2 RIG-I-szerű receptorok

A citoplazmatikus lokalizációjú RIG-I-szerű receptorok (RIG-I, MDA5, LGP2) elsődleges szerepe a virális RNS felismerése, ami különböző citokinek és interferonok termelődését indukálja [80]. Egy közelmúltban készült tanulmány szerint azonban az MDA5 receptor-nak szerepe lehet a *C. albicans* elleni védekezésben is; a gén mutációja ugyanis kapcsolatba hozható a *Candida* fertőzésre való fogékonysággal, az *mda5*^{-/-} egerek pedig megváltozott citokin termelést mutatnak *C. albicans* fertőzés esetén a vad típusú egerekhez képest [87].

4.9.1.3 NOD-szerű receptorok

Az intracelluláris lokalizációjú NOD-szerű receptorok családjában emberben 23, egérben 34 tagot számlál [80]. A receptorok általános felépítésére jellemző, hogy három doménből állnak: a C-terminális domén leucin gazdag ismétlődéseket tartalmaz, ezt tartják

felelősnek a mikrobiális PAMP-ek felismeréséért; a centrális domén az ún. NOD (nucleotide-binding and oligomerization domain) vagy NACHT domén, amely a receptorok oligomerizációjához, és így az aktív receptorkomplex kialakulásához szükséges; míg az N-terminálison az effektor domén helyezkedik el [80]. A NLR-okat N-terminális doménjük alapján négy alcsaládba sorolják: (1) NLRA (Class II transactivator, CIITA domén), (2) NLRB (baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat, BIR domén), (3) NLRC (caspase-recruitment domain, CARD), (4) NLRP (pyrin domain, PYD) [88]. A két legjobban jellemzett NLR az NLRC alcsaládba tartozó NOD1 és NOD2, amelyek bakteriális komponensek érzékelésében játszanak szerepet, és NF κ B, valamint MAPK aktivációt indukálnak [80].

4.9.1.4 C-típusú lektin receptorok

A C-típusú lektin receptorok a mintázatfelismerő receptorok igen heterogén családját alkotják. A család számos tagja szénhidrát felismerő domént (carbohydrate recognition domain, CRD) tartalmaz, ami a különböző szénhidrát komponensek megkötéséért felelős [78]. A C-típusú lektin receptorokra jellemző CRD-t C-típusú lektin doménnek (C-type lectin domain, CTLD) is nevezzük [89]. Ezzel szemben számos CLR C-típusú lektin-szerű domént tartalmaz (C-type lectin-like domain), amely nemcsak szénhidrátok, hanem lipidek és fehérjék felismerésére is képes [89]. A CLR-ek esszenciális szerepet játszanak a gombák elleni védekezésben [90]. A CLR-ek legnagyobb számban myeloid sejteken, úgymint makrofágokon és dendritikus sejteken expresszálódnak, de megtalálhatóak limfocitákon, granulocitákon és epitelsejteken is [78].

A Dectin-1 az egyik legjobban jellemzett CLR, amely számos különböző szerkezetű β -glükán molekula felismerésére képes [71]. A Dectin-1 receptor szerepét különböző gombás fertőzések során számos *in vivo* és *in vitro* tanulmány támasztja alá; a Dectin-1 deficiens egerek többek között csökkent rezisztenciát mutatnak *C. albicans*, *A. fumigatus* és *P. carinii* fertőzéssel szemben [91–93]. Érdekes módon a Dectin-1 receptor nem minden *C. albicans* törzs felismerésében játszik szerepet, ami többek között a különböző törzsek eltérő adaptációs képességével (a sejttel összetétel *in vivo* körülmények közötti megváltozásával) magyarázható [52]. A Dectin-1 hiánya emberben is fokozza a gombás fertőzésekre való fogékonyságot, többek között krónikus *Candida* bőr- és nyálkahártya fertőzésekhez (chronic mucocutaneous candidiasis, CMC) vezet [94]. A Dectin-1 receptor extracellulárisan egyetlen CTLD-t tartalmaz, míg intracelluláris doménjében

ITAM (immunoreceptor tirozin-alapú aktivációs motívum)-szerű motívum (ITAM-like motif, immunoreceptor tyrosine-based activation motif-like motif) található, amely a szignalizáció elindításáért felelős [78]. A receptor aktivációja az ITAM-szerű motívumok foszforilációjához vezet, ami a Syk kinázt (spleen tyrosine kinase, lép tirozin kináz) toborozza a receptorhoz. A Syk kináz foszforilálja PLC γ 2-t (phospholipase γ 2), ami több lépésen keresztül PKC δ (protein kinase δ) aktivációhoz vezet [95]. A PKC δ aktivációja egyrészt ROS termelést és inflammaszóma aktivációt indukál az ERK foszforilációján keresztül, másrészt a CARD9-Bcl10-Malt1 komplex aktivációjához vezet [78]. A CARD9 (caspase recruitment domain-containing protein 9)-Bcl10 (B cell lymphoma 10)-Malt1 (mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1) fehérjekomplex aktivációja végső soron NF κ B aktivációhoz és így különböző citokinek és kemokinek (többek között TNF α , IL-1 β , IL-2, IL-10, IL-6, IL-23, CCL2, CXCL1, CXCL2) termeléséhez vezet [78, 90]. A Dectin-1/Syk szignalizáció a MAP kinázok (p38, ERK, JNK) aktivációját is kiváltja [96, 97], ám ennek az útvonalnak a pontos lépései még nem teljesen tisztázottak. A Dectin-1 aktivációja fagocitózist, ROS termelést és inflammaszóma aktivációt is indukál [78], továbbá az adaptív immunválasz (különösen a Th17 sejtek differenciációjának) szabályozásában (ld. később) is fontos szerepe van [74, 98]. A Dectin-1 receptor számos TLR-rel képes együttműködni a patogének felismerése során [95], kimutatták például, hogy a Dectin-1 expressziója fokozza a TLR2 által indukált NF κ B aktivációt és citokin termelést [99]. Eddig nem vizsgálták a Dectin-1 *C. parapsilosis* fertőzésekben betöltött szerepét. A dolgozat készítésének idején folynak azok a kísérleteink, ahol Dectin-1 hiányos egerek szisztémás és intra-peritoneális fertőzését követően elemezzük a receptor hiányának hatását.

A Dectin-2 receptor szintén egyetlen CTLD-t tartalmaz, azonban nem β -glükán, hanem mannóz tartalmú struktúrák aktiválják [75]. Számos gombafaj, többek között a *C. albicans*, *A. fumigatus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *C. neoformans* és *Histoplasma capsulatum* felismerésében részt vesz [78]; ezen kívül allergiás folyamatokban is szerepet játszik [100]. A Dectin-2 receptor szintén a Syk kinázt aktiválja, azonban – mivel intracelluláris doménje nem tartalmaz ITAM-ot – a jeltovábbításhoz szükség van a receptor FcR γ adapterrel való asszociációjára [78]. A szignalizáció további lépései hasonlóak a Dectin-1 receptor esetében leírtakkal; fontos különbség azonban, hogy a Dectin-2 a Dectin-1-gyel ellentétben nem képes minden NF κ B alegységet aktiválni, ami eltérő celluláris válaszhoz vezet [78]. A Dectin-2 receptor is szerepet játszik azonban a Th17 válasz szabályozásában [101].

A mannóz receptor (MR) egyike a legkorábban azonosított CLR-eknek; nyolc extracelluláris CTLD-t tartalmaz, amelyek segítségével mannóz-, fukóz-, valamint N-acetilglükózamin-tartalmú struktúrákat ismer fel [78]. A mannóz receptor többek között felismeri a *C. albicans*-t, *C. neoformans*-t és *P. carinii*-t, és szerepet játszik a *C. albicans* által indukált Th17-differenciációban [102]. Ugyanakkor a MR deficiens egerek csak a *C. neoformans* fertőzéssel szemben mutatnak csökkent rezisztenciát, *C. albicans*-szal és *P. carinii*-vel szemben nem [75].

Számos további CLR-ről kimutatták, hogy szerepet játszanak a gombák elleni immunválaszban. A Mincle receptor a Dectin-2-höz hasonlóan a Syk kinázt aktiválja FcR γ adapteren keresztül; és ugyan elsődleges szerepe a *Mycobacterium* fajok felismerése, *Candida*, *Malassezia* és *Fonsecaea* fajok is képesek aktiválni [78]. A DC-SIGN többek között *C. albicans*, *A. fumigatus* és *Mycobacterium* fajok felismerésére képes, és a ligand természetétől függően különféle szignalizációs útvonalakat aktiválhat [78]. Több CLR-rel is képes együttműködni, és azok aktivációját szabályozva pro- vagy anti-inflammatorikus választ kiváltani [78]. A Galectin-3 ugyan nem a C-típusú, hanem az S-típusú lektin receptorok közé tartozik, azonban fontos szerepe van a *C. albicans* felismerésében [103]. Kimutatták, hogy a makrofágok Galectin-3 segítségével felismerik a *C. albicans* β -1,2-mannánt, a *S. cerevisiae*-t azonban nem [103]. Továbbá, a galectin-3 szerepet játszik szisztémás *C. albicans* és *C. parapsilosis* fertőzés esetén is [104].

4.9.1.5 A természetes immunitás effektor sejtjei

A természetes immunrendszer effektor sejtjei (neutrofil granulociták, monociták, makrofágok, dendritikus sejtek) kulcsszerepet töltenek be a patogén gombák elleni védekezésben [75]. A neutrofilek szerepét a szervezet védelmében legjobban a neutropéniában szenvedő betegek gombás fertőzésekre való fogékonysága jelzi [105]. Ezen sejtek legfőbb funkciója a patogének bekebelezése és közvetlen elpusztítása [76]. A neutrofil granulociták általában viszonylag alacsony szinten expresszálják a TLR-eket, viszont membránjukon igen nagy számban találhatóak fagocitotikus receptorok, különösen CR3 (complement receptor 3) és Fc γ receptorok [49]. A neutrofilek igen hatékonyak a gombák szaporodásának megfékezésében; kimutatták például, hogy drasztikus transzkripciós változásokat indukálnak a *C. albicans* sejtjeiben, ami a hifaképzés repressziójához vezet [61]. A neutrofilek mind intracelluláris, mind extracelluláris mechanizmusok segítségével képesek eliminálni a különböző kórokozókat [106]. Fagocitózist követően a

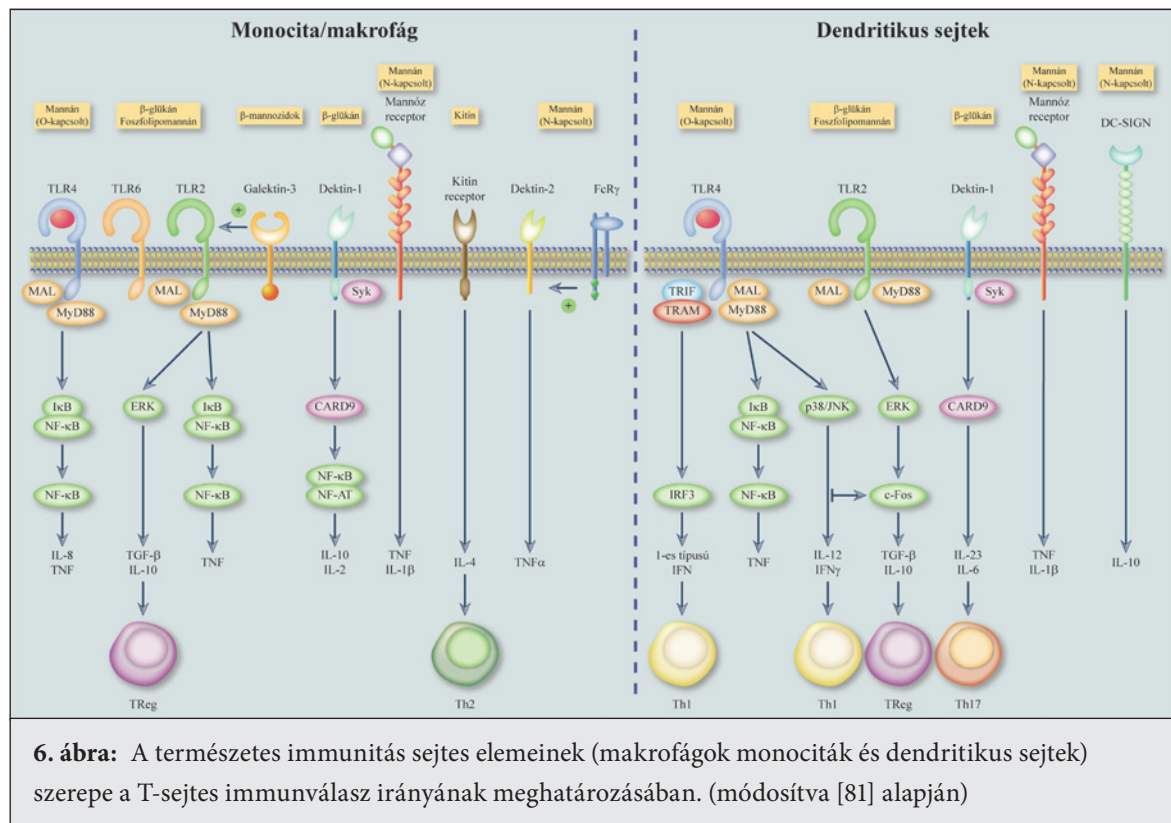
bekebelezett patogént tartalmazó fagoszómák lizoszómákkal fuzionálnak, majd különböző hidrolitikus enzimek, antimikrobiális peptidek és reaktív oxigéngyökök segítségével megtörténik a patogén elpusztítása [106]. A reaktív oxigéngyökök képződésében igen fontos szerepet játszik a NADPH-oxidáz, egy több alegységből álló enzimkomplex, amely aktivációt követően szerelődik össze a fagoszóma membránjában [75]. A NADPH-oxidáz a molekuláris oxigént szuperoxiddá alakítja, majd ebből további reaktív intermedierek (hidrogén-peroxid, hidroxil gyök) képződnek [75]. A neutrofilek képesek a *Candida* sejteket ún. extracelluláris csapdák (neutrophil extracellular trap, NET) segítségével is elpusztítani [107].

Ugyan a monociták és makrofágok általában alacsonyabb fungicid aktivitással rendelkeznek mint a neutrofilek [106], nagyon fontos szerepük van a patogének elleni gyulladásos válasz kialakításában [81]. A monocitákra magas szintű TLR és közepes szintű LR expresszió jellemző, míg makrofággá való differenciációjuk során megőrzik magas TLR expressziójukat, ugyanakkor megnövelik lectin receptoraik számát is [49]. Meg kell azonban jegyezni, hogy a PRR-ok megjelenését a sejt felszínen a sejtek aktivációs állapota, illetve a citokin környezet is nagyban befolyásolja. A *Candida* sejtek felismerése monocitákban és makrofágokban a gyulladásos citokin (főként TNF α (tumor necrosis factor α), IL-1 β (interleukin-1 β), IL-6 (interleukin-6)) gének megemelkedett expressziójához és intenzív citokin termeléshez vezet [81, 108, 109]. Ezeknek a fehérjéknek egyrészt kulcsszerepük van a fagociták antimikrobiális aktivitásának fokozásában [81], másrészt fontos szerepet játszanak a CD4⁺ T-sejtek polarizációjában is [76]. A gyulladásos citokinek protektív szerepét bizonyítja az is, hogy az *il6*^{-/-}, *tnfa*^{-/-}, és *il1r*^{-/-} egerek csökkent rezisztenciát mutatnak az invazív *Candida* fertőzéssel szemben a vad típusú állatokhoz képest [110–112].

A dendritikus sejtek mintegy hidat képeznek a természetes és adaptív immunitás között. Dendritikus sejtek különösen nagy számban fordulnak elő a nyálkahártyával borított felszínek közelében és a bőrben, ahol hatékony védelmet biztosítanak patogén mikroorganizmusokkal szemben. Különösen nagy számú mintázatfelismerő receptort hordoznak [49], a kórokozók fagocitózist követően pedig fontos szerepük van az antigének prezentálásában, és így az adaptív immunválasz elindításában [106]. A dendritikus sejtek a monocitákhoz hasonlóan, számtalan különféle citokin termelésére képesek, amelyek egyrészt hozzájárulnak a gyulladásos válasz kialakításához, másrészt meghatározzák a T-sejtes immunválasz irányát [76] (6. ábra).

A fent említett sejt típusokon kívül az ún. ILC sejtek (innate lymphoid cells) is fontos

szerepet játszanak a gombák elleni immunválaszban. Ezen sejtek közös jellemzője, hogy limfoid eredetűek, de nem hordoznak antigén-specifikus receptort [113]. Különösen fontos, hogy több ILC populáció is képes IL-17 termelésre, ami fontos szerepet játszik a *C. albicans* elleni immunválaszban [114].



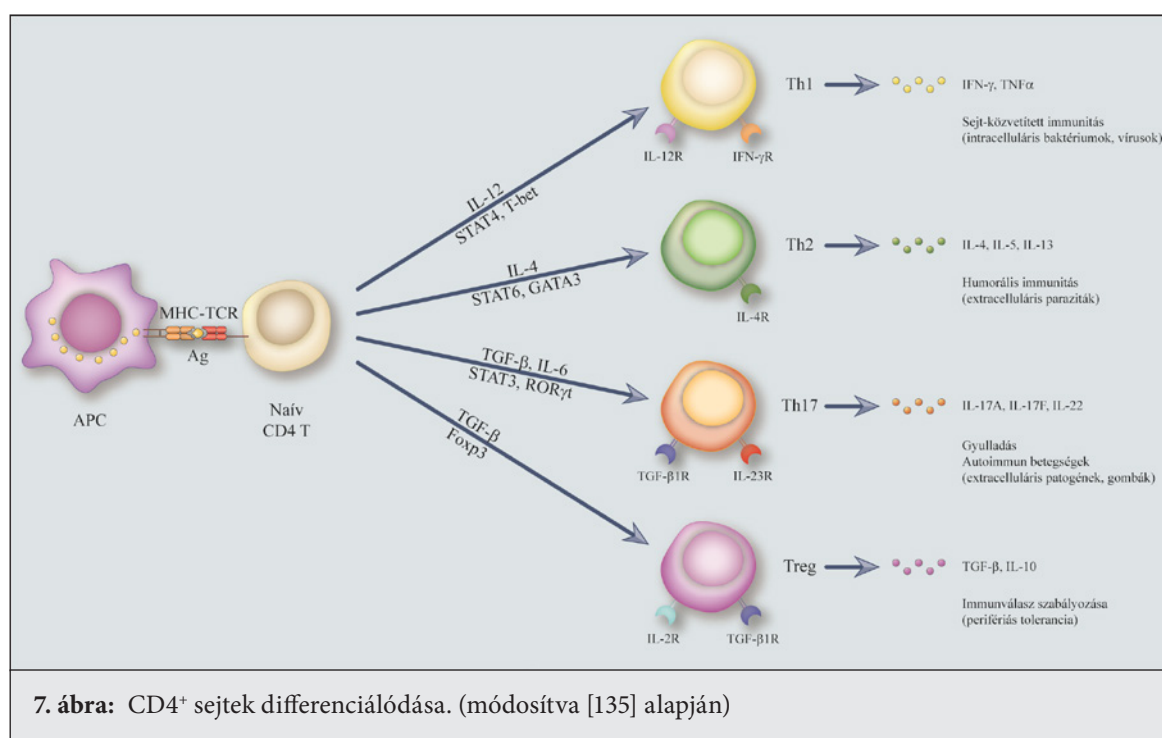
4.9.2 A gombák ellen kialakuló adaptív immunválasz

4.9.2.1 T-sejtes immunválasz

A fertőzések során kialakuló adaptív immunválasz szorosan összekapcsolódik a természetes immunitással. A szerzett immunitás legfontosabb effektorai a B- és T-limfociták, amelyek rendre a humorális, illetve celluláris immunitás kialakításáért felelősek [115]. A CD4⁺ Th sejtek különösen fontos szerepet játszanak a gombák elleni immunválaszban, amit egyértelműen jelez az AIDS-es betegek (akiknél drasztikusan lecsökkent CD4⁺ sejtszám figyelhető meg) fokozott érzékenysége *C. albicans*, *A. fumigatus*, *C. neoformans* és *P. jirovecii* fertőzéssel szemben [73]. A CD4⁺ Th sejteket funkcióik és citokin profiljuk alapján különböző populációkra oszthatjuk (7. ábra). Míg hagyományosan a Th sejtek két nagy csoportját (Th1 és Th2) különítették el [116], később felfedezték a CD4⁺ CD25⁺ regulátoros T-sejteket (Treg) [117], majd a Th17 populációt [118]. A Th1 sejtek differenciálódásához szükséges legfontosabb citokin az antigén prezentáló sejtek által termelt IL-12 [115]. A Th1 sejtek nagy mennyiségben termelnek IFN γ -t, ami a fagociták aktivációjának fokozása által kulcsszerepet játszik az intracelluláris patogének elleni védelemben [115]. Továbbá, a Th1 sejtek indukálják az opszonizáló antitestek szintézisét, ami szintén hozzájárul a hatékony fagocitózishoz [119]. A Th1 irányú differenciálódást számos transzkripciós faktor szabályozza, azonban a T-bet-nek van a legfontosabb szerepe. A T-bet expresszió nagyban fokozza az IFN γ termelést, ugyanakkor szuppresszív hatással van a Th2 és Th17 vonalak fejlődésére [115]. Számos példa bizonyítja, hogy gombás fertőzések esetén a Th1 irányú differenciáció szükséges a patogének hatékony eliminációjához [76]. Az IFN γ szerepét jelzi például, hogy az IFN γ deficiens egerek sokkal fogékonyabbak az invazív candidiasis-ra, mint a vad típusú állatok [120]. A Th1 válasz protektív szerepét továbbá *H. capsulatum* és *A. fumigatus* fertőzés esetén is bizonyították [73]. A Th2 sejtek az extracelluláris paraziták elleni védelemben, valamint allergiás folyamatokban játszanak fontos szerepet [115]. A Th2 sejtek differenciációjához IL-4-re és a GATA-3 transzkripciós faktor expressziójára van szükség; a Th2 sejtek által termelt legfontosabb citokinek az IL-4, IL-5, IL-13 és IL-10 [115]. A Th2 irányú válasz általában hátrányosnak tekinthető a gombás fertőzések kimenetele szempontjából [76]. A Th2 sejtek csökkentik a Th1 sejtek antimikrobiális effektor funkcióit, valamint alternatív makrofág aktivációt indukálnak, ami a patogének eliminációja helyett a fertőzés perzisztenciáját segíti elő [76]. A Th2 irányú válasz negatív hatását jól példázza az a tanulmány, amelyben bemutatták, hogy a vad típusú állatokhoz képest a GATA-3

overexpresszáló egerek csökkent túlélést mutatnak a szisztémás candidiasis esetén [121]. Ezekben az egerekben a makrofágok aktivációja nem volt megfelelő, exogén IFN γ adása azonban visszaállította a normál fagocita funkciókat és jelentősen fokozta az állatok túlélését. Humán betegekben is megfigyelték, hogy a krónikus gombás fertőzések (pl. *C. neoformans*, *H. capsulatum*) esetében többnyire Th2-domináns válasz mutatható ki [122]. *C. albicans* esetén kimutatták, hogy míg az élesztő formát felismerő dendritikus sejtek Th1 irányú választ indukálnak, a hifákkal kapcsolatba került fagociták a Th2-domináns válasz kialakulását segítik elő [123]. Ennek hátterében az áll, hogy a hifák sejtfalában a β -glükán nem hozzáférhető a Dectin-1 számára [51, 76], ami egyfajta túlélési stratégia a patogén részéről. A Th17 populáció kiemelkedő szerepét gombás fertőzések során mintegy tíz évvel ezelőtt fedezték fel, és azóta igen jelentős ismeretanyag halmozódott fel róluk. A Th17 sejtek fejlődésükhöz TGF β -t, IL-6-ot, IL-1 β -t és IL-23-at igényelnek; fő szabályozó transzkripciós faktoruk a ROR γ t [72]. Legfontosabb effektor citokinjeik az IL-17, IL-21 és IL-22 [115]. Az IL-17 intenzív gyulladásos választ indukál, számos citokin (pl. IL-6, GM-CSF) és kemokin (pl. KC, IL-8, RANTES) termelését serkenti, kulcsszerepet játszik a neutrofilek fertőzés helyére történő vándorlásának szabályozásában [124]. Az IL-22 szintén lehet pro-inflammatorikus hatású (számos sejttípusban fokozza különböző citokinek és kemokinek szintézisét [125]), ugyanakkor fontos szerepet játszik a mukóza védelmében különböző gyulladáscsökkentő antimikrobiális peptidek (S100A8, S100A9) szekréciójának fokozása által [76]. Az első tanulmány, amely az IL-17 gombás fertőzések elleni védő szerepét bizonyította, 2004-ben készült: ebben kimutatták, hogy az IL-17R (IL-17 receptor) mutáns egerek fokozott érzékenységet mutatnak szisztémás *C. albicans* fertőzéssel szemben a vad típusú állatokhoz képest [126]. Azóta a Th17 populáció, illetve az IL-17 kritikus szerepét gombás fertőzések során számos tanulmány megerősítette. Kimutatták, hogy a Th17 populáció fontos szerepet játszik orális candidiasis elleni védelemben is, a Th17 deficiens egerek ugyanis fogékonyabbak erre a fertőzésre [127]. Megfigyelték továbbá, hogy a CMC-ban szenvedő betegek perifériás véréből származó mononukleáris sejtek *C. albicans*-szal való stimulációt követően szignifikánsan kevesebb IL-17-et és IL-22-t termelnek, mint az egészséges donorokból származó sejtek [128]; továbbá, az IL-17R mutációt a CMC egyik lehetséges kiváltó okaként azonosították [129]. A Th17 differenciációban több CLR (Dectin-1, Dectin-2, mannóz receptor) is fontos szerepet játszik [73]. A Dectin-1 vagy CARD9 mutációt hordozó betegek szintén fogékonyak a CMC-ra, aminek a hátterében a defektív IL-17 válasz áll [94, 130]. A Th17 populáció szerepét azonban nemcsak *C. albicans*,

hanem *C. neoformans*, *H. capsulatum* és *P. braziliensis* fertőzés esetén is bizonyították [73]. A Th17 differenciációban az inflammaszóma aktivációnak is fontos szerepe van; a kaszpáz-1 vagy ASC deficiens egerekből származó splenociták drasztikusan csökkent IL-17 termelést mutatnak [131]. A regulátoros T-sejtek anti-inflammatorikus funkcióik révén fontos szerepet játszanak a gyulladásos válasz szabályozásában. Többek között IL-10-et és TGF β -t termelnek, amelyeknek fontos szerepe van a gyulladásos folyamatok gátlásában, és így a szöveti károsodás megelőzésében [115]. A fertőzés jellegétől függően azonban a Treg-ek jelenléte egyaránt lehet protektív vagy hátrányos. Míg a Treg hiányos egerek rezisztenciája jelentősen megemelkedik *H. capsulatum* és disszeminált *C. albicans* fertőzéssel szemben [132, 133], *Pneumocystis* fertőzés esetén a Treg-ek jelenléte jelentősen csökkenti a tüdőben kialakuló gyulladást és szöveti károsodást, így pozitív hatású a betegség kimenetele szempontjából [134]. Továbbá, fiziológias körülmények között a Treg-ek által termelt IL-10-re szükség van a normál mikrobiális egyensúly és tolerancia fenntartásához [76].



4.9.3 A *C. parapsilosis* elleni immunválasz

Noha a *C. albicans* ellen kialakuló immunválaszról az utóbbi évek-évtizedek folyamán jelentős ismeretanyag halmozódott fel, a *C. parapsilosis* elleni védekezési mechanizmusokról meglehetősen keveset tudunk. Csoportunk munkáján kívül, mindössze néhány tanulmány vizsgálta eddig a *C. parapsilosis* immunológiai felismerését, vagy az általa indukált citokin termelést. Linden és munkatársai kimutatták, hogy a galectin-3 szerepet játszik a *C. parapsilosis* neutrofilek általi fagocitózisában, és a receptor *in vivo* szerepét is bizonyították a *C. parapsilosis* fertőzés elleni védelemben [104, 136]. Ezen túlmenően néhány tanulmányban vizsgálták a *C. parapsilosis* epitelsejtekkel való interakcióját [137, 138]. Egyetlen tanulmányban sem vizsgálták még azonban átfogóan a *C. parapsilosis* immunológiai felismerését, ezért kutatócsoportunk folytatva a dolgozatban később bemutatásra kerülő munkát, a jövőben kiemelten kívánja kutatni a *C. parapsilosis* által kiváltott gazda immunválasz molekuláris hátterét.

5. CÉLKITŰZÉSEK

Annak ellenére, hogy a *C. parapsilosis* fertőzések klinikai jelentősége egyre nő, a faj specifikus virulencia faktorairól, illetve az általa okozott betegségek immunológiai hátteréről még mindig keveset tudunk. A *Candida* fertőzéseket vizsgáló tanulmányok túlnyomó többsége a *C. albicans*-szal foglalkozik, egyre több bizonyíték mutatja azonban, hogy a különböző patogén *Candida* fajok stratégiája és eszköztársa, amelyekkel képesek az emberi szervezetben elszaporodni, jelentősen különbözhet egymástól. Annak érdekében, hogy több információt nyerjünk a *C. parapsilosis* virulenciájáról és a gazdával történő kölcsönhatásáról, a következő célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

- 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 eszköztársak 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.

6. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A dolgozatban bemutatott eredmények alapját képező kísérleteknél számos mikrobiológiai, molekuláris biológiai és immunológiai technikát használtunk. Ezek részletes leírása megtalálható a disszertációhoz kapcsolódó publikációkban. Ebben a fejezetben csupán arra vállalkoztam, hogy bemutassam a módszerek sokféleségét a disszertációhoz kapcsolódó saját publikációk jegyzékében a módszerek részletes leírásához szükséges részletes irodalmi adatok megtalálhatóak.

6.1 Felhasznált *Candida* törzsek és humán sejt kultúrák

Felhasznált Candida törzsek

Az összes *Candida* törzs, mind a klinikai izolátumok, mind az általunk létrehozott mutánsok elérhetőek a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar Mikrobiológiai Tanszékének törzsgyűjteményében (Szeged Microbiological Collection, www.szmc.hu).

Genetikai manipulációhoz használt konstrukciók

- Lipáz géneket célzó konstrukciók
- Proteináz géneket célzó konstrukciók

Felhasznált sejt kultúrák

- HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells): Humán köldökszinór vénából izolált endotél sejtek
- J774.16, J774.2: rágcsáló makrofágszerű sejt vonalak
- Caco-2 (humán bélepitél sejt vonal)
- RAW 264.7 : rágcsáló makrofágszerű sejt vonal
- PBMC (peripheral blood mononuclear cells): egészséges felnőtt donorok perifériás véréből izolált mononukleáris sejtek
- PBMC-DM (peripheral blood mononuclear cells-derived macrophages): egészséges felnőtt donorok perifériás véréből izolált monocitákból differenciáltatott makrofágok

- PBMC-DC (peripheral blood mononuclear cells-derived dendritic cells): egészséges felnőtt donorok perifériás véréből izolált monocitákból differenciáltatott dendritikus sejtek

Felhasznált rekonstruált emberi szövetek:

- RHE (Reconstituted Human Epithelium): Rekonstruált 3 dimenziós emberi epitélium és epidermisz

Sejtenyésztés, primer sejtek izolálása

- PBMC izolálás
- PBMC-DM differenciáltatás
- PBMC-DC differenciáltatás

6.2 Kísérleti módszerek

- Genetikai manipuláció *C. parapsilosis*-ban
- Elektroporáció, kémiai transzformáció

In vitro fertőzési modellek

- PBMC fertőzési modell
- PBMC-DM fertőzési modell
- PBMC-DC fertőzési modell
- Caco-2 fertőzési modell

Egyéb molekuláris technikák

- RNS izolálás, cDNS szintézis, qRT-PCR
- Totál RNS izolálás
- Southern-blot elemzés
- Rhodamin B-t és olívaolajat tartalmazó táplemez (lipáz aktivitás detektálására)
- Felülúszóból mért lipáz aktivitás (p-nitrofenil-palmitát szubsztrát felhasználásával)
- Biofilm képzés vizsgálata (polietilén, szilikon, polisztirol felületeken) XTT aktivitás mérés segítségével

- Laktát-dehidrogenáz (LDH) aktivitás mérése
- Enzimkötött immunoszorbens próba (ELISA)
- Western-blot
- Intracelluláris citokin festés
- *C. parapsilosis* immunológiai felismerésében szerepet játszó receptorok azonosítása – PRR blokkolók használata (laminarin, LPS, TLR2 blokkoló)
- *C. parapsilosis* felismerését követő intracelluláris jeltovábbítás elemeinek vizsgálata – MAPK inhibitorok használata

Mikroszkópos technikák

- Fénymikroszkópia, fluoreszcens mikroszkópia, konfokális mikroszkópia
- Scanning elektronmikroszkópia
- Akridin narancs/kristály ibolya festés fagocitózis és intracelluláris túlélés nyomonkövetéséhez
- FITC, LysoTracker Red, DAPI, (CD83-PE), LysoTracker Green festés fago-lizoszóma kolokalizáció nyomonkövetésére
- Élő sejtes videó mikroszkópia

In vivo fertőzési technikák

- Balb/c egerek intraperitoneális és intravénás fertőzése
- Újszülött patkányok intravénás, intraperitoneális, emésztőszervrendszeri fertőzése
- CFU (kolóniaképző egység) meghatározása különböző szervekből
- *Galleria mellonella* lárvákat alkalmazó fertőzési modell

Statisztikai analízis

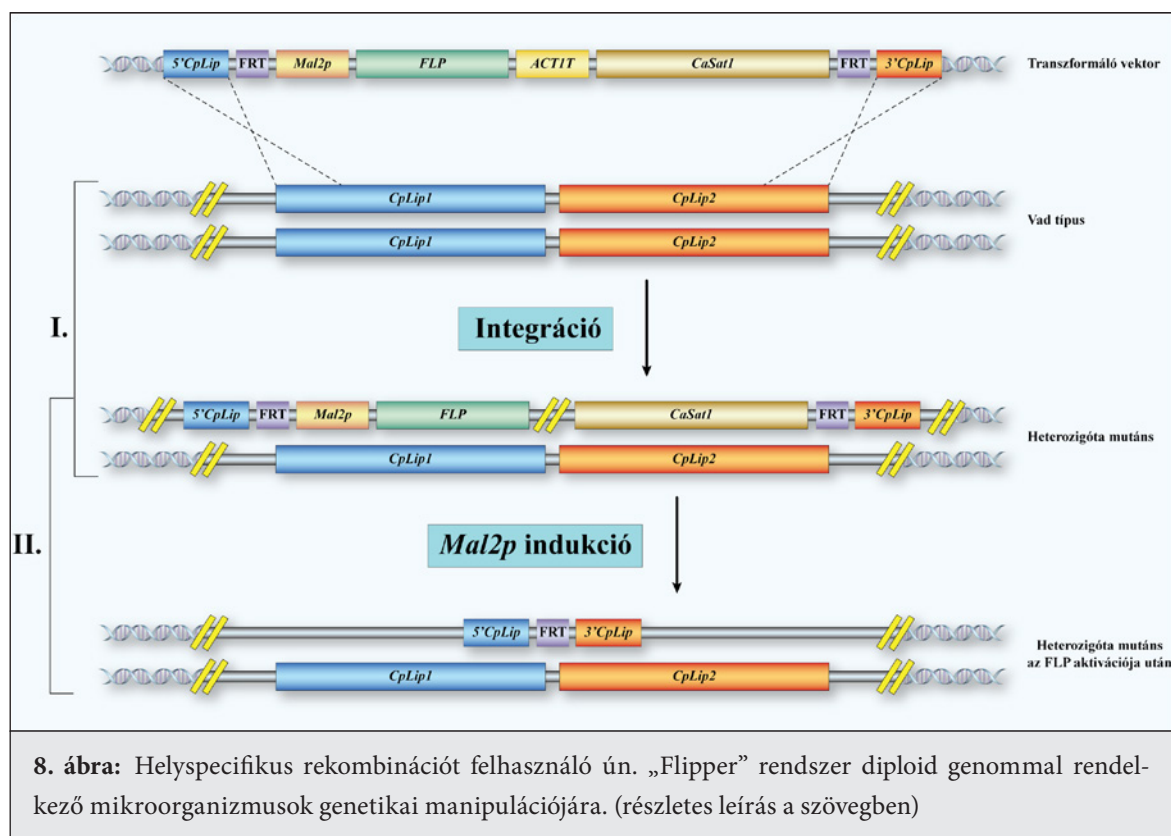
- Az adatok kiértékelését, az átlagok, a szórások és a különbségek szignifikanciájának kiszámítását a kísérleti adatoknak megfelelő tesztek alkalmazásával a GraphPad Prism 6 szoftverrel végeztük.

7. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS

7.1 Genetikai manipuláció *C. parapsilosis*-ban

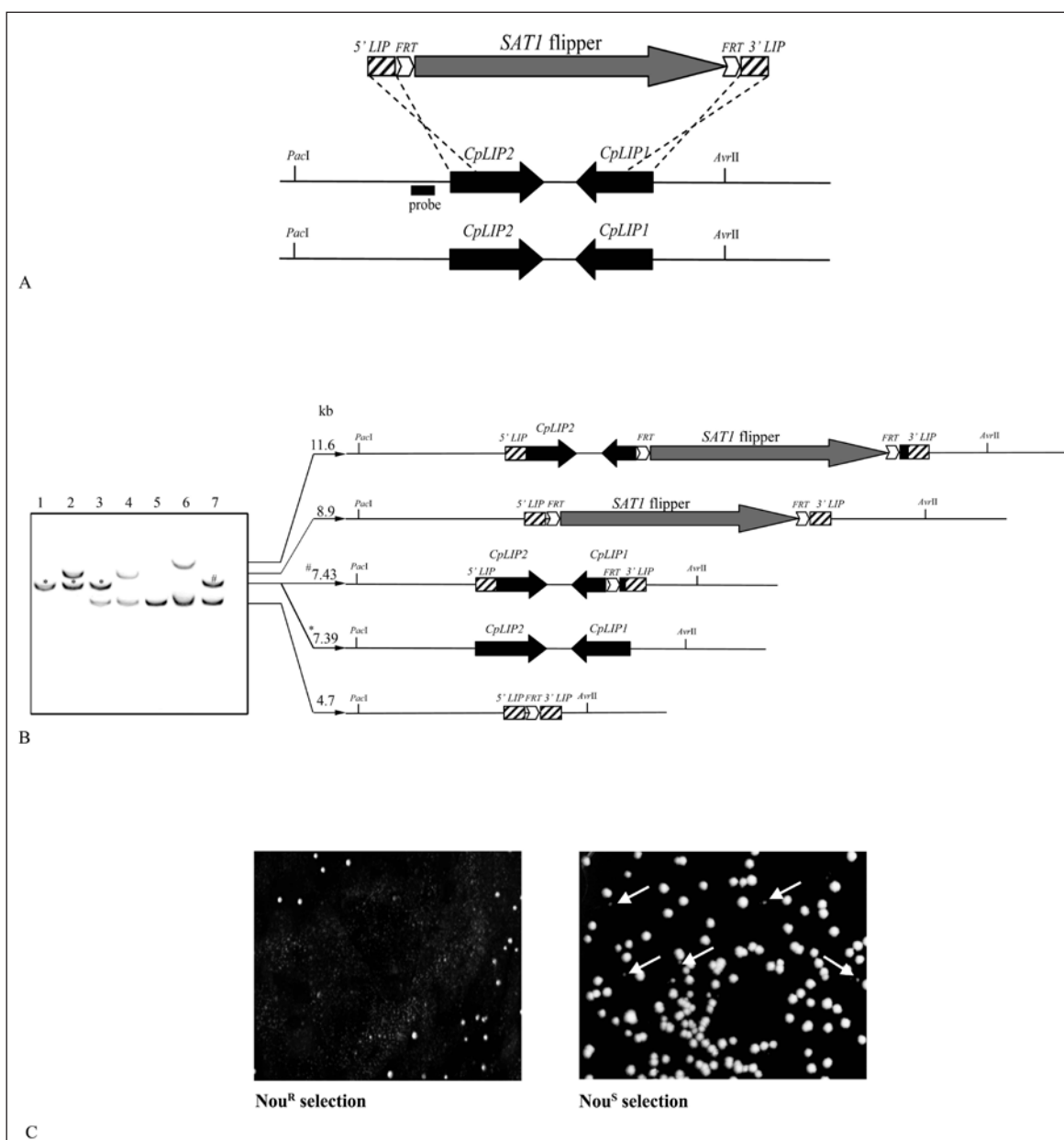
Ahogy a bevezetőben említettem, a *C. parapsilosis* genetikai manipulációja meglehetősen nehéz feladat. Egyrészt diploid organizmusról van szó, másrészt nem ismert a teljes szexuális ciklusa, ezért a klasszikus genetikai módszerek nem jöhetnek szóba. Munkánk kezdetén egy megbízhatóan használható transzformációs és gendelési technika hiánya jelentette a legnagyobb kihívást. A Hamburgi Egyetemen folytatott kutatásaink során megállapítottuk, hogy a *C. parapsilosis* sejtek kémiai transzformációja lehetséges, és sikerrel juttattunk a sejtmagba idegen DNS-t. Az első általunk is felhasznált domináns szelekciós marker a mikofenolsav rezisztencia marker volt. A *C. albicans* inozin 5'-monofoszfát dehidrogenáz kódoló *IMH3* génjét *C. albicans*-ban túlműködtetve mikofenolsav rezisztenciát sikerült kiváltani [139]. A markert eredményesen alkalmazták *C. albicans*-ban mint riporter gént, a fertőzés különböző fázisaiban specifikusan kifejeződő virulencia faktorok, valamint a white-opaque fenotípus váltás vizsgálatához [140], [141]. Ezekre az eredményekre alapozva végeztük el az első *C. parapsilosis* transzformációs kísérleteket, amelyek során igazoltuk, hogy a *C. albicans* *IMH3* génjének bejuttatása képes rezisztenciát kiváltani *C. parapsilosis*-ban is. Később más kutatócsoportok is alkalmazták ezt a technikát [142], [143]. Ez a módszer azonban számos problémát vetett fel, ezek közül az egyik legkomolyabb nehézséget az jelentette, hogy a mikofenolsav szelekció során a *C. parapsilosis* sejtek (különösen egyes klinikai izolátumok) nagymértékben alkalmazkodtak és váltak spontán rezisztenssé. Ekkoriban jelent meg egy publikáció, amely a mikofenolsavat használó rendszert helyspecifikus rekombinázzal való kombinációban alkalmazva, célzott gendelésiét valósított meg *C. albicans*-ban [144]. A kihívás tehát az volt, hogy találjunk egy új szelekciós markert, és ezt kombináljuk az ún. „Flipper” technikával. Ez a rendszer már alkalmas lehet a *C. parapsilosis* célzott genetikai módosítására. Erre a célra a nourseothricin rezisztencia marker tűnt a legbiztatóbbnak. Az *E. coli* *Sat1* génje, amely sztreptotricin aciltranszferáz kódol, rezisztenciát okoz a nourseothricinnel szemben. A *Candida* fajok nem konvencionális kódhasználata miatt a CTG kodonokat CTT kodonokkal helyettesítették. A módosított *CaSAT1* szekvenciát sikeresen expresszáztatták *C. albicans*-ban, annak *ACT1* promóterét és *PCK1* terminátorát alkalmazva [145]. Egy évvel később, ennek az optimalizált szekvenciának egy másik változatát is kidolgozták, ahol a *C. albicans* *ACT1*

promóter és *URA3* terminátor szekvenciáját alkalmazták (*caSAT1*) [146]. Reuss és munkatársai a *caSAT1* marker flipper variánsát is létrehozták, lehetőséget nyitva több allél (vagy akár több gén) deléciójához ugyanabban az organizmusban. A *caSAT1* flipper rendszer esetén a domináns szelekciós marker helyspecifikus rekombinázorok segítségével eltávolíthatóvá válik. A konstrukció az *FLP* rekombinázor gént tartalmazza, amely egy indukálható maltóz (*MAL2*) promóter szabályozása alatt áll. A nourseothricin rezisztens transzformánsok analízise után, maltóz tartalmú tápközegben az Flp helyspecifikus rekombinázor képes az *FRT* helyeket felismerni, majd ezeket rekombinálva az idegen DNS egy szakaszát a genomból kivágni, így egy transzformációs kör után újra a vad típushoz hasonlóan a domináns szelekciós markert nem tartalmazó organizmushoz juthatunk (8. ábra) Bár *C. albicans* esetén jól működő gendelációs eljárások régóta rendelkezésre álltak [147], *C. parapsilosis* esetén az első sikeres gendelációt majd 15 évvel később, a *caSAT1* flipper rendszer segítségével hajtottuk végre [148] és ezzel megnyitottuk az utat a faj genetikai manipulációja előtt.



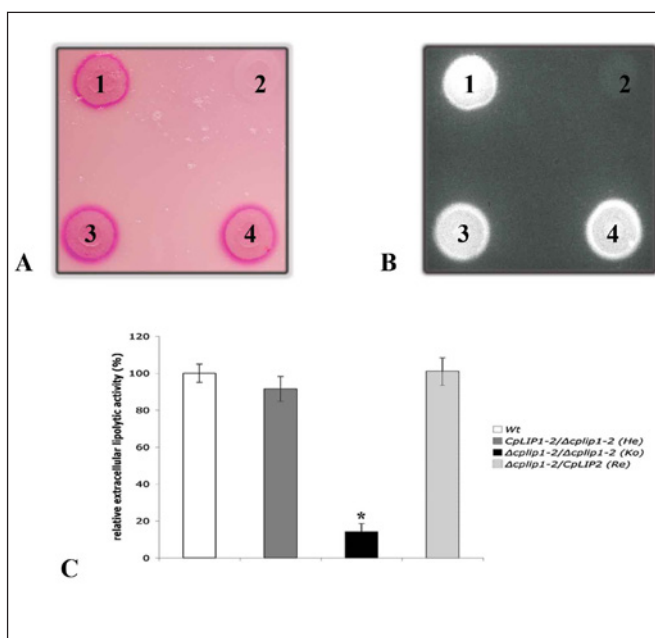
7.2. Lipázok szerepének vizsgálata a *C. parapsilosis* patomechanizmusában

Az előző fejezetben tárgyalt technika segítségével sikeresen hajtottunk végre célzott génkiütést *C. parapsilosis*-ban és létrehoztunk egy lipáz negatív törzset. A választásunk azért esett éppen a szekretált lipázokra, mert egy korábbi munkánk során bizonyítottuk, hogy az enzimek aktivitásának gátlása következtében szignifikánsan csökken a gombák szövetkárosító hatása *in vitro* körülmények között [63, 149]. Mindezidáig *C. albicans*-ban 10 különböző lipáz enzim kódoló gént azonosítottak [150]. Ezen gének fertőzést követően különbözőképpen szabályozottak, valamint expressziójuk leginkább a fertőzés egy adott stádiumától függ [151]. Továbbá az egyes gének különböző mértékben járulhatnak hozzá a gomba virulenciájához, melyek közül a *LIP5* és *LIP8* a leginkább kifejezettek [151], [47]. A *C. albicans*-szal ellentétben, a *C. parapsilosis* esetében csupán két lipáz szekrécióért felelős gént azonosítottak korábban. Mivel ezen gének leginkább a *C. albicans* *LIP1*-gyel mutattak nagymértékű homológiát, ezért ezek a *LIP1* és *LIP2* elnevezést kapták [152]. Ezen gének *S. cerevisiae*-vel és *P. pastoris*-szal történő heterológ expresszáltatása során bebizonyosodott, hogy a két gén közül csak a *LIP2* kódol funkcionális fehérjét [153], bár ez a vizsgálat nem zárta ki annak lehetőségét, hogy a *LIP1* gén szerepet játszhat a gomba virulenciájában. A teljes genomszekvenálást követően további két lipáz kódoló gén jelenlétére utaltak jelek, bár ezek analízise még nem kezdődött el [40]. Ezek a korai eredmények arra engedtek következtetni, hogy a gomba szekretált lipázainak köze lehet a patogenitáshoz, a gazdát károsító folyamatokhoz. A deléciós stratégia kidolgozása során olyan transzformáló kazettát hoztunk létre, amely a *C. parapsilosis* genomjából egy 2,701 bp méretű szakaszt törölt és ezáltal mind a *LIP1*, mind a *LIP2* géneket eltávolította.



9. ábra: Lipáz gének (*CpLIP1*-*CpLIP2*) deléciója *C. parapsilosis*-ban. (A) A *CpLIP1*-*CpLIP2* tartalmazó genomi régiót célzó kazetta felépítése. A *LIP1* és *LIP2* gének homológ régióival, a flipper kazettával és az *FLP* helyspecifikus rekombináza minimális felismerő helyeivel (FRT). A fekete hasáb jelzi a Southern hibridizáció során felhasznált próba kötődési pozícióját. (B) Southern blot hibridizációs elemzés a létrehozott mutánsok genomi DNS-én. Az 1-es sáv a vad típusú, a 2-es a heterozigóta nourseothricin (Nou) rezisztens, a 3-as a heterozigóta Nou szenzitív, a 4-es a homozigóta Nou rezisztens, az 5-ös a homozigóta Nou szenzitív, a 6-os a rekonstruált mutáns Nou rezisztens, míg a 7-es a rekonstruált mutáns Nou szenzitív genomi hibridizációs jeleit mutatja. (C) A nourseothricin rezisztens és szenzitív telepek szelekciója, a bal oldali kép az első transzformációs lépés utáni szelekciót mutatja magas antibiotikum koncentráció (100 µg/ml), míg a jobb oldali a helyspecifikus rekombináza aktiválása utáni szelekciót mutatja alacsony (5 µg/ml) szelekciós nyomás mellett. A fehér nyilak a rekombinációs eseményt elszenvedett, szenzitív telepeket jelzik, amelyek alkalmasak a második transzformáció végrehajtására.

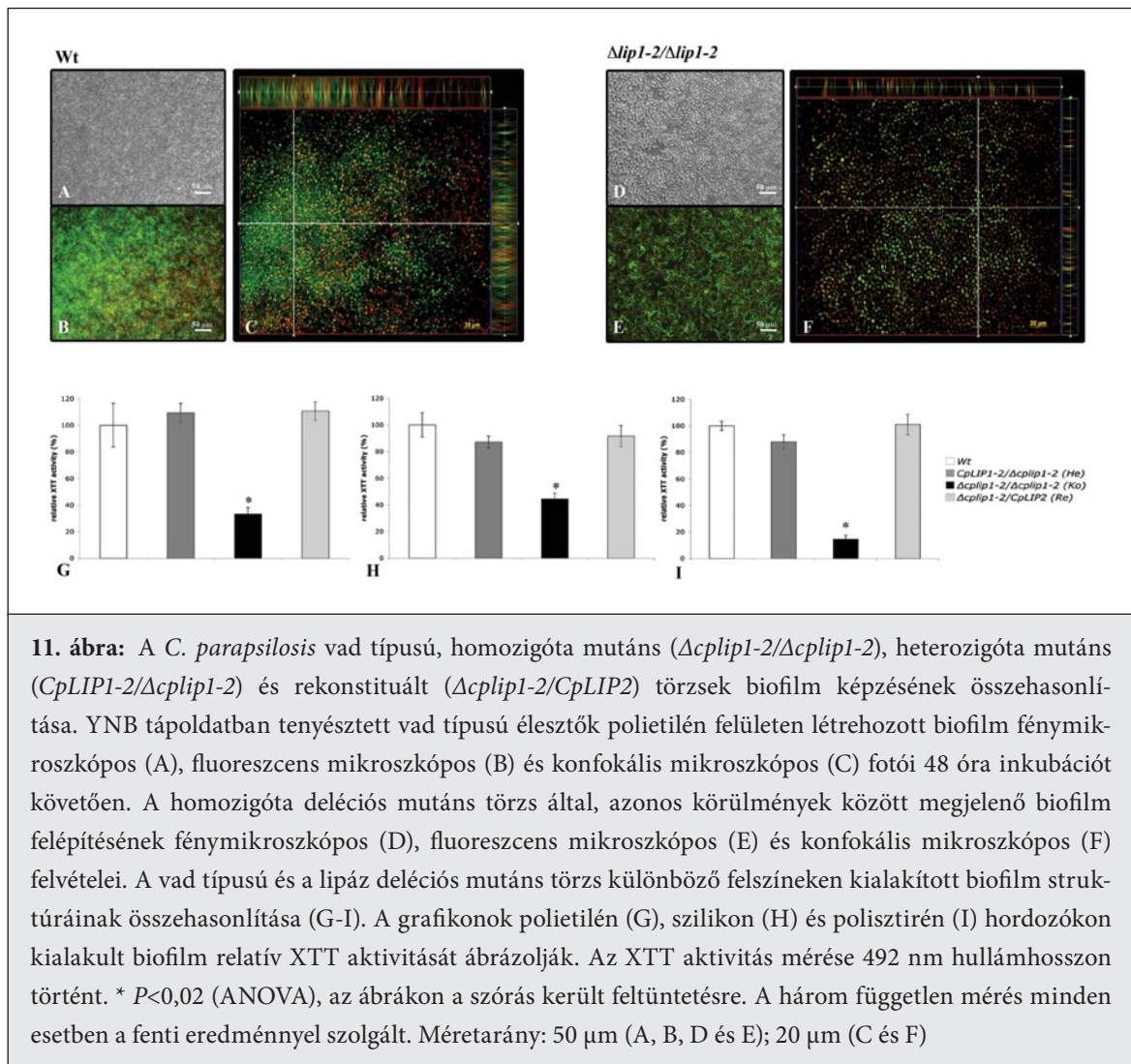
A 9. ábra a delécio folyamatát mutatja, illetve a *CpLIP2* gén rekonstrukcióját, amellyel a lipáz termelésben helyreállított mutánst hoztuk létre. Az ábra azt is bemutatja, hogy a heterozigóta mutánsok szelekciója a csökkentett mennyiségű nourseothricin alkalmazásával könnyen megvalósítható, hiszen ilyenkor az ún. *Nou^S* sejtek apró telepeket hoznak létre a szelekciós táptalajon. A helyes genomi integrációt minden esetben Southern hibridizációs technikával ellenőriztük. A létrehozott mutánsok extracelluláris lipáz termelését speciális Rhodamin B-t tartalmazó táptalajon ellenőriztük. A termelődő lipázok a telepek körül jól felismerhető rózsaszínes gyűrűt képeznek, amely UV fényben szintén jól megfigyelhető. Az általunk létrehozott mutánsok lipáz negatívnak bizonyultak, amelyet mind kvalitatív, mind kvantitatív úton igazoltunk (10. ábra).



10. ábra: Lipáz aktivitás vizsgálata a létrehozott *C. parapsilosis* lipáz mutánsokon. (A) A vad típusú (1), a homozigóta géndelécio (2), a heterozigóta (3) és a rekonstruált (4) törzseket rhodamin-B és olívaolaj tartalmú lemezekre tenyésztettük, ahol a szekretált lipázok termelése esetén jellegzetes rózsaszínű gyűrű megjelenése figyelhető meg a szabad zsírsavak és a rhodamin-B kölcsönhatásának következtében, ez a termék UV fényben is megfigyelhető (B). (C) A szekretált lipázok hiányát -a tenyészetek felülszóróiból p-nitrofenil-palmitát kromogén szubsztrát felhasználásával- mért lipáz aktivitás. * $p < 0,0001$ (ANOVA).

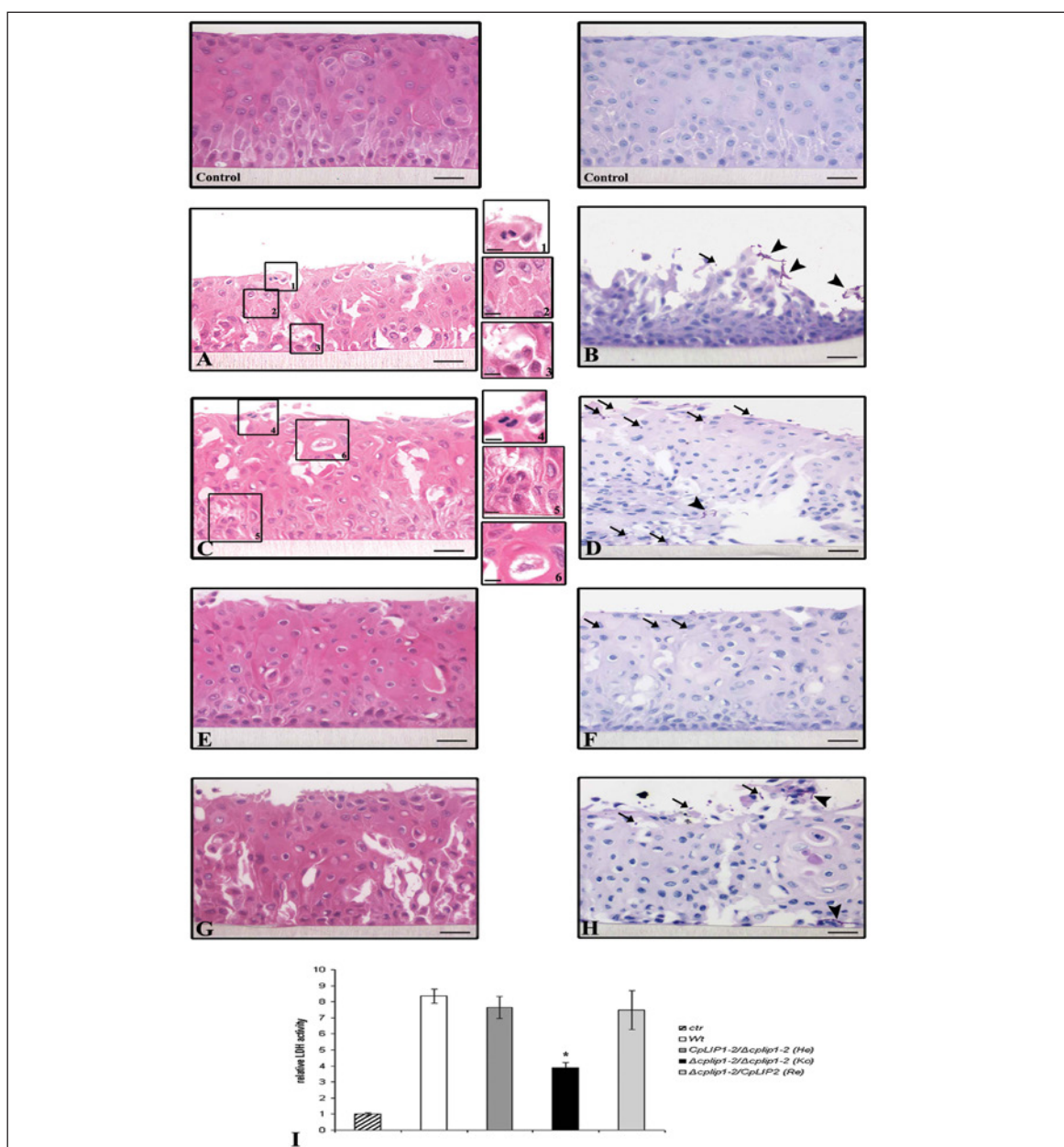
Ismert klinikai megfigyelés volt, hogy a *C. parapsilosis* képes magas lipid tartalmú környezetben történő növekedésre (ilyen például az alacsony születési súlyú csecsemők klinikumban használt mesterséges parenterális táplálásakor felhasznált tápoldat) [40], így feltételeztük, hogy a lipázok hiánya befolyásolhatja ezt a képességet. Megállapítottuk, hogy a mutáns sejtek szaporodása ilyen közegben szignifikánsan lassabb, amely arra utal, hogy az extracelluláris lipázoknak fontos szerepe van a környezetben megtalálható komplex lipidek lebontásában és a gomba számára felvehető formába hozásában (nem mutatott adat). A *C. parapsilosis* fertőzések kialakulásának egyik jól ismert forrása a különböző katétereken létrehozott biofilmekről a véráramba kerülő sejtek elszaporodása, ezért megvizsgáltuk a mutánsok biofilm képző képességét, és azt tapasztaltuk,

hogy a mutáns sejtek által létrehozott biofilmek vastagsága és összetettsége jelentősen eltér a vad típusától (11. ábra).



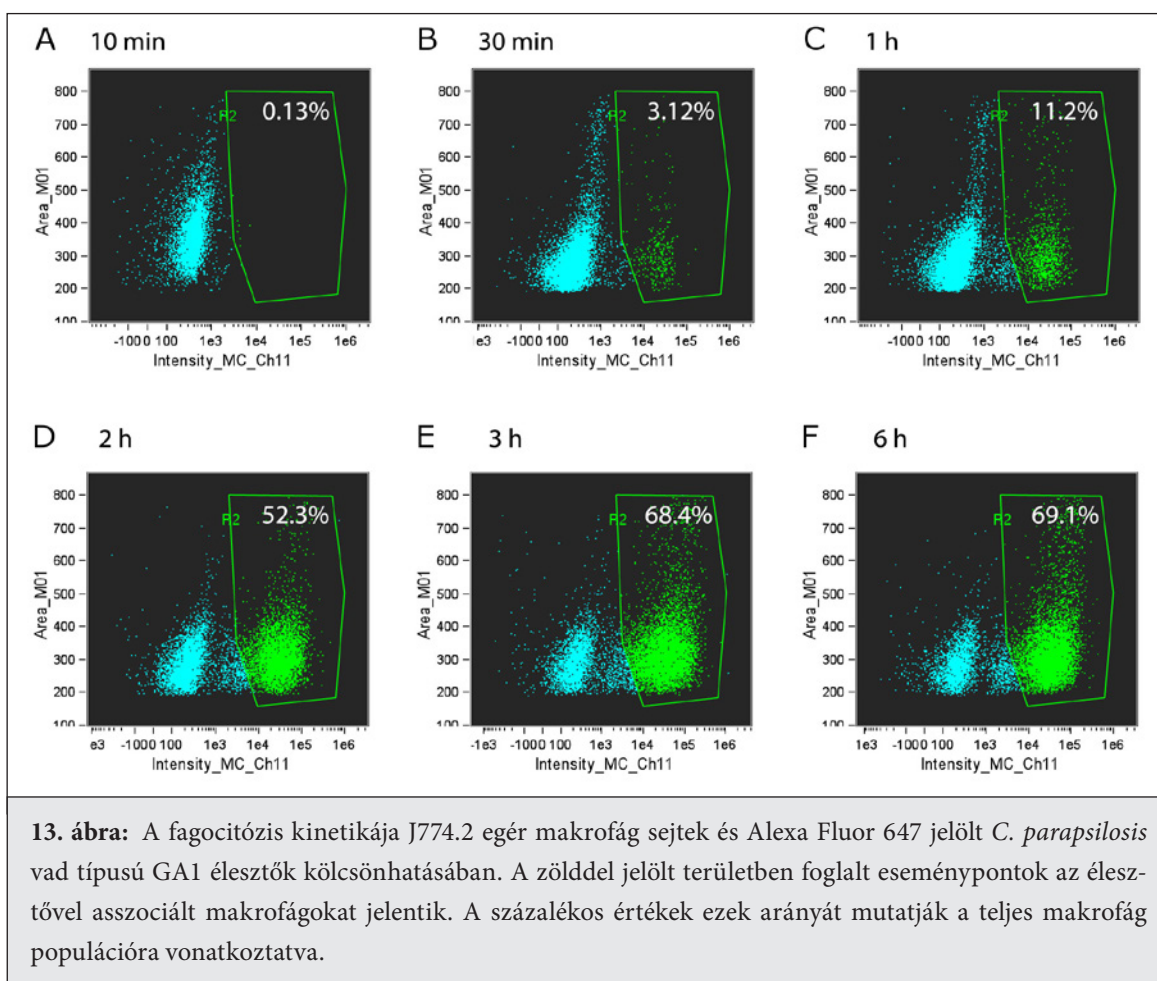
A biofilm képzés vizsgálatát követően egy új, a gazda-patogén kölcsönhatások összetettebb elemzésére alkalmas modellt fejlesztettünk ki a *C. parapsilosis* virulenciájának tanulmányozására. Korábban *C. albicans* esetében már sikerrel alkalmazták a rekonstruált emberi szöveteket, mint virulencia modelleket [154]. Ezek a rendszerek a gombák patogenitással összefüggésbe hozható folyamatainak több állomását is vizsgálhatóvá teszik, ilyenek pl. a megtapadás vagy adhézió, a szövetekbe történő behatolás vagy invázió, vagy a gazda sejtjeit, szöveteit károsító képesség. Kísérleteink során emberi rekonstruált epitélium és epidermisz szövetek *C. parapsilosis*-szal történő fertőzését követően súlyos hisztopatológiai elváltozások voltak megfigyelhetőek, úgymint atrófia, ödéma,

és hasadékok megjelenése valamennyi szövet rétegben, melyekhez a sejtek apoptózisa is társult. Ezzel ellentétben a lipáz deficiens *C. parapsilosis*-szal történő fertőzés során a szövetkárosodás minimális mértékű volt, és a fertőzött szövet jellegét tekintve inkább a kezeletlen kontrolléhoz volt hasonlítható (12. ábra A-H). Továbbá a lipáz termelésre képtelen mutáns gombasejtek epitél felszínhez történő kitapadása is lényegesen rosszabbnak bizonyult a vad típusú törzshöz viszonyítva. A szövetkárosodás laktát-dehidrogenáz (LDH) felszabadulással is mérhető, mely során a deficiens törzs esetén minimális LDH volt csupán kimutatható a vad típusú törzshöz képest (12. ábra I). Mindezen eredmények arra utaltak, hogy a *C. parapsilosis* szekretált lipázok jelentős szerepet játszanak a gomba szövetekhez történő adhéziójában és a gazdaszervezet szöveteinek károsításában.

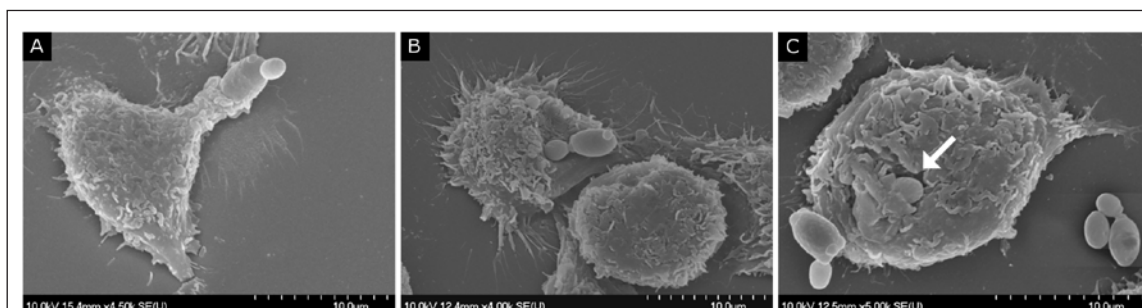


12. ábra: *C. parapsilosis* vad típusú törzsével fertőzött rekonstituált humán orális epitélium 48 óra inkubációt követően. Fertőzetlen kontroll – (A és B), vad típusúval – (C és D), heterozigóta mutánsal – (*CpLIP1-2/Δcplip1-2*) (E és F), homozigóta mutánssal – (*Δcplip1-2/Δcplip1-2*) (G és H), valamint rekonstituált (*Δcplip1-2/CpLIP2*) törzsszel (I és J) fertőzött szövetek. Az ábra bal oldalán látható képek hematoxinilin-eozin –, a jobb oldalon szereplő felvételek perjódsv-Schiff festést követően készültek. A metszetek kiemelt régióiban hisztopatológiai eltérések figyelhetők meg. A C és E felvételeken kijelölt területeken apoptotikus sejtek (rendre 1 és 4), intercelluláris ödéma (rendre 2 és 5), a szövet integritásának megbomlása (C/3), valamint vakuolizáció (E/6) figyelhető meg. A fekete nyilak élesztő sejteket, a nyílhegyek pszeudohifa elemeket jelölnek. Méretarány: 10 μm (A-J); kiemelt területek 5 μm (1–6). A rekonstituált humán orális epitélium felülúszójában mért relatív LDH mennyiségek a vizsgált törzsekkel (vad típus, heterozigóta, homozigóta, rekonstituált mutáns) való fertőzés 48. órájában vett mintákban (K). Az értékek három független kísérlet eredményéből származnak. *P<0,02 (ANOVA), a grafikonon a szórás szerepel.

Miután megállapítottuk, hogy a lipáz hiányos sejtek jelentősen alacsonyabb gazdakárosító képességgel rendelkeznek, megvizsgáltuk, hogy az elsődleges celluláris védelmi vonal legfontosabb komponensei -a makrofágok- képesek-e hatékonyabban elpusztítani a mutáns élesztőket. Ennek érdekében egy egységesített *in vitro* fertőzéses modellt dolgoztunk ki, amelyben a makrofágok szerepét a szakirodalomban gyakran hivatkozott J774.2 egér makrofág sejt vonal sejtjei töltötték be. A fagocitózis kinetikáját egy olyan viszonylag egyszerű áramlási citométert felhasználó módszerrel követtük nyomon, ahol a gombasejteket Alexa Fluor 647 fluoreszcens festékkel jelöltük meg, és ennek a jelnek a jelenlétét vizsgáltuk a makrofág populációban. A fagocitózis kinetikájának jellemzése céljából a méréseket az indukció különböző időpontjaiban (10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 6 h) végeztük el. Az áramlási citometria mérések során a makrofágok mérettartományában a fluoreszcens fényt emittáló eseményeket tekintettük fagocitáló makrofágoknak. Mérésünk során minden időpontban ezen események számát viszonyítottuk a teljes makrofág populáció számához, ezzel meghatározva az élesztő sejtekkel asszociált makrofágok arányát. Megfigyeléseink szerint az élesztő sejtek felvétele már az inkubáció első 30 percében kimutatható. A fagocitáló makrofágok részaránya a fertőzést követő 2. óránál az 50%-ot is meghaladta és egészen az inkubáció harmadik órájáig emelkedett. Úgy találtuk, hogy ennél az időpontnál a folyamat telítési fázisba lépett, ugyanis 3 órát követően nem tapasztaltunk lényegi emelkedést a fagocitáló sejtek arányában (13. ábra).

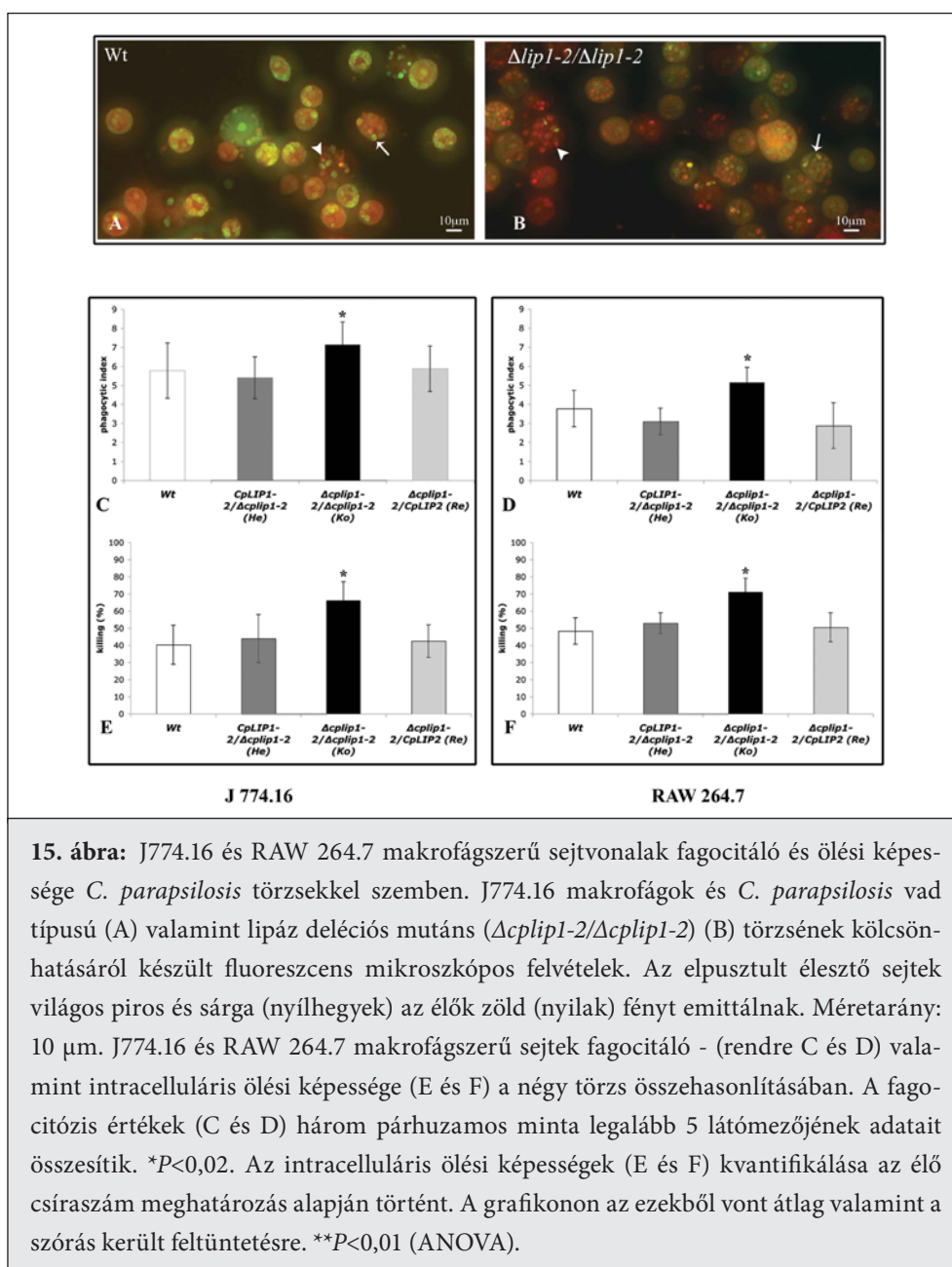


Az élesztősejtek makrofágok általi felvételének nagy felbontású optikai vizsgálatát scanning elektronmikroszkóp segítségével végeztük el. Az inkubáció első órájában fixált mintákon jól elkülöníthetők a fagocitózis kezdeti lépései: a felismerés/kapcsolódás, az élesztő körül az álláb képződése, majd annak közel teljes záródása (14. ábra).



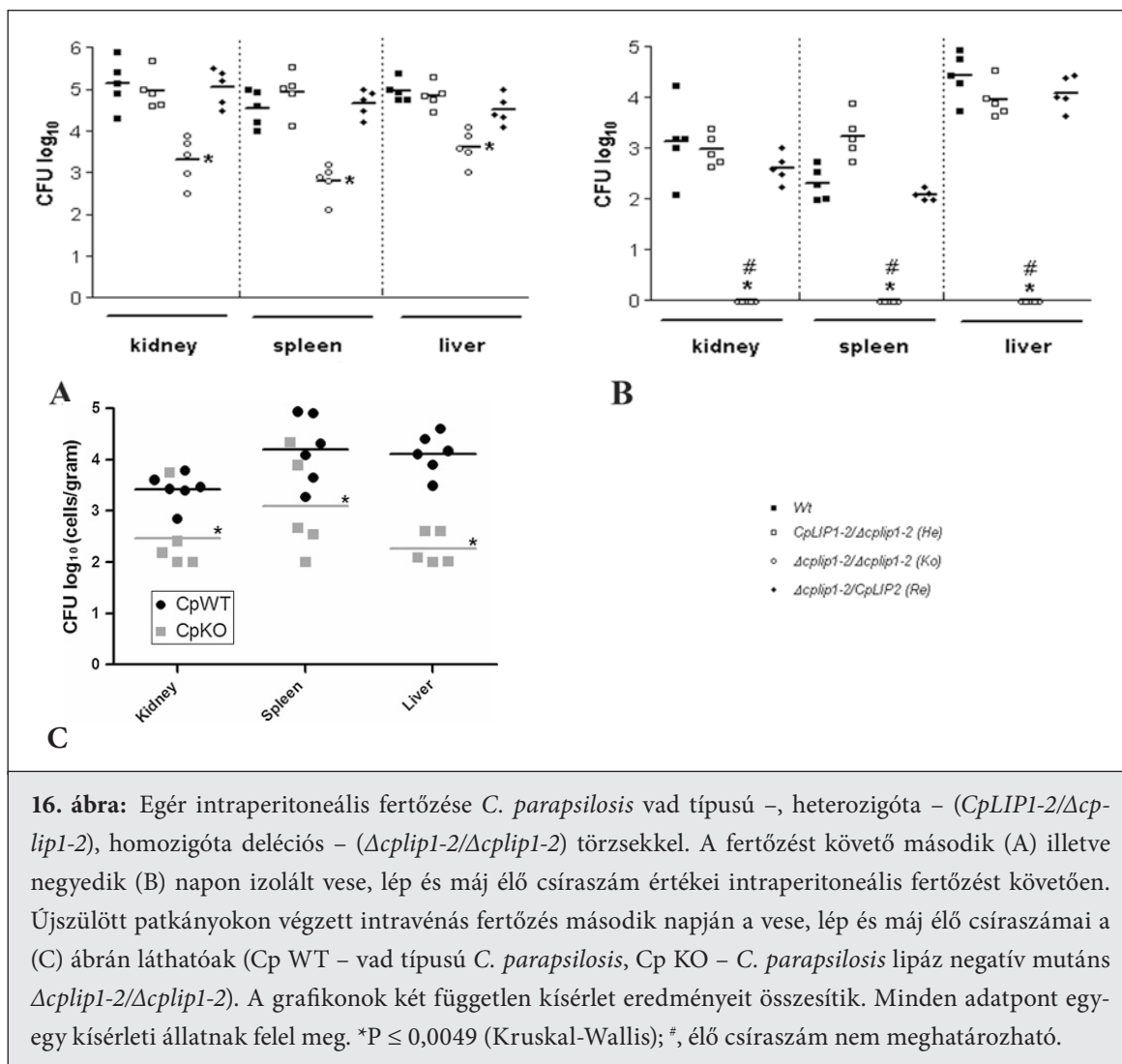
14. ábra: J774.2 egér makrofágok és *C. parapsilosis* GA1 vad típusú izolátum kölcsönhatásának eseményei egy órával a fertőzést követően. Az ábrán a felismerés (A), álláb képződés (B) és a fagoszóma záródás (C) momentumai láthatók. A fehér nyíl egy a záródó fagoszómában lévő élesztősejtet jelöl.

Miután bebizonyítottuk, hogy a módszer alkalmas a bekebelezés nyomonkövetésére, összehasonlítottuk a vad típusú és a lipáz deficiens sejtek J774.2 eger makrofágok általi bekebelezési hatékonyságát. Megállapítottuk, hogy a fertőzést követő 60. percben a lipáz termelésében hiányos sejteket hatékonyabban voltak képesek fagocitálni a falósejtek, mint a vad típusú élesztősejteket (15. Ábra C, E). A makrofágokon belüli mikrobaölési hatékonyság vizsgálatára az ún. akridin narancs/kristály ibolya festést alkalmaztuk. Ez egy olyan módszer, amelyet először Miliotis és munkatársai írtak le [155], majd a módszert laborunkban adaptáltuk a *C. parapsilosis* makrofágokon belüli túlélésének detektálására. Így egy könnyen és gyorsan kivitelezhető kvalitatív módszert fejlesztettünk ki, amelynek segítségével egyértelműen eldönthető, hogy élő vagy elpusztult sejtről van-e szó a makrofágon belül. Lényege, hogy a membrán permeábilis akridin narancs fluoreszcens festék mind az egyes (ssDNS), mind a kettős szálú DNS-hez (dsDNS) képes kötődni. Egy adott gerjesztő fényt használva az élő sejtek dsDNS-éhez kapcsolódó festék zöld, míg az elpusztult sejtekre utaló ssDNS-sel asszociált molekula piros színű fluoreszcens fényt emittál. A kristály ibolya festék membrán impermeábilis, és a makrofágokon kívül rekedt akridin narancs festett gombáktól származó emittált fény kioltására szolgál. Ennek megfelelően a mikroszkóp látómezőjében észlelt fluoreszcens fény csak olyan gombából származhat, amely gazda sejteken belül található. A szín alapján eldönthető, hogy élő vagy elpusztult sejtet látunk. A felvételeket az *in vitro* fertőzést követően 3 óra után készítettük. Azt tapasztaltuk, hogy az inkubáció korai szakaszában az élesztő sejtek felvétele megtörténik a J774.16 és RAW 264.7 rágcsáló makrofág sejtvonalak sejtjei által, és a vad típusú *C. parapsilosis* sejtek nagy része zöldre festődik, vagyis élő gombákról beszélhetünk. Ezzel szemben a lipáz termelésére képtelen gomba-sejtek jelentős része pirosra festődött, tehát elpusztult a fago-lizoszóma fúzióját követően (15. Ábra A-F).



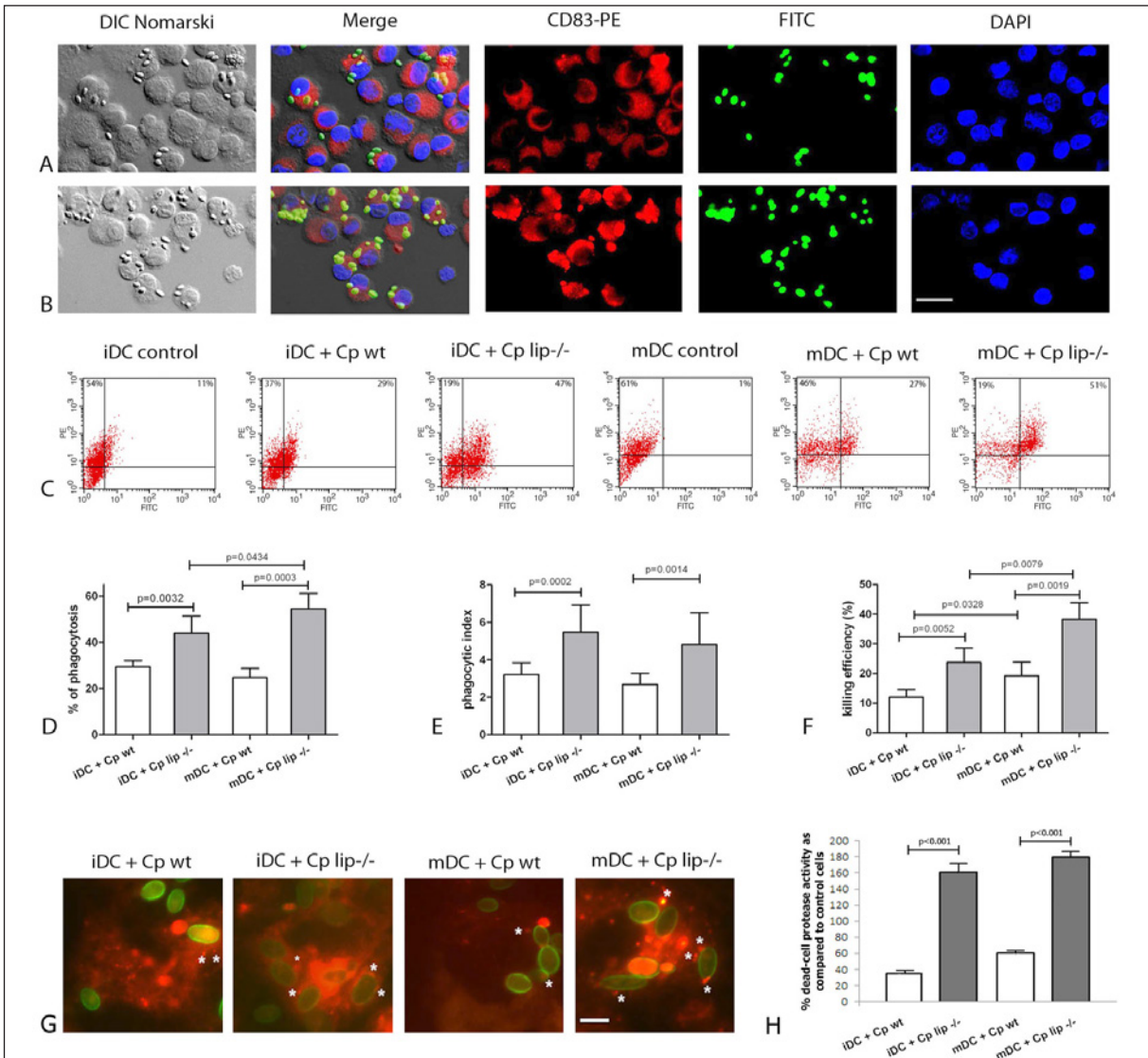
A sejtszintű és szövetszintű gazda-patogén interakciók vizsgálatát követően *in vivo* fertőzési modellek alkalmazásával is alátámasztottuk a szekretált lipázok virulenciában betöltött szerepét. Balb/c egerek vad típusú és lipáz deficiens *C. parapsilosis* sejtekkel történő intraperitoneális fertőzését követően, a deficiens törzs esetén szignifikánsan csökkent a gomba szerv kolonizáló képessége (csökkent CFU) mely a lépből, veséből és májból egyaránt kimutatható volt, továbbá hosszabb inkubációs idő után a lipázt nem termelő törzs gyorsabb eliminációja volt megfigyelhető a vad típusú törzshöz hasonlítva (16. ábra A-B). Mivel ismeretes, hogy a *C. parapsilosis* fertőzések előfordulását tekintve

az újszülötteknél, csecsemők körében a leggyakoribb [156], [157], ezért egy olyan fertőzési modellt is kidolgoztunk, mely az ezen korosztályt érintő fertőzéseket utánozza. Újszülött patkányok intravénás, intraperitoneális, valamint emésztőszervrendszerbe történő *C. parapsilosis* injektálását követően, a lipáz hiányos törzs esetében ismételt alacsonyabbnak bizonyult a gombák szerveket kolonizáló képessége a vad típusú törzssel szemben [158] (16. ábra C).



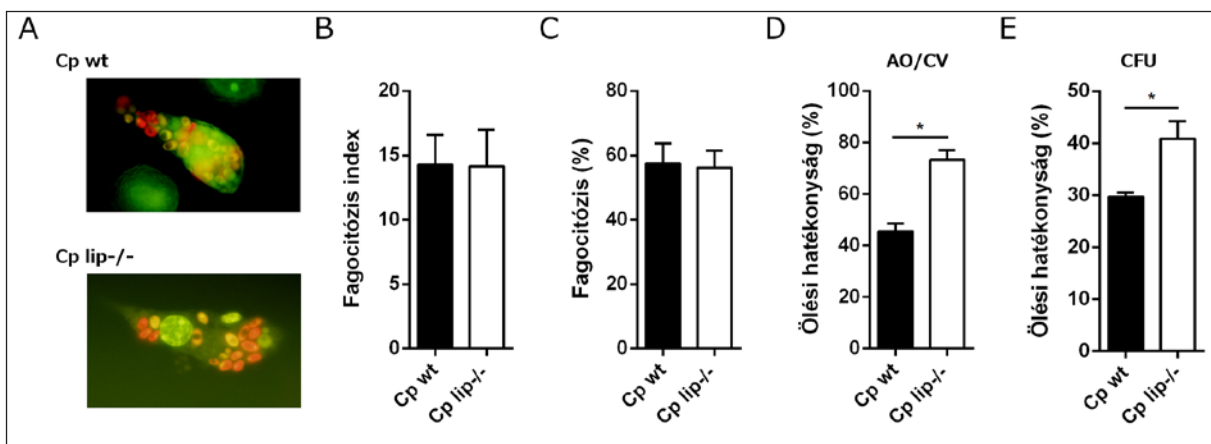
Az eddigi megfigyelések egyértelműen alátámasztották annak valószínűségét, hogy a szekretált gomba lipázok befolyásolják a virulenciát és a gomba patogenitás-ban szerepet játszó folyamatait. Miután a természetes és adaptív immunitás folyamataiban is kulcsszerepet játszanak a dendritikus sejtek, ezért a következőkben megvizsgáltuk a humán DC-k és a *C. parapsilosis* vad típusú és lipáz negatív mutáns

sejtek kölcsönhatásait. Megállapítottuk, hogy a rágcsáló makrofágokhoz hasonlóan a humán DC-k is képesek a *C. parapsilosis* sejtjeinek fagocitózisára (17. ábra), és a lipáz nem termelő sejteket hatékonyabban voltak képesek bekebelezni, mint a vad típusú élesztőket. Annak vizsgálatára, hogy a bekebelezést követően a DC sejtekben is aktiválódnak-e az antimikrobiális effektor mechanizmusok, megvizsgáltuk a humán éretlen (iDC) és érett (mDC) dendritikus sejtek gombaeliminációs képességét. Megállapítottuk egyrészt, hogy az érett DC sejtek hatékonyabb mikrobaölési képességgel rendelkeznek, másrészt igazoltuk a rágcsáló sejtvonalaknál tapasztalt jelenséget, miszerint a lipáz termelésének hiánya hatékonyabb ölést tesz lehetővé (17. ábra F). Mikroszkópos vizsgálattal igazoltuk, hogy a hatékonyabb eliminációs képesség hátterében a fago-lizoszóma hatékonyabb fúziója állhat, más szóval feltételeztük, hogy a szekretált lipázok gátolni képesek ezt a fontos antimikrobiális folyamatot (17. ábra G). Érdekes módon a DC sejtek károsodását vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a hatékonyabb fagocitózis és gombaölési képesség egyben mind az iDCk, mind az mDCk magasabb sejthalállal járt (17. ábra G). Ennek magyarázata lehet, hogy a hatékonyabb aktiváció egyik megnyilvánulása a megnövekvő veszély jel felszabadulás, amely összefüggésben lehet a sejthalállal, amely aztán közvetett módon a gyulladásos folyamatok beindításáért is felelőssé tehető. Éppen ezért vizsgálni tervezzük részletesebben a *C. parapsilosis* által indukált sejthalál típusokat, illetve azok szerepét a gyulladásos folyamatok elindításában. Erről részletesebben írok a további terveinket tárgyaló fejezetben.



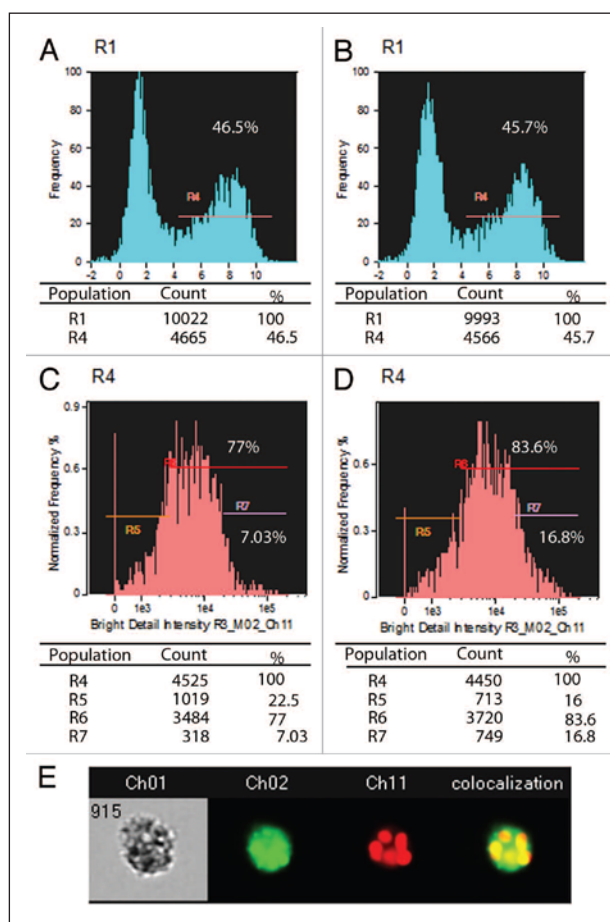
17. ábra: A *C. parapsilosis* funkcionálisan aktiválja a humán monocita eredetű dendritikus sejteket, amely megnövekedett fagocitáló és ölési képességet eredményez. Az A és B panel éretlen humán dendritikus sejtek és FITC-jelölt vad típusú (A) illetve lipáz deléciós mutáns ($\Delta cplip1-2/\Delta cplip1-2$) *C. parapsilosis* törzsek (B) interakcióját mutatja be a fertőzés első órájában. Méretarány: 20 μ m. A fagociták jelentős hányada pozitív a CD83 dendritikus sejt markerre. A vad típusú és lipáz deléciós mutáns törzsszel fertőzött éretlen és érett humán dendritikus sejtek fagocitáló képességének áramlási citometriás analízise a fertőzést követő első órában (C). A fagocitózis százalék (D) valamint a fagocita index (E) értékeinek összevetése az érett és éretlen dendritikus sejtek vonatkozásában. A grafikonok hat donortól származó dendritikus sejt populáció fertőzéséből és donoronként 20 látómező analízisének eredményét összesítik. Az éretlen és érett humán dendritikus sejtek ölési képességének vizsgálata *C. parapsilosis* vad típusú és lipáz deléciós mutáns törzsével való kölcsönhatás harmadik órájában (F) és interakciójuk fluoreszcens mikroszkópos felvételen a fertőzést követő első órában (G). A FITC-jelölt gombok zöld, a LysoTracker Red jelölt lizoszómák piros fluoreszcens fényt bocsátanak ki. A fehér csillagok a két forrás kolokalizációját jelölik. Méretarány: 5 μ m. A vad típusú és mutáns élesztő gazda sejtekre gyakorolt károsító hatásának vizsgálata a felülúszó proteáz aktivitásának mérésével az interakció első órájában (H). A grafikon két donor sejtpopulációjának átlagát ábrázolja. A D, E és H grafikonokon az átlag szórása került feltüntetésre. DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole, wt – wild type (vad típus) lip^{-/-} lipáz deléciós mutáns, FITC – Fluoreszcein-izotiocianát.

A dendritikus sejtek mellett a makrofágok azok a celluláris komponensek, amelyek a patogének elleni immunválasz meghatározó szereplői, ezért megvizsgáltuk, hogy a primer humán makrofágok milyen mértékben képesek fagocitálni és eliminálni a vad típusú, illetve a lipáz deficiens *C. parapsilosis* törzseket. A törzseket 3 óráig ko-inkubáltuk a makrofágokkal, majd akridin narancs/kristály ibolya festést követően fluoreszcens mikroszkópia segítségével meghatároztuk a bekebelezett és elpusztított *Candida* sejtek számát. Azt tapasztaltuk, hogy a makrofágok hasonló hatékonysággal fagocitálták a vad típusú és lip^{-/-} *C. parapsilosis* sejteket, ellentétben a rágcsáló sejtvonalnál és humán DC-nél tapasztaltakkal, azonban ölési hatékonyságuk hasonlóan az eddigi eredményeinkhez, magasabb volt a lipáz deficiens törzzsel szemben (18. ábra). Az ölési hatékonyságot CFU (kolóniaképző egység)-meghatározással is megerősítettük *in vitro* fertőzést követően. A fagocitózist a *Candida* sejtek fluoreszcens jelölését követően áramlási citometria segítségével is megvizsgáltuk, azonban azt tapasztaltuk, hogy így sem volt különbség a fagocitáló makrofág populáció nagyságában a két törzzsel történő fertőzés esetén. Természetesen nem zárhatjuk ki, hogy a fagocitózis iniciációjában eltérés lehet, ilyen irányú kísérleteink jelenleg is folyamatban vannak.



18. ábra: Fagocitózis és ölési hatékonyság vizsgálata primer humán makrofágokban *C. parapsilosis* wt és lip^{-/-} törzsekkel történő fertőzést követően. (A) Wt vagy lip^{-/-} *C. parapsilosis*-szal fertőzött primer humán makrofágok akridin narancs/kristály ibolya festést követően (fluoreszcens mikroszkópia, reprezentatív ábrák). (B,D) A primer humán makrofágokat 3 óráig inkubáltuk Wt vagy lip^{-/-} *C. parapsilosis*-szal, majd akridin narancs/kristály ibolya festést követően meghatároztuk a fagocitált (B), illetve elölt (D) *Candida* sejtek számát. (C) A primer humán makrofágokat 2 óráig inkubáltuk fluoreszcensen jelölt wt vagy lip^{-/-} *C. parapsilosis*-szal, majd áramlási citometria segítségével meghatároztuk a fagocitáló makrofág populáció nagyságát. (E) A primer humán makrofágokat 3 óráig inkubáltuk Wt vagy lip^{-/-} *C. parapsilosis*-szal, majd CFU számolás alapján meghatároztuk az ölési hatékonyságot. * $p < 0,05$ (páros t-próba).

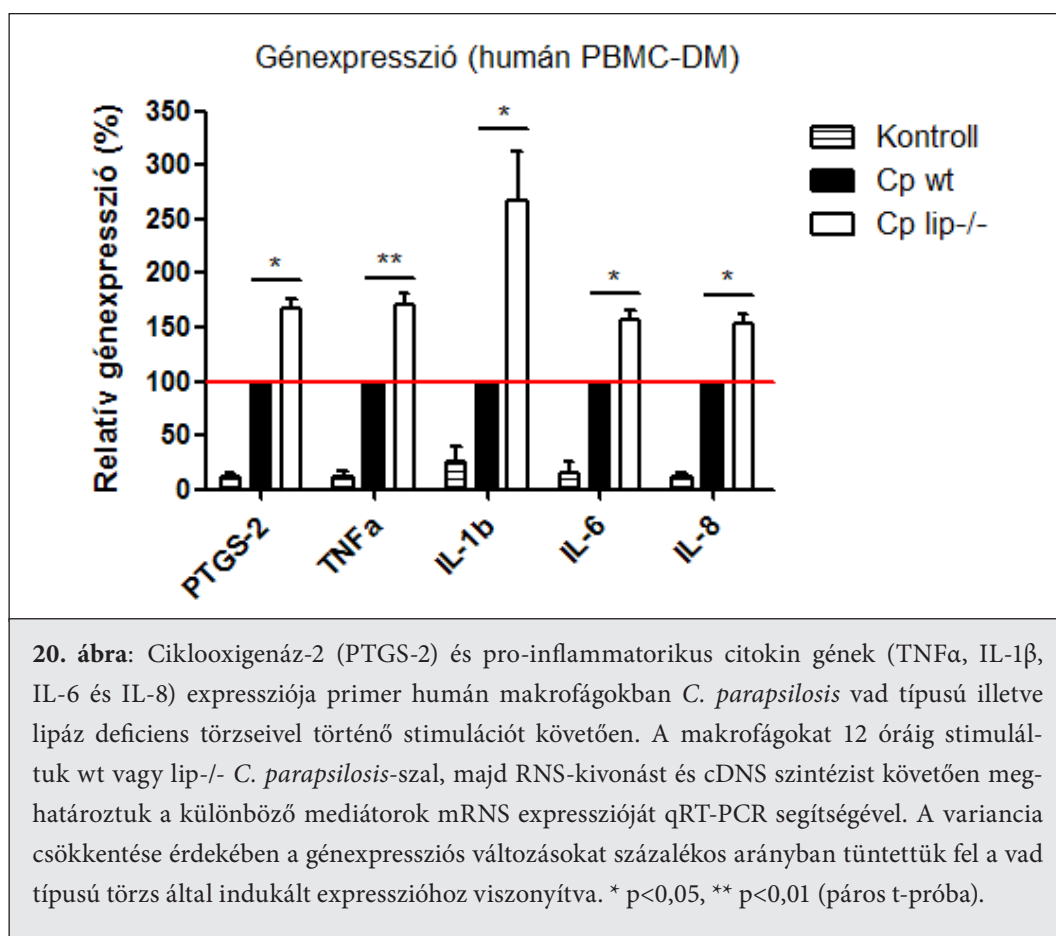
A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a *C. parapsilosis* lipáz hiánya hogyan befolyásolja a fago-lizoszóma fúziót a makrofágokban. Ebben a kísérletsorozatban a *Candida* sejteket Alexa Fluor 647 fluoreszcens festékkel, a makrofágokat LysoTracker Green festék segítségével jelöltük, majd ún. „kvantitatív imaging” segítségével meghatároztuk a fagoszóma-lizoszóma ko-lokalizáció intenzitását. Ez a módszer kombinálja az áramlási citometria nagy áteresztőképességét a mikroszkópia részletgazdagságával. Ezáltal alkalmazható például a fagocitózist követő fago-lizoszóma ko-lokalizáció követésére is. A módszer alkalmazása során azt tapasztaltuk, hogy a fagoszóma-lizoszóma ko-lokalizáció nagyobb mértékű volt a makrofágokban a lipáz mutáns törzs fagocitózisát követően, a vad típusú törzshöz viszonyítva (19. ábra). Ezek az eredmények megerősítették a humán DC sejteknél tapasztaltakat, vagyis hogy a *C. parapsilosis* lipáz képes késleltetni a lizoszóma érését a fagocitákon belül, ami csökkenti a makrofágok ölési hatékonyságát az élesztősejtekkel szemben.



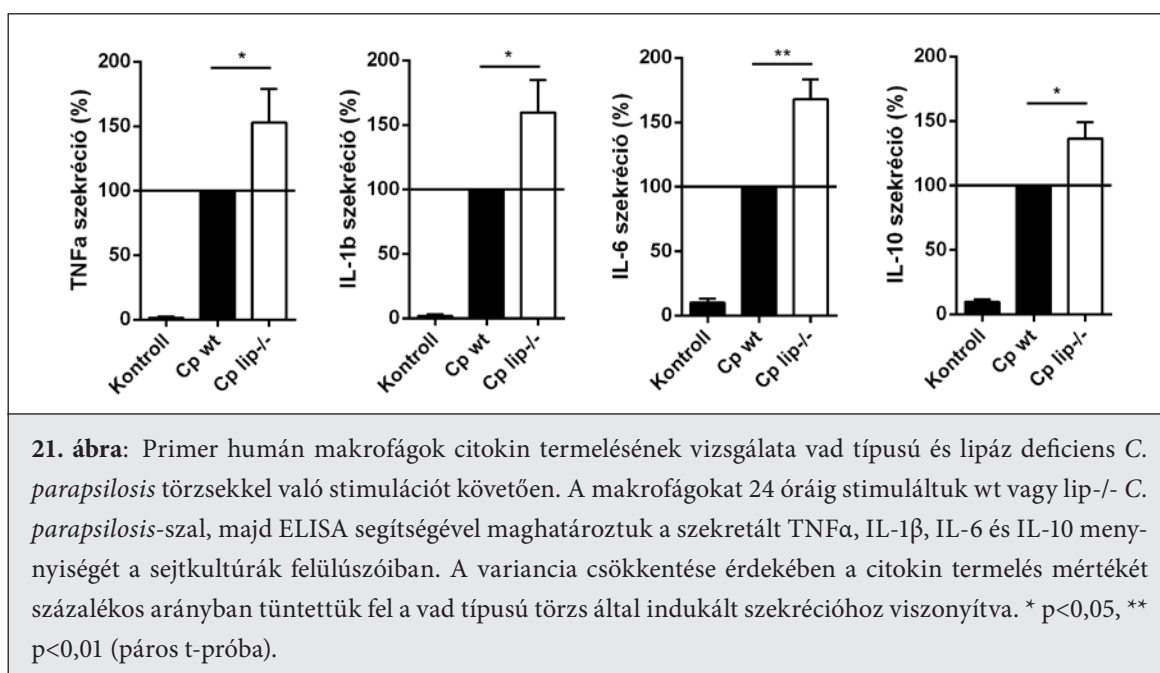
19. ábra: Wt és lip^{-/-} *C. parapsilosis* által indukált fagoszóma-lizoszóma ko-lokalizáció vizsgálata „kvantitatív imaging” analízis segítségével. A primer humán makrofágokat 2 óráig inkubáltuk Alexa Fluor 647 festékkel jelölt wt vagy lip^{-/-} *C. parapsilosis*-szal, majd LysoTracker Green festékkel jelöltük és FlowSight áramlási citométer segítségével analizáltuk. (A-B) Vad típusú (A) és lipáz deficiens (B) *C. parapsilosis* törzsek fagocitózisa. R1: teljes makrofág populáció, R4: Alexa Fluor 647 fluoreszcencia alapján meghatározott fagocitáló makrofág populáció. (C-D) Fagoszóma-lizoszóma ko-lokalizáció wt (C) vagy lip^{-/-} (D) *C. parapsilosis*-szal fertőzött humán makrofágokban. R5: alacsony szintű ko-lokalizáció, R6: közepes vagy magas szintű ko-lokalizáció, R7: magas szintű ko-lokalizáció. (E) Reprezentatív ábra egy analizált makrofágról a „kvantitatív imaging” során. Ch01: látható fény, Ch02: zöld fluoreszcens csatorna (LysoTracker Green), Ch11: piros fluoreszcens csatorna (Alexa Fluor 647).

A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a vad típusú és lipáz deficiens *C. parapsilosis* törzsek hogyan indukálják a gyulladásos mediátorok expresszióját humán

makrofágokban. A humán primer makrofágokat 3, 6, 12 vagy 24 óráig stimuláltuk vad típusú vagy lipáz deficines *C. parapsilosis*-szal, majd megvizsgáltuk bizonyos gyulladásos mediátorok génexpressziós változásait a gazdasejtekben. Eredményeink azt mutatták, hogy a ciklooxygenáz-2 (PTGS-2), illetve a TNF α , IL-1 β , IL-6 valamint IL-8 pro-inflammatorikus citokin gének expressziója primer humán makrofágokban szignifikánsan megemelkedett a lipáz deficines *C. parapsilosis* törzzsel való stimulációt követően, a vad típusú törzzsel való stimulációhoz viszonyítva, ami 12 óra után volt a legkifejezettebb (20. Ábra).



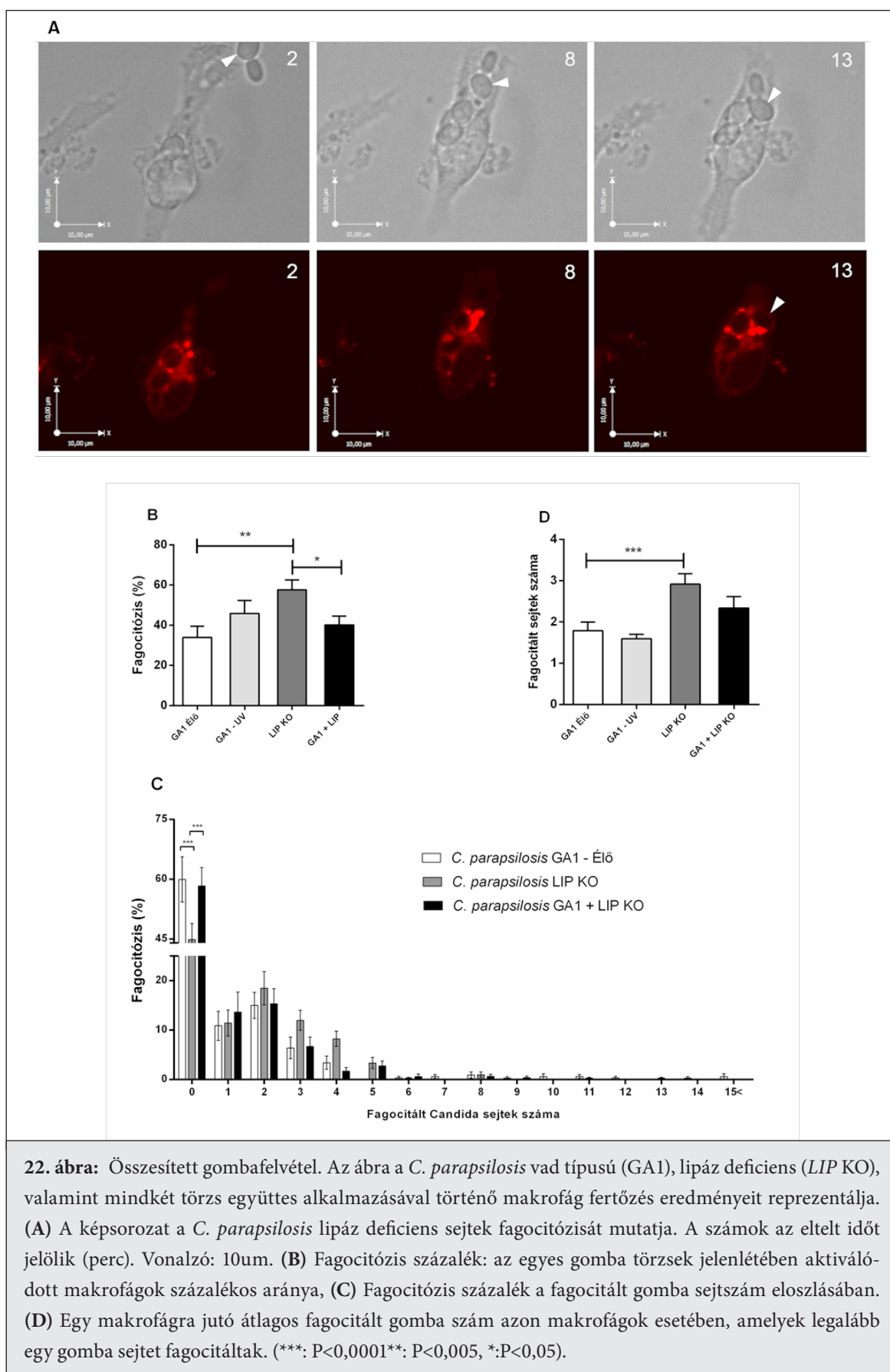
A makrofágok citokin-szekréciójának vizsgálatához a sejteket 24 óráig stimuláltuk wt vagy lip-/- *C. parapsilosis*-szal, majd meghatároztuk a bizonyos szekretált citokinek koncentrációját a sejtkultúrák felülúszóiban. Azt tapasztaltuk, hogy a primer humán makrofágok emelkedett citokin-termeléssel reagáltak a lipáz deficines *C. parapsilosis* törzzsel való stimulációra a vad típusú törzzsel való stimulációhoz képest, ami összhangban van a mért génexpressziós változásokkal (21. ábra).



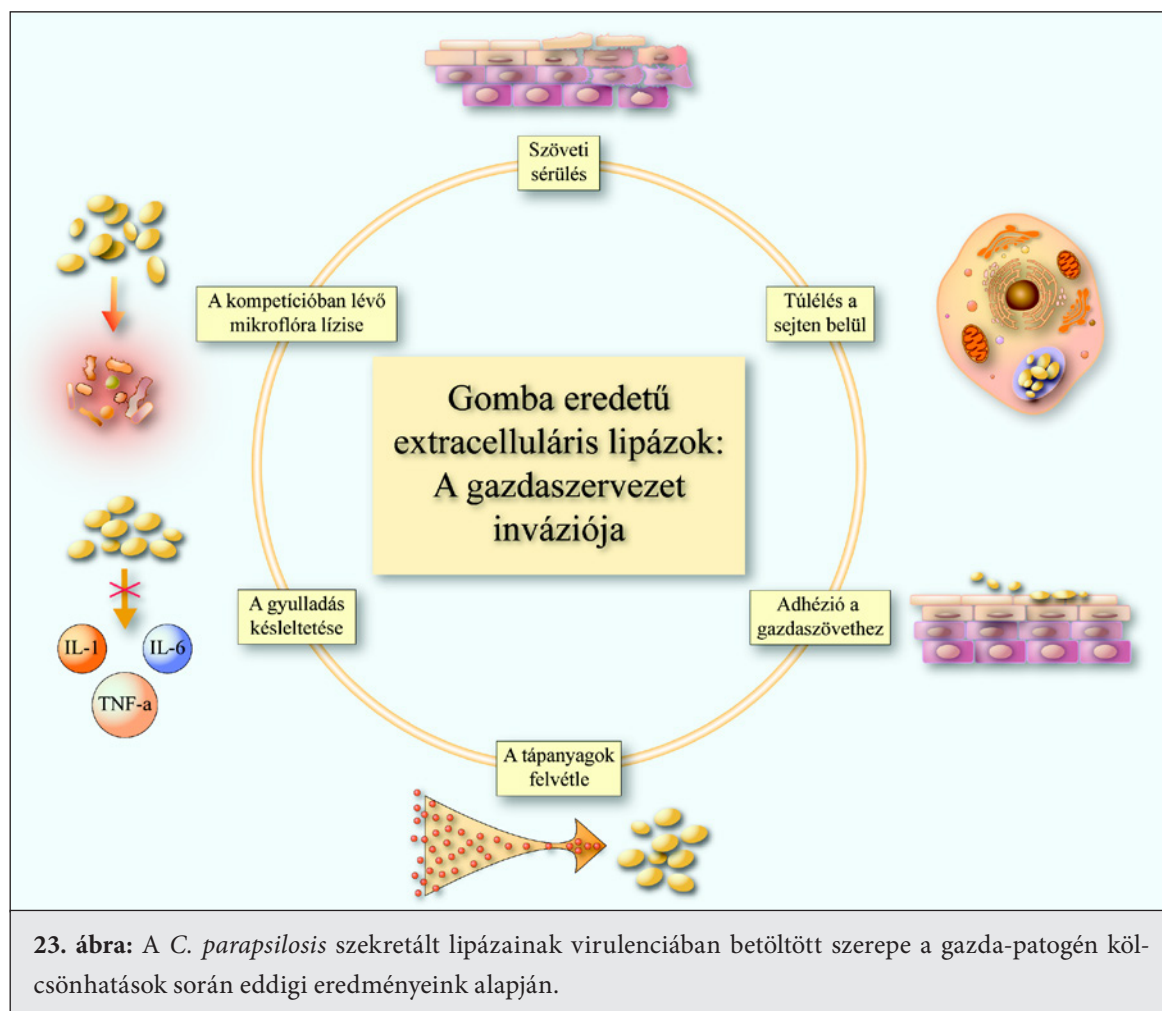
További kísérleteink során megvizsgáltuk a frissen izolált mononukleáris sejtek (PBMC) citokin termelését is wt és lip^{-/-} *C. parapsilosis*-szal történő stimulációt követően. Ehhez a mononukleáris sejteket wt és lip^{-/-} *C. parapsilosis* törzsekkel fertőztük és 6, 12, 24, illetve 48 órán keresztül inkubáltuk. Az inkubációs idő elteltével a sejt kultúrák felülúszóiban meghatároztuk a különböző citokinek koncentrációját ELISA segítségével. Azt tapasztaltuk, hogy – ellentétben a makrofágok esetén tapasztalt emelkedett citokin termeléssel a lip^{-/-} törzzsel történő stimuláció hatására – a mononukleáris sejtek azonos mennyiségű TNFα-t és IL-1β-t termeltek a wt és a lip^{-/-} *C. parapsilosis* törzzsel történő stimulációt követően (nem mutatott adatok). A citokin termelés nem változott a különböző időpontokban, illetve különböző mennyiségű *Candida* sejt adását követően sem. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a *C. parapsilosis* által termelt lipázok valamilyen fagocita-specifikus molekulával léphetnek kapcsolatba, hiszen hasonló jelenséget tapasztaltunk a humán DC sejtek esetében is. Miután egyértelműnek tűnt, hogy a fagocitózisra és a fagocita sejtekre gyakorol hatást a gombák szekretált lipáza, ezért a továbbiakban ezekre a sejt komponensekre kifejtett celluláris hatásokat vizsgáltunk.

7.3 Celluláris interakció *C. parapsilosis* és gazdasejtek között

Mivel a szekretált lipázok virulenciában játszott szerepe celluláris szinten számos ponton nyert bizonyítást, a továbbiakban tanulmányoztuk, hogy azok hogyan befolyásolják a fagocitózis folyamatának egyes stádiumait. Elvégeztük tehát a törzsek makrofágok általi fagocitózisának összehasonlítását élő sejtes videó mikroszkópia segítségével [159]. A kísérletek során a *C. parapsilosis* vad típusú, valamint lipáz deficiens törzsek egyenkénti összehasonlító vizsgálatán kívül alkalmaztunk ko-infekciós körülményeket is annak érdekében, hogy kiderítsük, komplementálható-e a lipázok hatása, ha a vad típusú sejtek jelen vannak. Kísérleti eredményeink arra utaltak, hogy a szekretált lipázok hiánya szignifikánsan megemelkedett fagocita aktivációhoz vezetett, mely során több fagocita sejt egyszerre több gombasejt felvételére volt képes (22. ábra B-D). Ezzel egyidőben, magasabb makrofág migrációs sebesség volt észlelhető a mutáns sejtek jelenlétében, mint a vad típusú sejtek esetében, amely arra utal, hogy a szekretált lipázok hiányában gyorsabban következik be a gomba felismerése (22. Ábra). A gazdasejtek károsodását tekintve, egy korábbi tanulmányunkhoz hasonlóan [160], itt sem észleltünk különbséget az egyes törzsek összehasonlításakor. Ko-infekciós kísérletekben arra kerestük a választ, hogy a vad típusú sejtek lipáz termelése képes-e kompenzálni az előbbieken vázolt celluláris funkciókban bekövetkezett változásokat. Eredményeink azt mutatták, hogy amikor a vad típusú sejtek is jelen vannak, akkor a lipáz deficiens fenotípus részlegesen kompenzálódik (22. ábra B-D), mely továbbra is alátámasztja a szekretált lipázok gazda-patogén interakcióban betöltött szerepét.



Mindezen eredmények alátámasztják a feltevést, miszerint a gomba szekretált lipázai a gazda immunválaszát mind celluláris, mind pedig humorális úton represszálják, ezáltal mintegy védő funkciót biztosítva a gazda immunválaszával szemben.



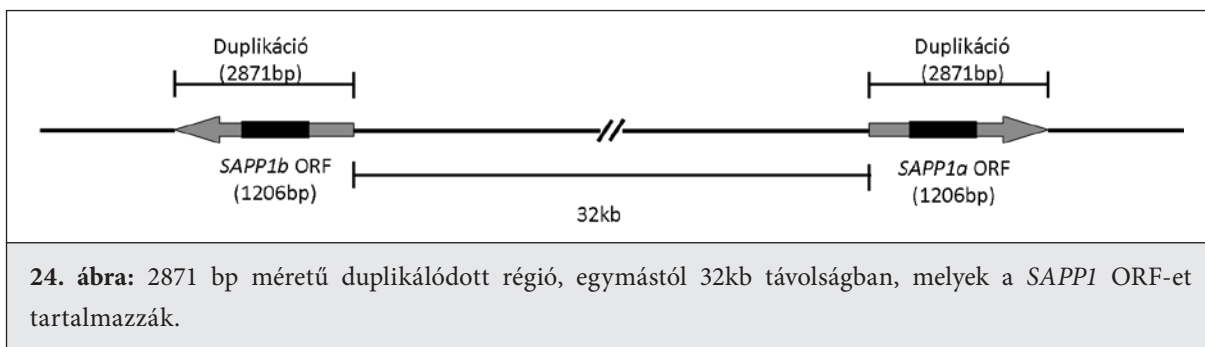
Amint az a bevezetőben is említésre került, korábban leírták, hogy a *C. albicans* és *C. parapsilosis* által termelt lipáz enzimek aktivitásának gátlása következtében jelentősen csökken a gombák szövetkárosító hatása [161]. Eredményeink arra utalnak, hogy a *C. parapsilosis* által termelt lipáznak jelentős szerepe van a gazda-patogén interakciók során. Egyrészt hozzájárulnak a gazda szöveteiben a gomba tápanyaghoz jutásához. Bizonyítottuk, hogy magas lipid tartalmú tápközegben nélkülözhetetlenek a mikroba növekedéséhez, amely részben magyarázatot adhat a faj gyakori kórházi előfordulására. Bizonyítottuk, hogy szerepük lehet a gazdasejtekhez történő adhézióban, biofilm képzésben és az immunsejtek károsításában is. Megállapítottuk, hogy a fagocita sejteken belüli túlélésben is szerepet játszhatnak a lipázok, a fago-lizoszóma fúzió gátlásával.

Kimutattuk továbbá, hogy a szekretált extracelluláris lipázoknak gyulladáscsökkentő hatása van, amely kedvező lehet a patogén számára a fertőzés folyamán, mivel a hatékony gyulladásos válasz nélkülözhetetlen a patogén eliminációjához.

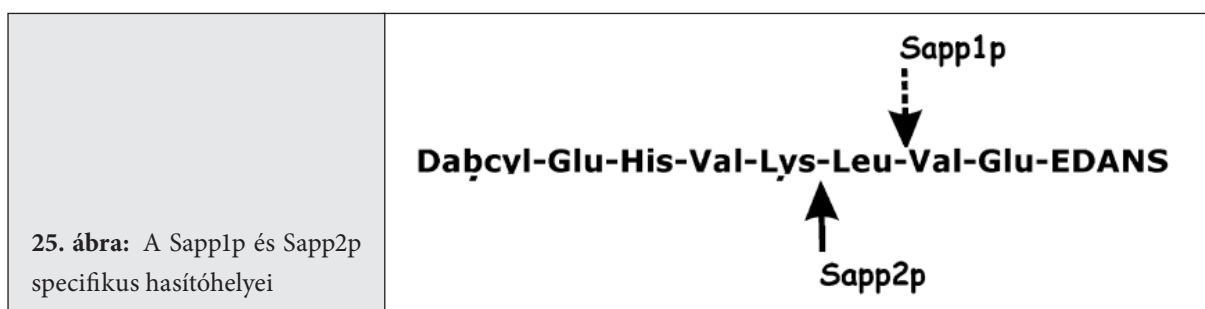
7.4 Szekretált proteinázok szerepének vizsgálata a *C. parapsilosis* patomechanizmusaiban

A lipázok szerepének tisztázását követően megvizsgáltuk, hogy a másik fő szekretált hidrolitikus enzimes családnak, az aszpartil proteinázoknak milyen szerepe lehet a gazda-patogén kölcsönhatások során. A *C. albicans* tíz szekretált aszpartil proteináz (*SAP1-10*) génnel rendelkezik, amelyek által kódolt fehérjék szerepe intenzíven tanulmányozott. Szerepet játszanak a szöveti megtapadás folyamatában, képesek a szöveti integritás megbontására, valamint a komplement rendszer fehérjéit is képesek bontani, ezáltal elősegítik a fertőzés terjedését. *C. parapsilosis* esetén három ortológ aszpartil proteinázt kódoló gént írtak le, ezek a *SAPP1*, *SAPP2*, és a *SAPP3*. Ellentétben a *C. albicans*-szal, *C. parapsilosis* esetén ezek a proteázok kevésbé tanulmányozottak mind a gazda-patogén kölcsönhatás tekintetében, mind a gomba virulenciájában betöltött szerepüket illetően. Ezidáig csupán a *Sapp1* valamint a *Sapp2* enzimek azok, melyek érése és katalitikus tulajdonságai ismertek. Mindkét fehérje preproenzim formában szintetizálódik, melyeket egy szignál peptidáz hasít, majd szekréció előtt egy újabb hasításon esnek át egy membrán kötött fehérje, a Kex-2 által. Kimutatták, hogy a két enzim közül a szekretált *Sapp1* mennyisége egy nagyságrenddel nagyobb a *Sapp2*-vel összevetve, valamint szubsztrátspecifitása és az enzim aktivitása is jóval nagyobb.

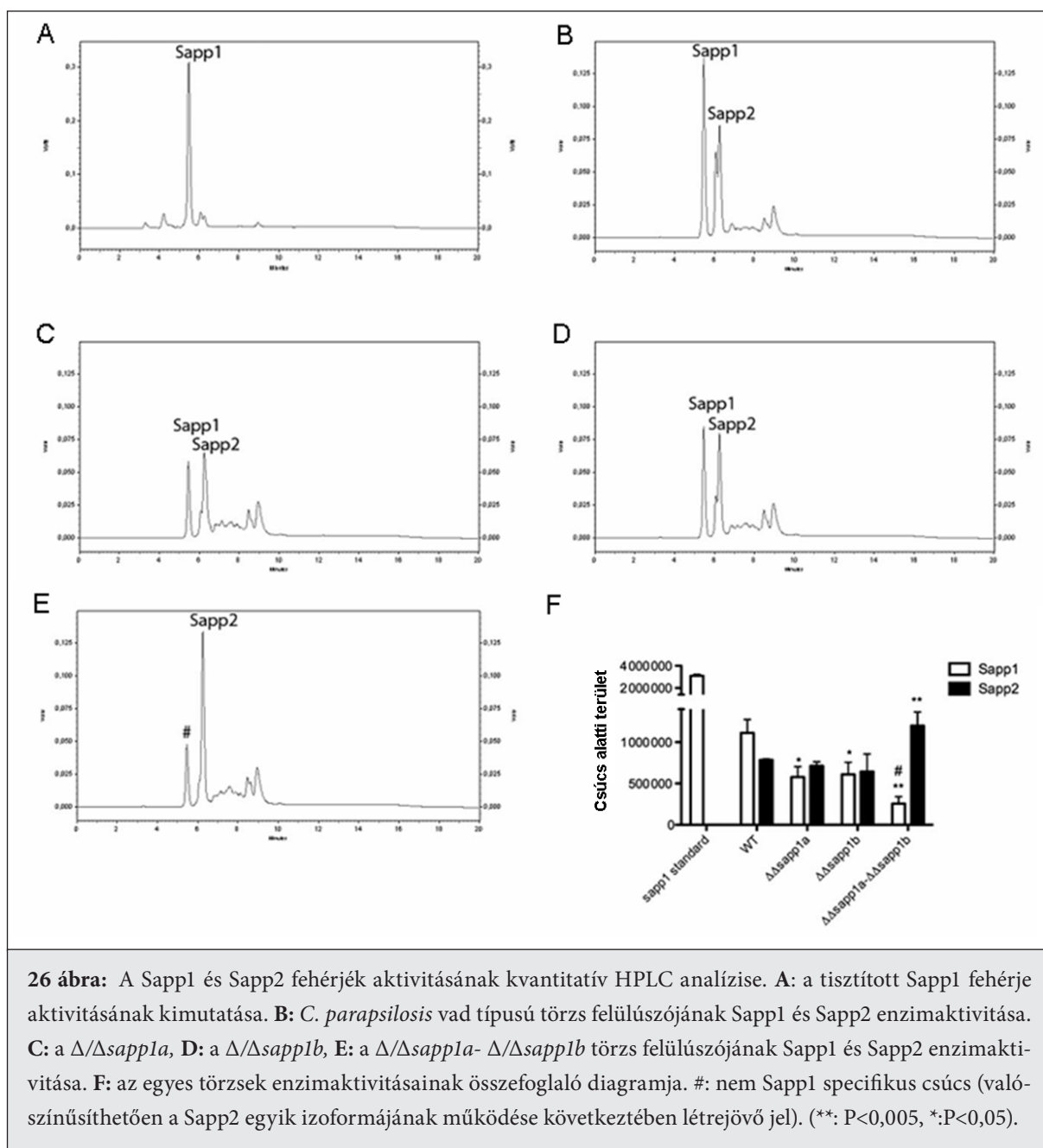
Prof. Toni Gabaldón munkacsoportjával kollaborációban azonosítottunk két, identikus 2871bp méretű genomi szakaszt, egymástól 32kb távolságra, amely egy-egy kópiában tartalmazta a *SAPP1* ORF-et (1206bp). A duplikálódott szakaszban található *SAPP1* géneket *SAPP1a* és *SAPP1b* néven különítettük el egymástól (24. ábra).



Ahhoz, hogy a Sapp1 fehérje virulenciában betöltött szerepét vizsgáljuk, a *C. parapsi-**lo**sis* GA1 jelű klinikai izolátumát, mint vad típusú törzset felhasználva a *SAPP1* gének négy alléljának delécióját hajtottuk végre a már ismertetett módszerrel. Így előállítottunk homozigóta Δ/Δ *sapp1a*, Δ/Δ *sapp1b* egyszeres és Δ/Δ *sapp1a*- Δ/Δ *sapp1b* dupla deléciós mutáns törzseket. A mutánsok sikeres létrehozása után fehérjeszinten vizsgáltuk a vad típusú, valamint a mutáns törzsek Sapp1 és Sapp2 proteinjeinek termelését. Fluoreszcens szubsztrátként Dabcyl-Glu-His-Val-Lys-Leu-Val-Glu-EDANS (5mg/ml, DMSO-ban oldva) szolgált. A szubsztrát specifikus hasítóhelyeket tartalmaz, melyeket a Sapp1p és a Sapp2p képes felismerni és hasítani (25. ábra).



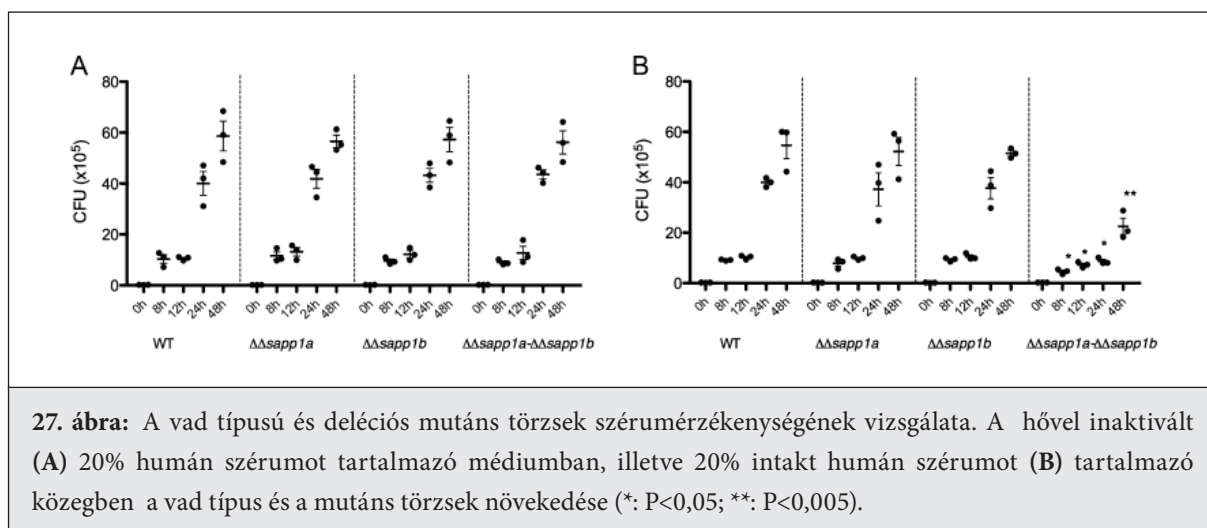
Kontroll reakcióként tisztított Sapp1p fehérjét tartalmazó elegyet mértünk össze. A mintákat ezután fluoreszcens detektorral felszerelt HPLC készülékkel vizsgáltuk (phenomenex prodigy C18 oszlop) (26. ábra).



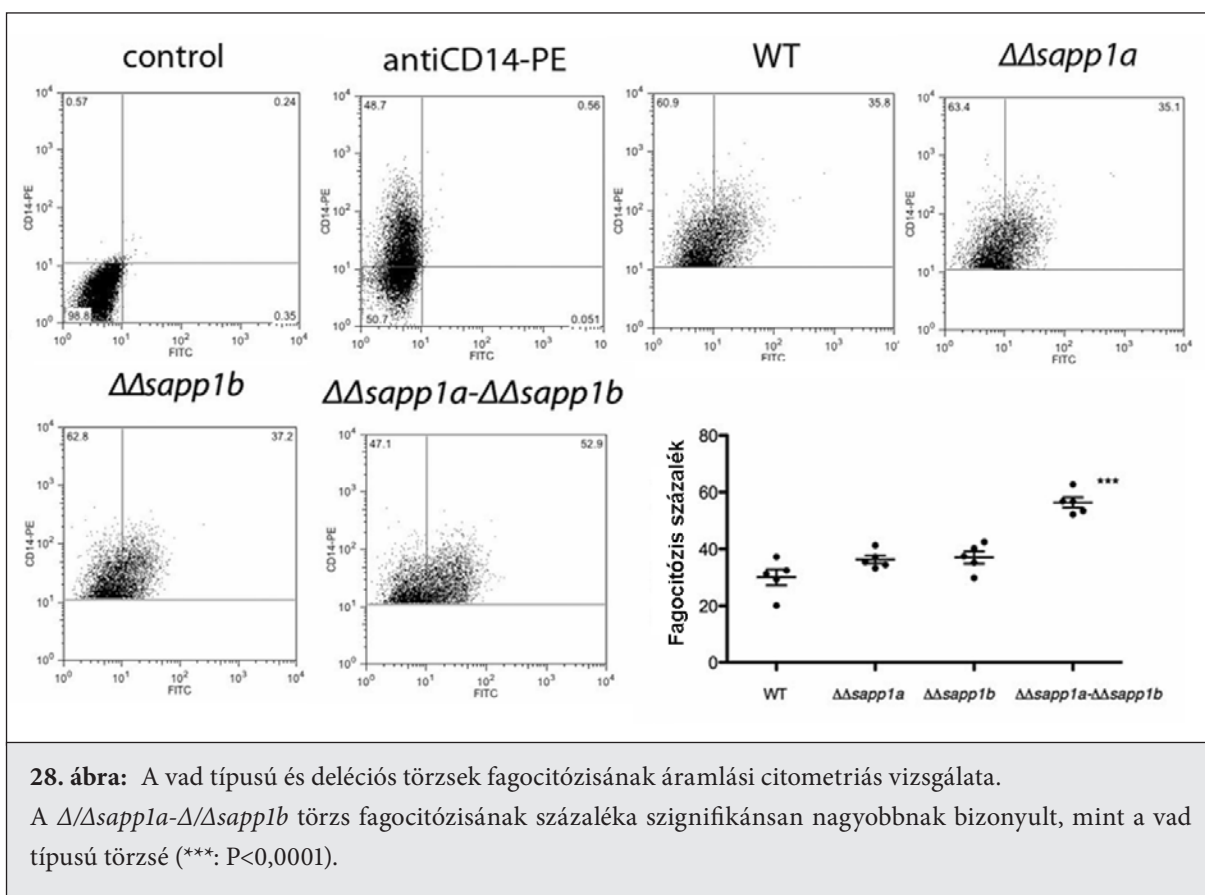
26 ábra: A Sapp1 és Sapp2 fehérjék aktivitásának kvantitatív HPLC analízise. **A:** a tisztított Sapp1 fehérje aktivitásának kimutatása. **B:** *C. parapsilosis* vad típusú törzs felülúszójának Sapp1 és Sapp2 enzimaktivitása. **C:** a Δ /sapp1a, **D:** a Δ /sapp1b, **E:** a Δ /sapp1a- Δ /sapp1b törzs felülúszójának Sapp1 és Sapp2 enzimaktivitása. **F:** az egyes törzsek enzimaktivitásainak összefoglaló diagramja. #: nem Sapp1 specifikus csúcs (valószínűsíthetően a Sapp2 egyik izoformájának működése következtében létrejövő jel). (**: $P < 0,005$, *: $P < 0,05$).

A két fehérje HPLC analízise arra utal, hogy a *SAPP1* gén elvesztésével a *SAPP2* gén expressziós szintje megemelkedik. Korábbi tanulmányok megmutatták, hogy a dupla deléziós mutáns törzsben megfigyelhető Sapp1p helyén lévő csúcs nem a Sapp1p hasításának következménye (Merkerova et al. 2006). A mutánsok proteináz aktivitásának vizsgálata után munkánk további részében a törzsek gazda-patogén interakcióit elemeztük. Meghatároztuk az egyes törzsek szérumerzékenységét, melyhez 20% humán szérumot alkalmaztunk, hővel inaktivált és nem inaktivált formában, PBS-ben hígítva.

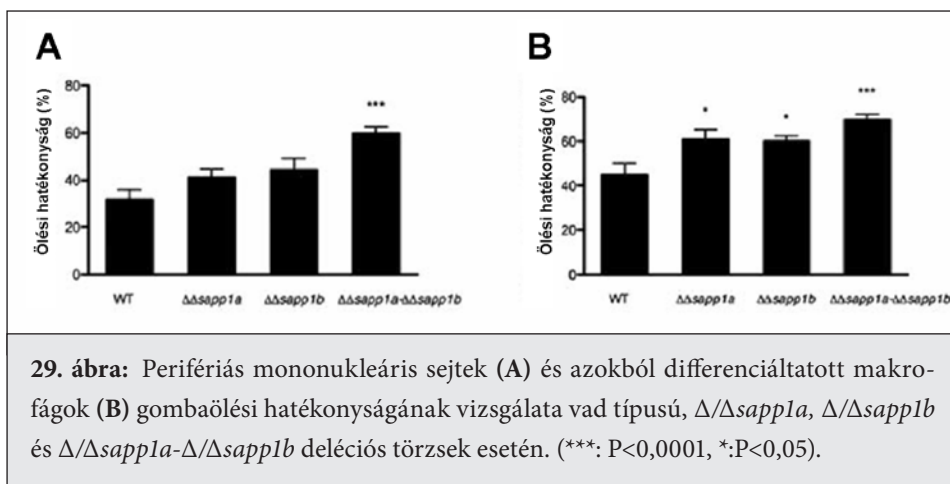
A vad típusú és mutáns törzsekből 3×10^4 /ml sejtszámot alkalmaztunk kiindulásnak, majd 8, 12, 24 és 48 óra elteltével meghatároztuk az élő sejtek számát. (27. ábra). Míg a hővel inaktivált, 20% humán szérumot tartalmazó kultúrák esetén minden törzs hasonló mértékű növekedésre volt képes, addig a 20% intakt humán szérumot tartalmazó médium esetén a $\Delta/\Delta sapp1a$ - $\Delta/\Delta sapp1b$ dupla deléciós mutáns törzs növekedése mind 24 óra, mind 48 óra inkubáció után szignifikáns csökkenést mutatott a vad típusú törzshöz képest. A $\Delta/\Delta sapp1a$ és $\Delta/\Delta sapp1b$ törzsek és a vad típusú törzs növekedési rátája közt nem mutatkozott eltérés (27. ábra). A dupla deléciós mutáns törzs csökkent növekedési rátája arra enged következtetni, hogy a Sapp1 fehérjének szerepe van a szérumban található komplement komponensek és immunfehérjék bontásában.



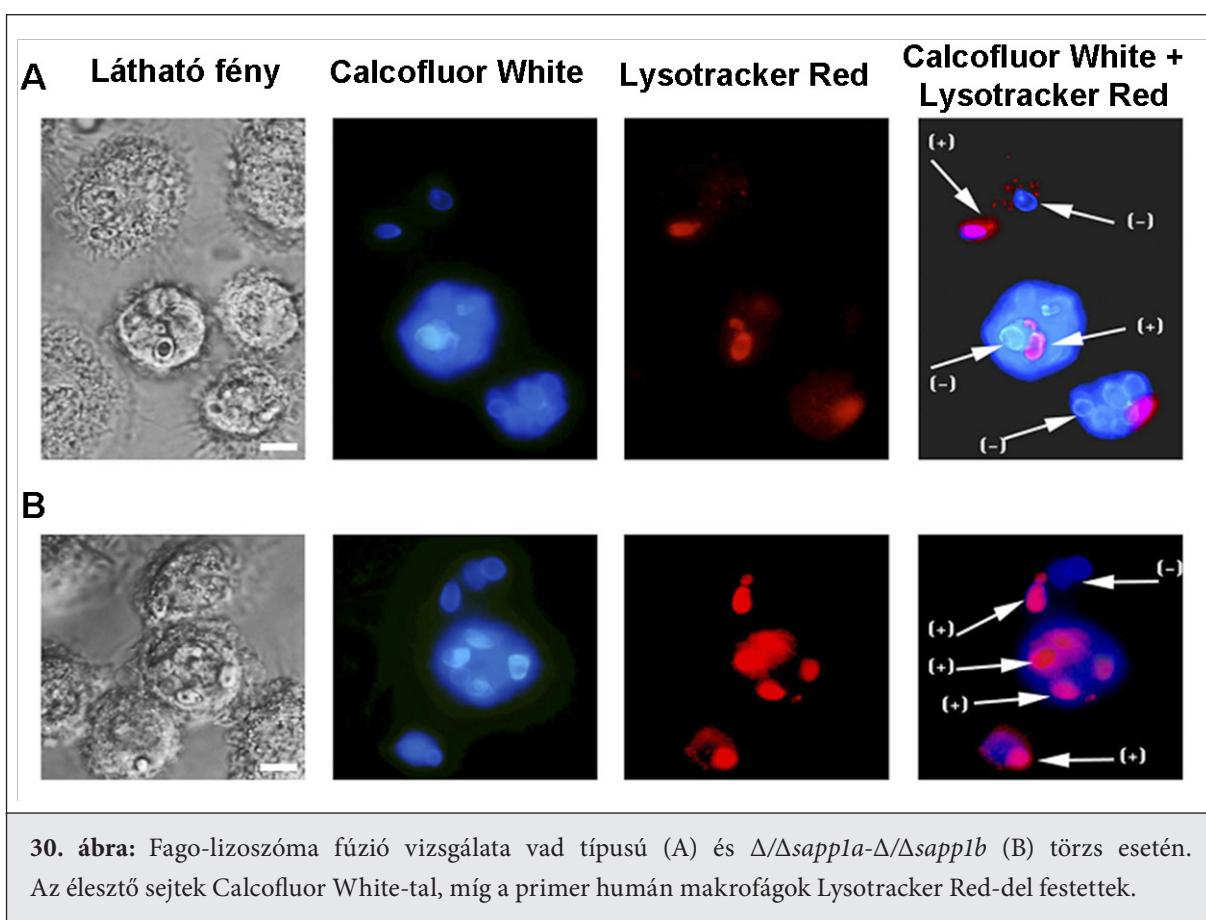
A lipázok esetében láttuk, hogy a szekretált enzimek hathatnak a makrofágok anti-mikrobiális funkcióira. Ezért a proteináz mutánsok esetében is vizsgáltuk a vad típusú, valamint deléciós mutáns törzsek primer humán makrofágok (PBMC-DM sejtek) általi fagocitózisának és mikroba eliminációjának hatékonyságát. A vad típusú és $\Delta/\Delta sapp1a$, $\Delta/\Delta sapp1b$ és $\Delta/\Delta sapp1a$ - $\Delta/\Delta sapp1b$ törzseket fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) festettük, míg a makrofág sejtek jelölése CD14-fikoeritrin (PE) antitesttel történt. A mérés során a vad típusú törzshöz képest a $\Delta/\Delta sapp1a$ - $\Delta/\Delta sapp1b$ dupla deléciós törzs sejtjeit a primer humán makrofágok hatékonyabban fagocitálták (28. ábra).



A gombasejtek PBMC és PBMC-DM sejtek általi gombaölési hatékonyságát vizsgálva a PBMC sejtek szignifikánsan hatékonyabban voltak képesek a $\Delta/\Delta sapp1a-\Delta/\Delta sapp1b$ dupla deléciós mutáns törzs elpusztítására (29. ábra A), amely jelenség a differenciáltot PBMC-DM sejtek esetén a $\Delta/\Delta sapp1a$ és a $\Delta/\Delta sapp1b$ törzseknél is megfigyelhető volt (29. ábra B).

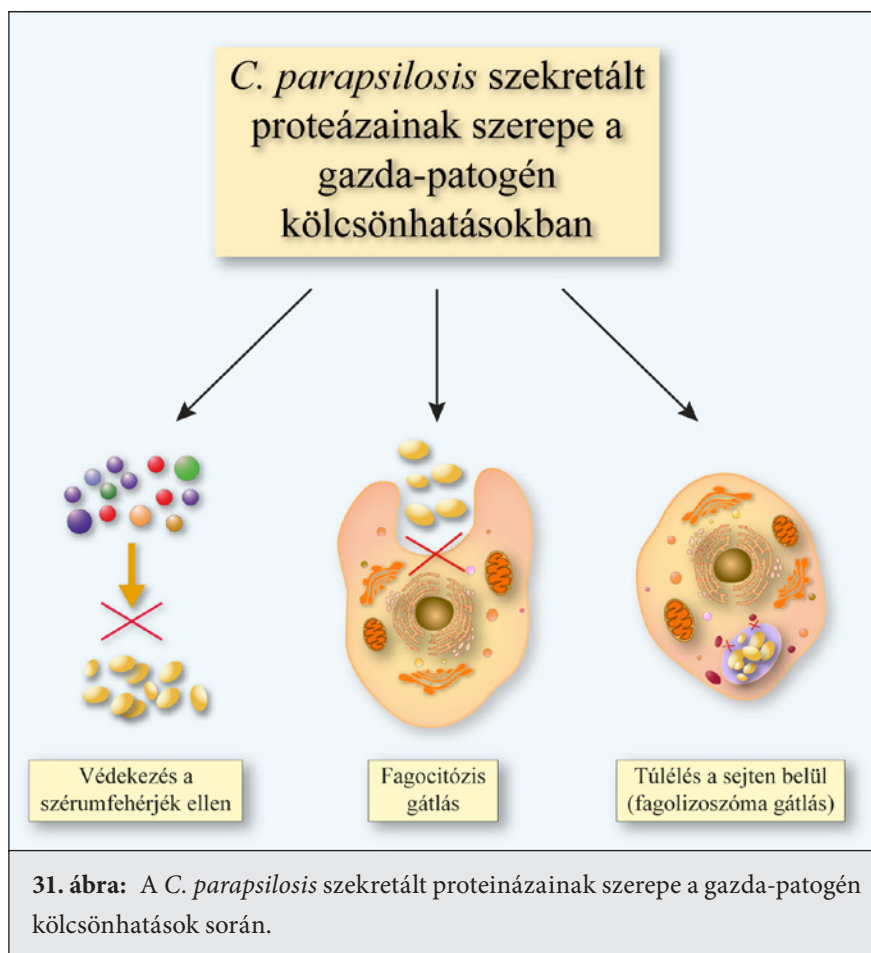


Annak érdekében, hogy a vad típusú és a *SAPP1* deléciós mutáns törzsek esetén a fagocitózis folyamatát részleteiben tanulmányozhassuk, fluoreszcens mikroszkópos technikát is alkalmaztunk, melynek során a fagoszómák és lizoszómák ko-lokalizációját vizsgáltuk. A vad típusú és $\Delta/\Delta\text{sapp1a}$, $\Delta/\Delta\text{sapp1b}$ és $\Delta/\Delta\text{sapp1a}-\Delta/\Delta\text{sapp1b}$ törzseket Calcofluor White festékekkel, majd a ko-inkubációs idő letelte után a humán makrofág sejteket Lysotracker Red festékekkel festettük. A dupla deléciós mutáns törzs esetén több fago-lizoszóma fúzió volt megfigyelhető a vad típusú törzsszel összevetve (30. ábra). Ezek az eredmények azt támasztják alá, hogy a *Sapp1* fehérjének fontos szerepe van mind a fagocitózis folyamatának gátlásában, mind a már bekebelezett gomba intracelluláris túlélése során.



Mindezen adatok alátámasztják a *C. parapsilosis* szekretált aszpartil proteinázok sokrétű szerepét a patogenezisben, és egybecsengenek más fajoknál leírt adatokkal. Bár alapvető szerepük a peptidkötések hidrolízise, mégis vizsgálataink szerint ezen aszpartil proteinázok jelentős szereppel bírnak a mikroba virulenciájának kialakításában.

Szerepük van a gazdaszervezet szérumban található antimikrobiális fehérjék bontásában, a fagocitózis gátlásában, valamint a mikroba fagocita sejten belüli túlélésében egyaránt (31. ábra).



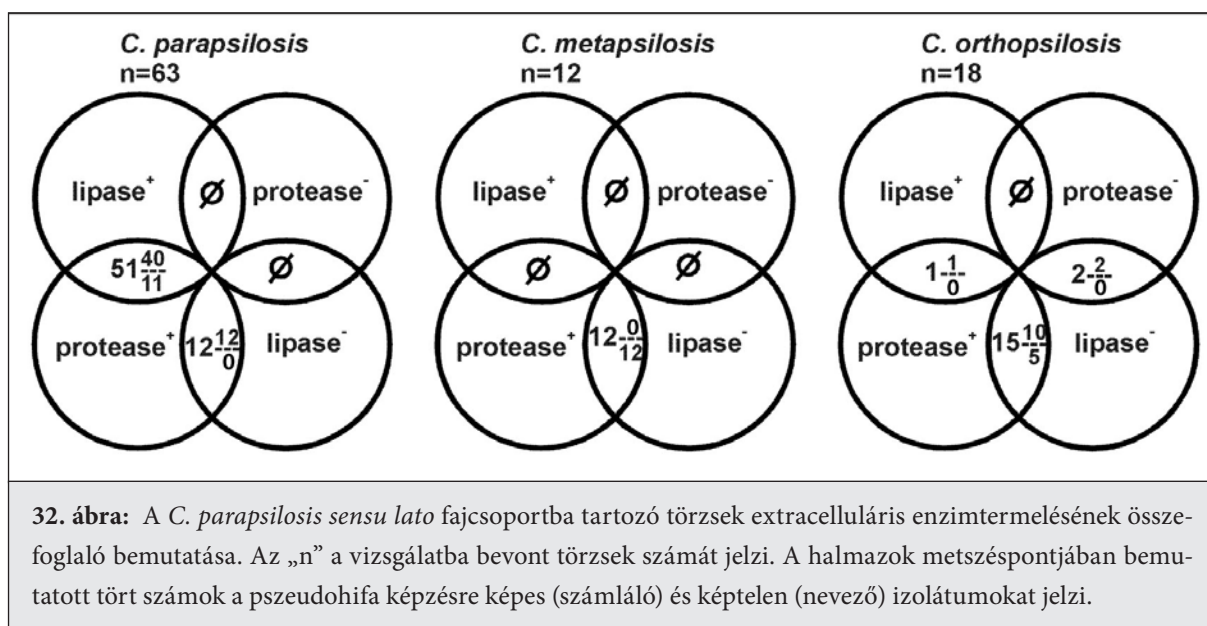
7.5 A *Candida parapsilosis sensu lato* fajcsoport virulenciájának jellemzése

Az eddigiekben leírtak alapján két fontos virulencia faktort azonosítottunk a szekretált lipázok és proteázok tárgyában. A továbbiakban arra kerestük a választ, hogy ezeknek a szekretált komponenseknek a megléte vagy hiánya általánosságban is összefüggésbe hozható-e a megbetegítő képességgel. Azaz feltétele-e a virulencia kialakulásának ezeknek a faktoroknak a megléte. Az ilyen irányú vizsgálatok egyik legfőbb nehézsége, hogy az egymástól filogenetikailag viszonylag távol eső fajok virulenciáját nehéz összehasonlítani multifaktoriális meghatározottságuk miatt. Könnyű belátni, hogy minél távolabbi

rokonok esetében kísérjük meg az összehasonlítást, annál több olyan tényezővel kell számolnunk, amelyek a két fajt a törzspejlődésben egymástól elválasztó idő alatt alakulhattak ki. Ezért a vizsgálatainkat a *Candida parapsilosis sensu lato* fajcsoporton belül végeztük, ahol három, fejlődéstanilag közel álló, ugyanakkor virulenciájukban lényeges eltéréseket mutató fajt találhatunk. Elsősorban nozokomiális fertőzésekkel hozhatók összefüggésbe, a *Candida albicans*-hoz hasonlóan opportunistá patogének, előfordulási gyakoriságuk alapján a *C. albicans* mögé sorolhatók [40]. Egy 2005-ben napvilágot látott publikáció nyomán a korábban *C. parapsilosis* I, II, III elnevezésű csoportokat ma rendre *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* fajnévvel illetjük [55]. Fontos megjegyezni, hogy a klinikumban való előfordulásuk gyakorisága is lényeges különbségeket mutat, leggyakrabban a *C. parapsilosis*, legritkábban a *C. metapsilosis* okoz megbetegedést, amely fajonként különböző megbetegítő képességet feltételez [149], [162], [163], [164]. Eme felismerés párosulva azzal, hogy közel rokon fajokról van szó, egy sajátos kísérleti rendszer felállítását teszi lehetővé, amely kaput nyithat a *C. parapsilosis sensu lato* élesztő csoport patoevolúciójának megismerése, megértése felé. A szakirodalom ugyan említést tesz egy-egy virulencia faktor vizsgálatáról [46], [56], de ezen tulajdonságok szisztematikus analízise, valamint a gazdával való interakció -nagy számú minta bevonásával elvégzett átfogó- jellemzése még nem történt meg. Ezért döntöttünk ezen hiánypótló összehasonlítás elvégzése mellett 63 *C. parapsilosis*, 18 *C. orthopsilosis* és 12 *C. metapsilosis* klinikai izolátum bevonásával. Elsődlegesen az általunk már azonosított virulencia faktorok jellemzésére fókuszáltunk, nevezetesen az extracelluláris lipáz és proteináz termelésre, valamint a pszeudohifa képzésre való képesség, mint gazdasajt károsító tulajdonság meglétére vagy hiányára. A vizsgált izolátumok gazdaszervezetet károsító hatását *in vivo*-, makrofág károsító képességét, fagocitózissal/öléssel szembeni ellenállóképességét két modellen *in vitro* fertőzéses rendszerekben vizsgáltuk, kiegészítve egy képalkotó technikával kombinált áramlási citométer eredményeivel, különös tekintettel az izolátumok extracelluláris enzintermelésére valamint pszeudohifa képzésre való képességének és a virulenciájuk közötti esetleges összefüggésekre.

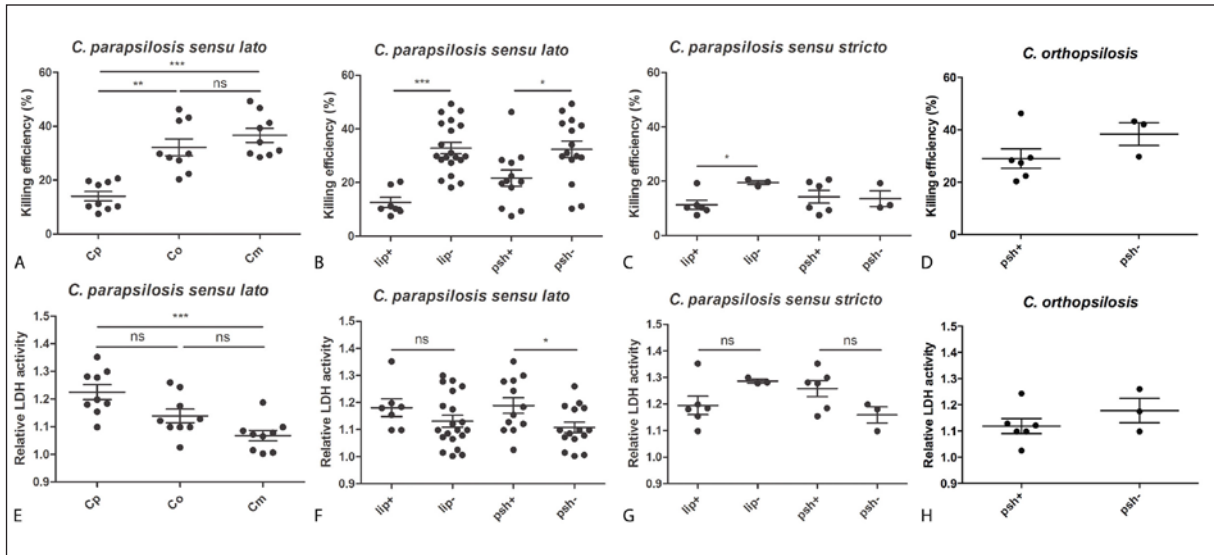
Eredményeink szerint a 63 *C. parapsilosis* izolátum mindegyike képes aktív extracelluláris proteinázt szekretálni. Ezen felül 51 izolátum tekinthető lipáz termelőnek, amelyek közül 40 képes pszeudohifát fejleszteni. A lipázt nem termelő 12 izolátum mindegyike képes pszeudohifa létrehozására. A 18 *C. orthopsilosis* izolátum közül 2 proteináz és lipáz szekrécióra nem, de pszeudohifa fejlesztésére képes. A 16 proteináz termelő közül egy képes lipázt is szekretálni, amely törzs pszeudohifa képzéssel is

jellemezhető, míg a fennmaradó 15 izolátum lipáz termelésére képtelen, amelyek között 10 pszeudohifa képzőt azonosítottunk. A 12 *C. metapsilosis* izolátum a vizsgált paraméterek tekintetében egységesnek bizonyult, egyetlen esetben sem volt megfigyelhető pszeudohifaképzés vagy lipáz termelés, de mindegyik izolátum képes volt aktív proteínáz szekréciójára (32. ábra).



A fenti paraméterek ismeretében a három faj 9-9 izolátumát választottuk ki oly módon, hogy (lehetőség szerint) mind lipáz/proteináz termelők/nem termelők, mind pszeudohifa képzők/nem képzők reprezentálva legyenek. Igazoltuk, hogy a primer humán fagociták és a perifériás vérből izolált mononukleáris sejtekből differenciált makrofágok (PBMC-DM) is képesek felvenni és elpusztítani a vizsgált élesztőket. A PBMC-DM-ok szignifikánsan kisebb mértékben voltak képesek fagocitálni a *C. parapsilosis* izolátumokat, mint a *C. orthopsilosis* vagy *C. metapsilosis* törzseket (rendre $14,02 \pm 5,26\%$, $32,17 \pm 9,39\%$ és $36,61 \pm 7,88\%$, $p < 0,01$). Szignifikánsnak bizonyult a különbség a fajcsoport lipázt termelő/nem termelő (rendre $12,58 \pm 5,07\%$ és $32,83 \pm 9,51\%$, $p < 0,001$) és pszeudohifa képző/nem képző (rendre $21,62 \pm 10,64\%$ és $32,35 \pm 11,92\%$, $p < 0,05$) és a *C. parapsilosis* fajon belül a lipázt termelő/nem termelő (rendre $11,29 \pm 4,1\%$ és $19,48 \pm 1,23\%$, $p < 0,05$) izolátumok összehasonlításában. A vizsgált fajok közül a *C. parapsilosis*-szal való inkubáció váltotta ki a legmagasabb LDH felszabadulást ($1,23 \pm 0,08\%$ relatív aktivitás), ezt a *C. orthopsilosis* követte ($1,14 \pm 0,08\%$ relatív aktivitás) míg a legkisebb mértékű fagocita károsító hatással ($1,07 \pm 0,06\%$ relatív aktivitás) a *C. metapsilosis* volt

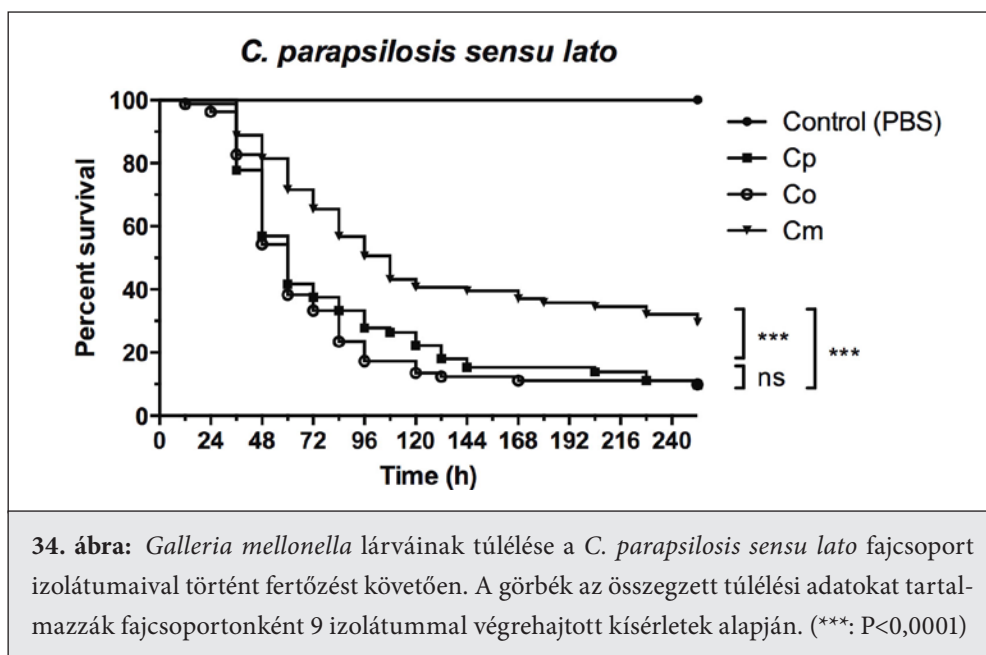
jellemezhető. Ebben az összevetésben J774.2 sejtekkel végzett kísérleteinkhez hasonlóan szignifikáns különbség csak a *C. parapsilosis* és *C. metapsilosis* sejtkárosító hatása között mutatkozott ($p < 0,001$). Eredményeink szerint a fajcsoport hifát képző izolátumai szignifikánsan nagyobb mértékű sejtkárosító hatással rendelkeznek, mint hifa képzésre képtelen törzsek ($1,19 \pm 0,1\%$ és $1,11 \pm 0,08$, $p < 0,05$) (33. ábra).



33. ábra: Különböző *C. parapsilosis* sensu lato fajok izolátumainak kölcsönhatása emberi primer PBMC-DM sejtekkel. (A) Ölési hatékonyság vizsgálata kolóniaképző egység (CFU) meghatározással (Cp, *C. parapsilosis sensu stricto*; Co, *C. orthopsilosis*; Cm, *C. metapsilosis*), (B) ölési hatékonyság vizsgálata lipáz termelő vs. nem termelő, pseudohifa képzést mutató vs. nem mutató *C. parapsilosis sensu lato* fajok izolátumai esetében [lip+, lipáz pozitív (függetlenül a pseudohifa képzés képességre); lip-, lipáz nem termelő; psh+, pseudohifa pozitív (függetlenül a lipáz termelés képességre); psh-, pseudohifa negatív], (C) ölési hatékonyság vizsgálata lipáz termelő vs. nem termelő, pseudohifa képzést mutató vs. nem mutató *C. parapsilosis sensu stricto* izolátumok esetében, (D) ölési hatékonyság vizsgálata lipáz termelő vs. nem termelő, pseudohifa képzést mutató vs. nem mutató *C. orthopsilosis* izolátumok esetében (E) a *C. parapsilosis sensu lato* fajok izolátumainak gazda sejteket károsító képessége az LDH (laktát dehidrogenáz) felszabadulás mérésével, (F) gazdasejt károsító képesség a lipáz és pseudohifa képzés képességének függvényében a *C. parapsilosis sensu lato* fajcsoport izolátumainál, (G) gazdasejt károsító képesség a lipáz és pseudohifa képzés képességének függvényében a *C. parapsilosis sensu stricto* izolátumoknál, (H) gazdasejt károsító képesség a lipáz és pseudohifa képzés képességének függvényében a *C. orthopsilosis* izolátumoknál. Cp, *C. parapsilosis sensu stricto*; Co, *C. orthopsilosis*; Cm, *C. metapsilosis*. Az adatpontok mindegyike egy-egy izolátumot jelez. Statisztikai analízis: Kruskal-Wallis teszt (A, E), Mann-Whitney teszt (B, D, F, G, H) Wilcoxon rank sum teszt (C). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Az izolátumok virulenciáját *in vivo* fertőzőses modellben vizsgáltuk meg. Ehhez egy nem-konvencionális modellt alkalmaztunk, a viaszmosoly (*Galleria mellonella*) lárváinak testüregébe injektáltuk a korábbi kísérletekben is szereplő *C. parapsilosis sensu lato* fajcsoport tagjait (fajonként 9–9 izolátumot). Az inokulum mennyiségét $6 \times 10^6/10\mu\text{l/lárva}$

értékre állítottuk be, majd a lárvák életképességét 10 napon keresztül követtük nyomon. A *C. metapsilosis*-szal fertőzött lárvák életképessége szingifikánsan nagyobbak bizonyult, mint az akár *C. orthopsilosis*-szal, akár *C. parapsilosis*-szal fertőzötteké (rendre $p < 0,0001$ és $p < 0,001$). A *C. orthopsilosis*-szal valamint *C. parapsilosis*-szal fertőzött lárvák túlélési görbéje között nem volt kimutatható szignifikáns különbség. A túlélési idő mediánja *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. parapsilosis* sorrendben rendre 60, 108 és 108 órának adódott (34. ábra).



A fenti kísérletek rávilágítottak arra, hogy a virulencia kialakulása számos faktor által meghatározott. Az opportunistá patogén gombák esetében a gazdaszervezet egy speciális környezetként fogható fel, ahol bizonyos képességek megléte szükséges a megfelelő tápanyagok felvételéhez, illetve általában a túléléshez. Ezen tulajdonságok közül lehet egy, a szekretált hidrolitikus enzimek termelése. A környezethez történő adaptáció teljesebb megértéséhez elvégeztük a *C. parapsilosis sensu lato* csoportba tartozó fajok teljes genom szekvenálását és összehasonlító genom analízisét. Megállapítottuk, hogy bizonyos géncsaládok (mint pl. a lipázok, proteinázok) expansiója figyelhető meg a klinikumban gyakrabban előforduló fajok esetében. Igazoltuk továbbá, hogy a fajon belüli hibridizáció a környezethez történő adaptáció egyik útja lehet. Annak fényében, hogy az emberi szervezet az opportunistá patogén gombák esetében egy speciális lélettérként fogható fel, a hibridizációs események az ehhez a környezethez történő alkalmazkodást tehetik lehetővé [165, 166].

7.6 A *C. parapsilosis* által kiváltott immunválasz vizsgálata

A bevezetőben említett komplex megközelítést szem előtt tartva fontosnak tartottuk, hogy a gazda válaszána, a *C. parapsilosis* által kiváltott immunreakciók vizsgálatára alkalmas rendszereket is kidolgozzunk és vizsgáljuk azt, hogy létezik-e a gombák esetében is fajspecifikus válaszreakció.

Bizonyos *Candida* fajokat az egészséges humán mikrobiális közösség tagjaként a test számos területén, így a bélflóra komponenseiként is számon tarthatjuk [167]. A szakirodalom alapján ismeretes, hogy a tápcsatornát a *C. parapsilosis* is kolonizálja más fajok mellett, amelyek aránya egyedről-egyedre tág határok között változik [168]. A humán bélrendszer ennek megfelelően egy igen változatos, potenciálisan opportunistá patogén gombaflóráat hordoz, amelynek kontrolljában a tápcsatorna epitél sejtrétege kitüntetett szereppel bír. Ezek a sejtek ugyanis passzív elhatároló szerepük mellett aktívan is közreműködnek a mikrobák fagocitálásával, illetve citokinek és antimikrobiális fehérjék szekréciójával [169–171]. Ez utóbbiak közül a defenzinek különösen fontos szerepet töltenek be nem csak élesztők, hanem baktériumok, protozoák, sőt vírusok elleni védekezésben is [172]. Az említett kis molekulatömegű, ciszteinben gazdag, kationos fehérjék hatását elsősorban *C. albicans*-szal kapcsolatos publikációkból ismerjük, ugyanakkor más, bélrendszert kolonizáló *Candida* fajra gyakorolt hatásáról hiányosak az ismereteink [173].

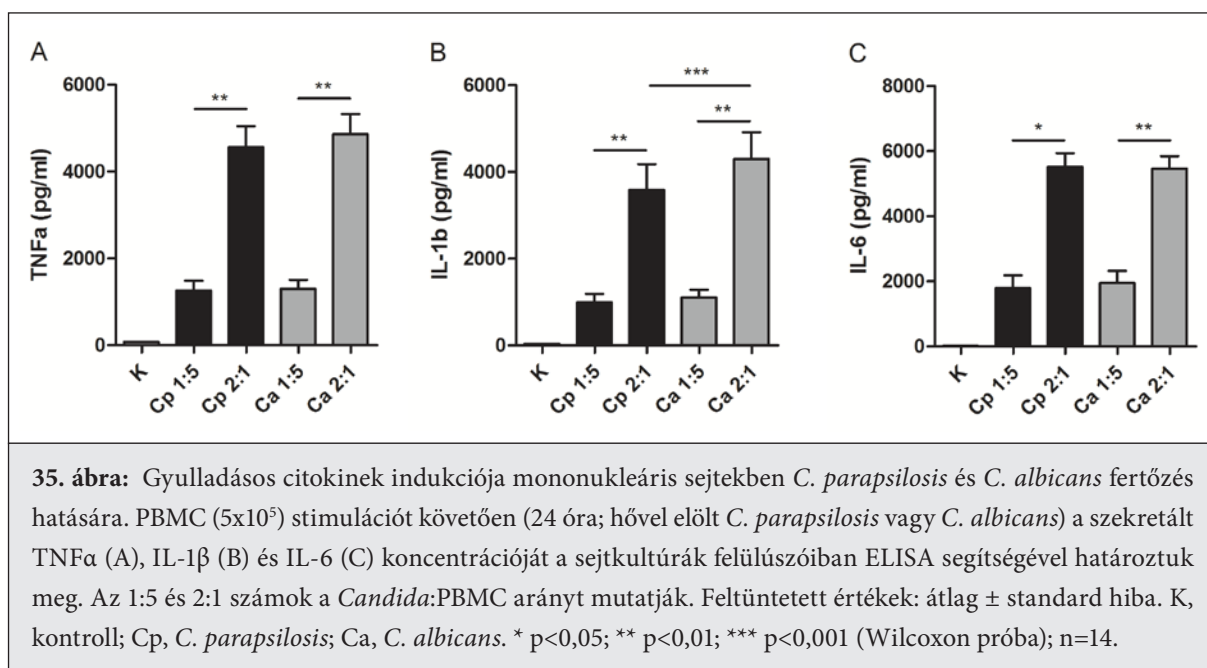
Ezek tükrében választ kerestünk arra, hogy a *C. albicans*-on kívül további három opportunistá patogén *Candida* faj (*C. krusei*, *C. parapsilosis* és *C. tropicalis*), milyen mértékben képes indukálni a humán béta defenzin-2 (HBD-2) fehérje szintézisét és szekrécióját *in vitro* a modellként alkalmazott Caco-2 (humán bélepitél sejtvonal) sejtekben.

Kísérleteinkben pozitív kontrollként az *Escherichia coli* Nissle 1917 törzsét alkalmaztuk. Megállapítottuk, hogy a fertőzés negyedik órájában valamennyi esetben megemelkedett a HBD-2 transzkriptum (GAPDH-ra, mint belső kontrollra normalizált) relatív expressziója a fertőzetlen kontrollhoz képest. Ezen értékek *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. albicans* és *C. tropicalis* sorrendben rendre $2,3 \pm 0,2$; $3,2 \pm 0,2$; $3,5 \pm 0,3$ és $4,1 \pm 0,4$ -nek adódtak, a fertőzetlen kontrolltól statisztikailag szignifikáns eltérést csak *C. albicans* és *C. tropicalis* esetében tapasztaltunk. A HBD-2 gén kifejeződése nem csak mRNS, hanem fehérje szinten is emelkedést mutatott. Az epitél sejtek intracelluláris HBD-2 fehérjéjének abszolút mennyiségét immunfluoreszcens festési eljárást követően készült mikroszkópos felvételek szoftveres analízisével határoztuk meg. Valamennyi

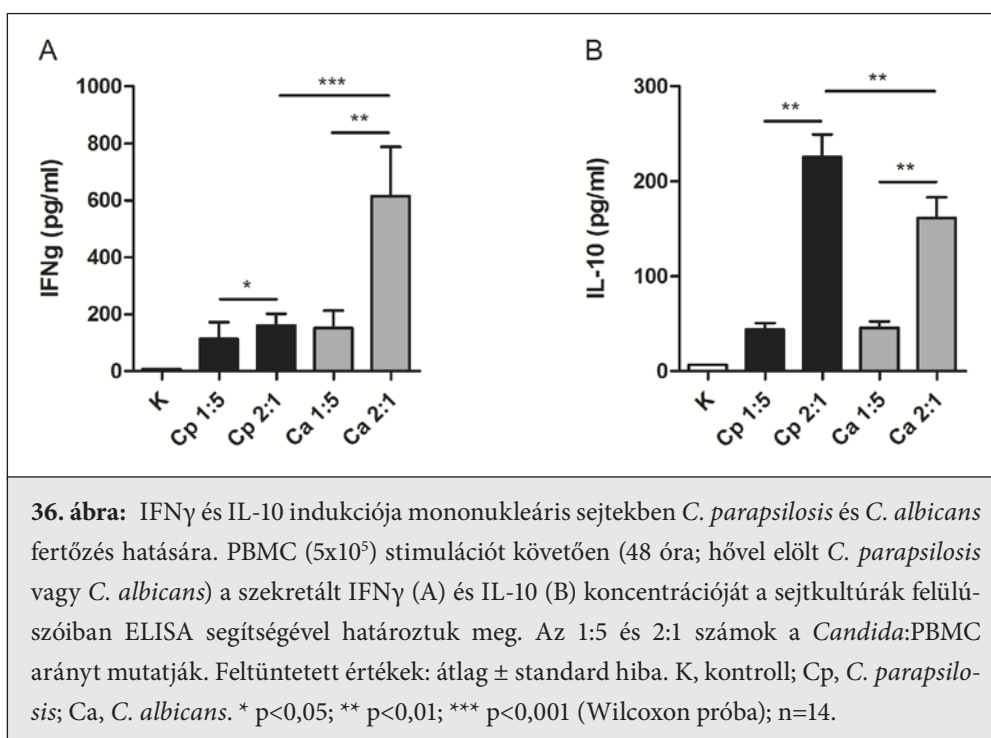
élesztő törzs szignifikáns emelkedést indukált a vizsgált fehérje mennyiségében a fertőzetlen kontrollhoz képest. Ezen megfigyelésünket az epitél sejtek lizátumának felhasználásával elvégzett Western-blot analízis is alátámasztotta. Úgy tapasztaltuk, hogy a vizsgált rendszerben a HBD-2 fehérje intracellulárisan megnövekedett mennyiségével párhuzamosan a fehérje szekréciója is fokozódik. A fertőzés 24. órájában gyűjtött felülúszok ELISA analízisének eredményei szerint *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. albicans* sorrendben tapasztaltunk egyre növekvő HBD-2 fehérje koncentrációt a tápoldatban.

Miután megállapítottuk, hogy a gomba jelenléte képes a defenzinek termelését indukálni félprofesszionális immunsejtek esetében, megvizsgáltuk, hogy professzionális immunsejtekben milyen folyamatokat indukál a *C. parapsilosis* jelenléte. Korábbi munkánk alapján ismert volt, hogy a PBMC-k reagálnak a *C. parapsilosis* sejtekre. Behatóbban azonban eddig nem elemeztünk ennek a reakciónak az immunológiai karakterét. Ezért kezdetben összevetettük a *C. parapsilosis* és *C. albicans* által indukált citokin termelést perifériás vérből izolált mononukleáris sejtekben. Annak érdekében, hogy a *C. parapsilosis* és *C. albicans* által kiváltott citokin termelést későbbi időpontokban (2–7 nap) is össze tudjuk hasonlítani (a T-sejtes citokinek indukciója hosszabb időt vesz igénybe), ebben a kísérletsorozatban hővel elölt *Candida* sejtekkel dolgoztunk. (Az élő *C. albicans* RPMI tápoldatban intenzíven hifázik és több napos inkubáció során intenzív sejtkárosodást okoz.) Mivel korábban már számos hasonló kísérletet végeztek *C. albicans*-szal, az egyes citokinek méréséhez szükséges optimális inkubációs időket (TNF α , IL-1 β és IL-6, 24 óra; IFN γ és IL-10, 48 óra; IL-17 és IL-22, 7 nap) szakirodalmi adatok alapján állapítottuk meg [102, 174, 175].

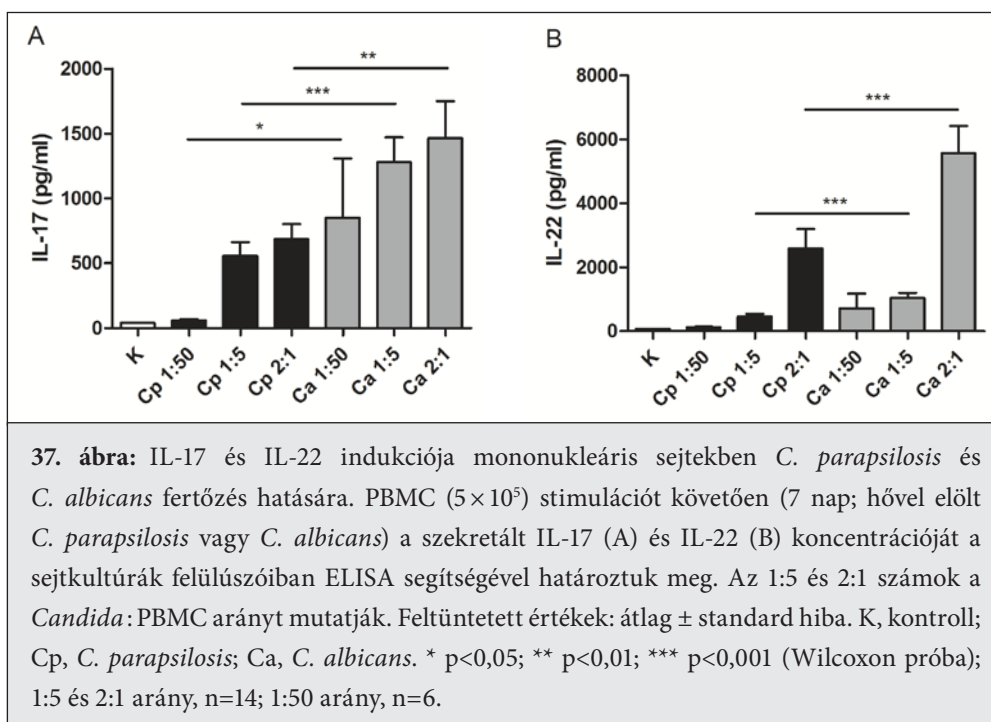
A gyulladásos citokinek indukciójának vizsgálatához a frissen izolált mononukleáris sejteket hővel elölt *C. parapsilosis*-szal és *C. albicans*-szal stimuláltuk 1:5 vagy 2:1 *Candida*:PBMC arányban, majd 24 óra elteltével a felülúszókat összegyűjtöttük és meghatároztuk a szekretált TNF α , IL-1 β és IL-6 mennyiségét ELISA segítségével. Azt tapasztaltuk, hogy mind a *C. parapsilosis*, mind a *C. albicans* dózis-függő módon indukálta a mononukleáris sejtek TNF α , IL-1 β és IL-6 termelését (35. ábra). Továbbá, a *C. parapsilosis* hasonló mértékű citokin szekréciót indukált, mint a *C. albicans*; 2:1 *Candida*:PBMC fertőzési arány esetén azonban a szekretált IL-1 β mennyisége mintegy 20 %-kal nagyobb volt *C. albicans* fertőzés esetén (35. ábra.).



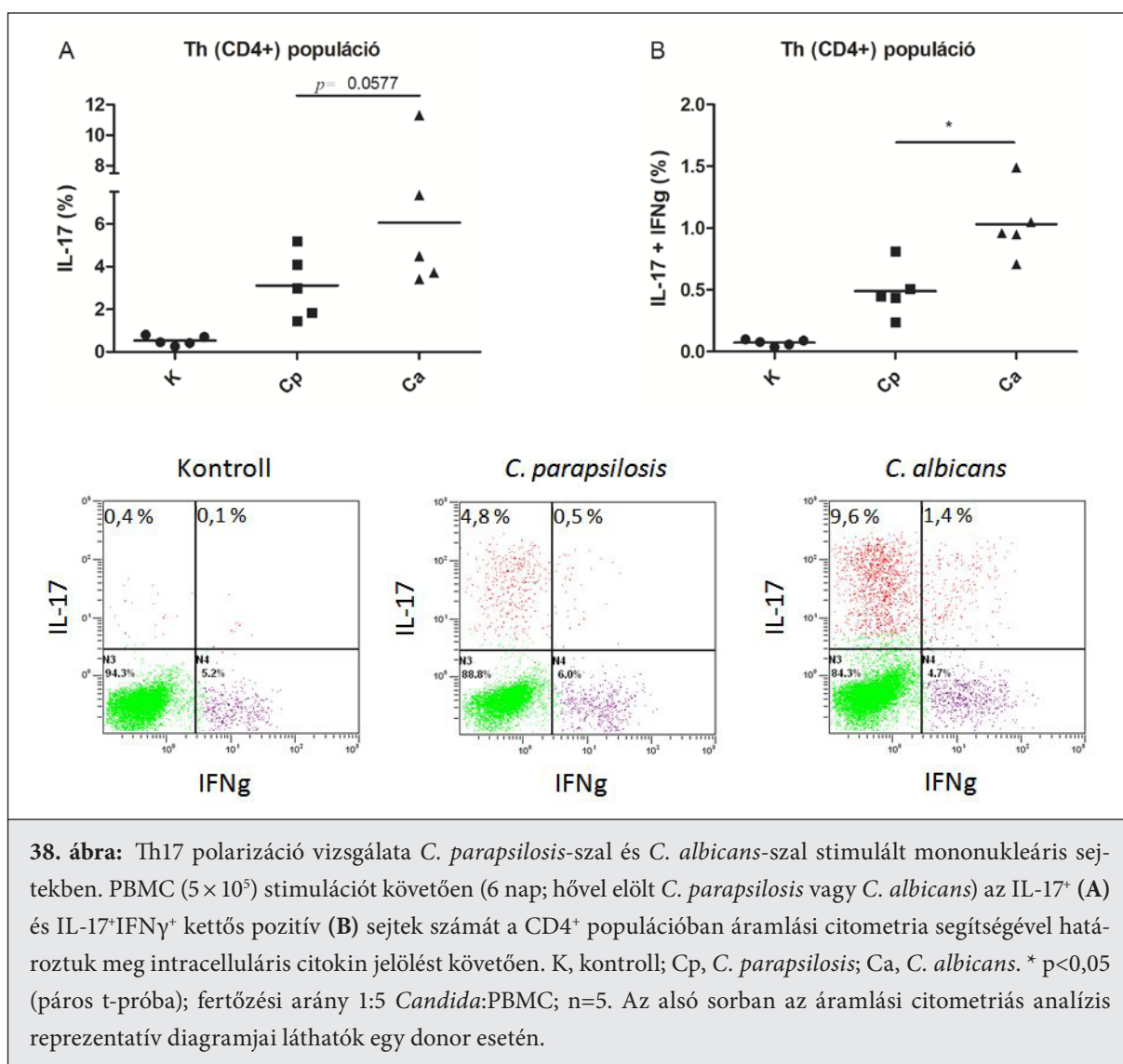
A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a *C. parapsilosis* és *C. albicans* fertőzés hogyan befolyásolja az IFN γ és IL-10 indukcióját mononukleáris sejtekben. 48 órás inkubációt követően azt tapasztaltuk, hogy 2:1 arányú fertőzés esetén a *C. parapsilosis* szignifikánsan alacsonyabb IFN γ , ugyanakkor magasabb IL-10 termelést indukált, mint a *C. albicans* (36. ábra). Mivel az IFN γ termelés elsősorban a Th1-típusú válasszal hozható kapcsolatba, míg az IL-10 főként a Th2 és Treg sejtek terméke [76, 176], ezek az eredmények arra utalnak, hogy a *C. parapsilosis* és *C. albicans* fertőzés esetén eltérően szabályozott a Th polarizáció.



A Th17 sejt citokinek vizsgálatához a mononukleáris sejteket 7 napig stimuláltuk hővel előlt *C. parapsilosis*-szal és *C. albicans*-szal. Azt tapasztaltuk, hogy míg mindkét faj dózis-függő módon indukálta az IL-17 és IL-22 termelést, a *C. parapsilosis*-szal stimulált mononukleáris sejtek szignifikánsan kevesebb IL-17-et és IL-22-t szekretáltak a *C. albicans*-szal fertőzött sejtekhez képest (37. ábra).



Annak érdekében, hogy megállapíthassuk, hogy a csökkent IL-17 és IFN γ termelés együtt jár-e az IL-17 és IFN γ termelő sejtek alacsonyabb számával a *C. parapsilosis*-szal stimulált mintákban, intracelluláris citokin festést végeztünk. A mononukleáris sejteket 6 napig inkubáltuk hővel előlt *C. parapsilosis*-szal vagy *C. albicans*-szal, majd áramlási citometria segítségével meghatároztuk az IL-17 és IFN γ pozitív sejtek arányát a CD4 $^{+}$ populáción belül. Azt tapasztaltuk, hogy a *C. parapsilosis*-szal stimulált mintákban alacsonyabb volt mind az IL-17 $^{+}$, mind az IL-17 $^{+}$ IFN γ^{+} kettős pozitív Th limfociták száma a *C. albicans*-szal stimulált sejtekhez képest (38. ábra).



A monociták, makrofágok és dendritikus sejtek mintázatfelismerő receptorainak aktivációja a patogének felismerését követően gyors citokin szintézist és szekréciót indukál [49]. Kísérleteink során először összehasonlítottuk a *C. parapsilosis* és *C. albicans* által

indukált pro-inflammatorikus citokin termelést mononukleáris sejtekben. *C. albicans*-szal már számos PBMC-stimulációs kísérletet végeztek; ismert, hogy ebben a rendszerben hatékonyan indukálja a TNF α , IL-6 és IL-1 β termelését [174]. Eredményeink alapján a *C. parapsilosis* a *C. albicans*-hoz hasonló mértékben stimulálja a TNF α és IL-6 szekréciót, ami arra utal, hogy a *C. parapsilosis* a vérben *C. albicans*-hoz hasonlóan hatékonyan aktiválja a természetes immunitás sejtjeit. Meg kell azonban jegyeznünk, hogy ebben a kísérletsorozatban hővel elölt *Candida* sejtekkel dolgoztunk, ami befolyásolhatja a patogének által kiváltott választ (a hőkezelés jelentősen megváltoztatja a gombák sejtfalszerkezetét). Ennek ellenére ezek és a további eredmények értékes információt szolgáltatnak a *C. parapsilosis* és *C. albicans* elleni immunválasz alapvető hasonlóságairól és különbségeiről. Legújabb kísérleteinkben azonban kidolgoztunk egy olyan ko-inkubációs rendszert, ahol az élő sejtek kölcsönhatásait vizsgálhatjuk a humán fagocita sejtekkel.

A Th sejt immunválasznak kritikus szerepe van a gombás fertőzések elleni védelemben. Az aktiválódott Th sejteket effektor funkcióik szerint négy fő csoportra (Th1, Th2, Th17 és Treg) oszthatjuk (ezen kívül néhány kisebb populációt is megkülönböztetnek) [115]. Számos tanulmányban kimutatták, hogy a *C. albicans* immunkompetens egyénekben Th1/Th17 irányú Th-polarizációt indukál [73], és candidiasis esetén a Th17 sejtek vagy az általuk termelt citokinek hiánya negatívan befolyásolja a fertőzés kimenetelét [72]. Munkánk során megvizsgáltuk, hogy a *C. parapsilosis* hogyan befolyásolja a Th sejt polarizációt. Azt tapasztaltuk, hogy a *C. albicans*-szal összehasonlítva a *C. parapsilosis* mononukleáris sejtekben alacsonyabb IFN γ , ugyanakkor magasabb IL-10 termelést indukált. Míg az IFN γ -t túlnyomórészt Th1 sejtek termelik, az IL-10 termelésért főleg a Treg és Th2 sejtek (valamint kisebb részben monociták) felelősek. A két citokin antagonisztikus hatású, az IL-10 gátolja az IFN γ termelést [76]. A Treg sejteknek fontos szerepe van a gyulladásos válasz szabályozásában *C. albicans* fertőzés esetén; bizonyított, hogy disszeminált candidiasis során a Treg sejtek által termelt IL-10 és TGF β gátolja a Th1 és Th17 sejtek pro-inflammatorikus funkcióit [177]. A klinikumban a magas IL-10 szintet általában kockázati tényezőnek tekintik a gombás fertőzésekre való fogékonyság szempontjából, ugyanis gyakran figyelhető meg emelkedett IL-10 szint krónikus candidiasis-ban vagy aspergillosis-ban szenvedő betegeknél [178]. A *C. parapsilosis* által indukált alacsony IFN γ és magasabb IL-10 szint arra utalhat, hogy ennél a patogénnél a Th1 irányú polarizáció nem játszik olyan fontos szerepet a védekezésben, mint más opportunistá gombák esetén. Az immunválasz tolerogén, Th2/Treg irányba történő eltolása ugyanakkor egyfajta túlélési stratégia is lehet a patogén szempontjából.

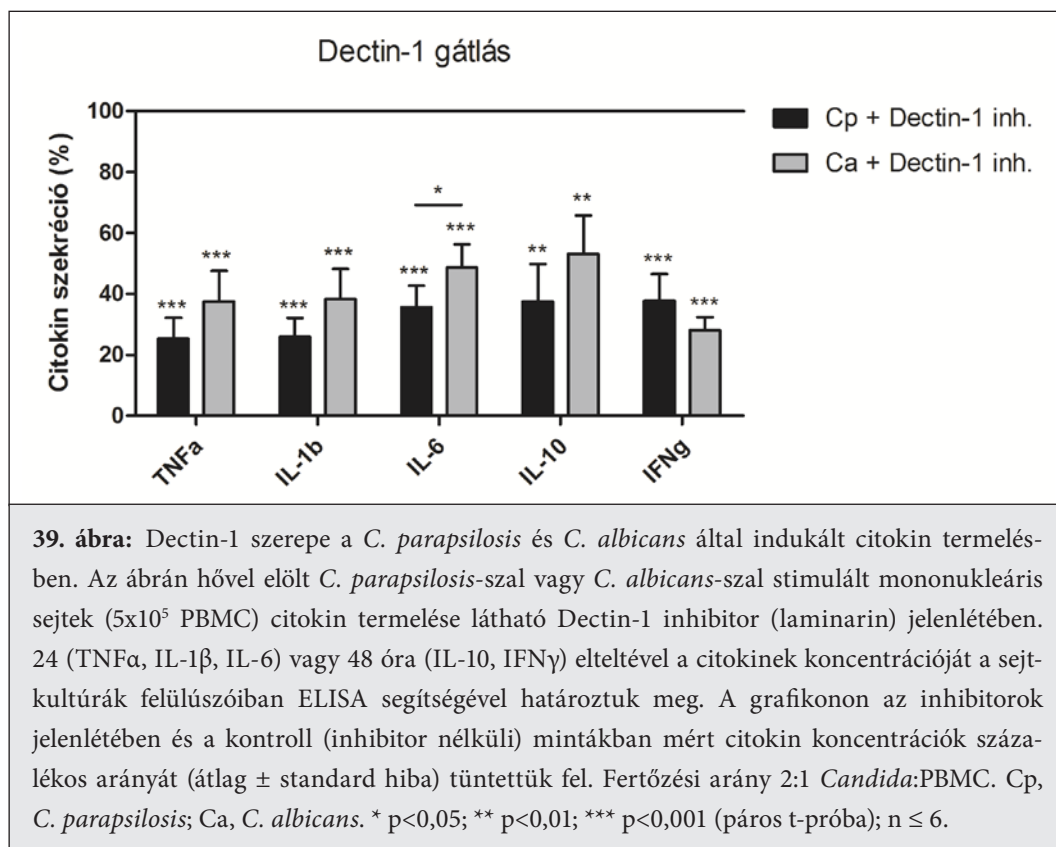
A Th17 citokinek vizsgálatakor azt tapasztaltuk, hogy míg a *C. albicans* intenzív IL-17 és IL-22 szekréciót indukált (ami összhangban van az eddigi szakirodalmi adatokkal [102, 128]), a *C. parapsilosis*-szal stimulált sejtek jelentősen alacsonyabb IL-17 és IL-22 termelést mutattak. Intracelluláris citokin festés segítségével azt is kimutattuk, hogy a *C. parapsilosis*-szal stimulált PBMC kultúrákban alacsonyabb volt az IL-17, illetve az IL-17 és IFN γ termelő CD4⁺ sejtek aránya. Ugyan a *C. parapsilosis* által indukált Th-polarizáció mögötti molekuláris mechanizmusok még tisztázásra várnak, ezek az eredmények részben magyarázhatják a *C. albicans* és *C. parapsilosis* eltérő virulenciáját, illetve az egyes betegcsoportok fogékonyágát a két patogén által okozott fertőzésekkel szemben. Az újszülöttek különösen fogékonyak *C. parapsilosis* fertőzésre [38], ennek oka azonban még mindig nem teljesen tisztázott. Az újszülöttek immunrendszere még sok tekintetben éretlen; jellegzetes például a neutrofilek és NK sejtek alacsony száma és aktivitása [179, 180], ami főleg az IFN γ hiányának tulajdonítható. Ennek hátterében a Th1 polarizáció defektje áll, az újszülöttek immunrendszerére ugyanis Th2/Th17 dominancia jellemző [181]. Eredményeink fényében elképzelhető, hogy míg egészséges felnőttekben a természetes immunrendszer effektor mechanizmusai elegendőek lehetnek a *C. parapsilosis* fertőzés megfékezéséhez intenzív Th1/Th17 válasz indukciója nélkül, csecsemőkben a gyenge természetes immunitás súlyos fertőzést eredményezhet (hiába lennének képesek hatékony Th17 választ indítani). Ezzel a spekulációval összhangban van az a tanulmány, amely kimutatta, hogy a neutrofilek sokkal hatékonyabban fagocitálják a *C. parapsilosis*, mint a *C. albicans* sejtjeit, kiemelve ennek a sejtpopulációnak a fontosságát a fertőzés során [136]. A neutrofilek szerepét továbbá az is alátámasztja, hogy a neutropéniás betegek különösen fogékonyak a nem-*albicans* fajok által okozott *Candida* fertőzésekre; egy a közelmúltban készült átfogó tanulmány eredményei szerint a hematológiai rendellenességben szenvedők (akiknek a 73 %-a neutropéniás volt) körében a candidemia-t az esetek 87,5 %-ában nem-*albicans Candida* faj okozta, és a *C. parapsilosis* volt felelős az esetek 50 %-áért [33]. Ugyanakkor Destin és munkatársai kimutatták, hogy a *C. albicans*-szal és *C. parapsilosis*-szal stimulált újszülött neutrofilek reaktív oxigéngyök termelése és fagocitotikus kapacitása nem különbözik a felnőtt neutrofilekétől, ami arra utal, hogy a csecsemők *Candida* fertőzésekre való fogékonyágának hátterében nem ezen neutrofil funkciók állnak [182]. Az említett tanulmányban nem vizsgálták azonban a neutrofilek *Candida* fajokkal szembeni ölési képességét, amelyhez a reaktív oxigéngyökök termelésén kívül egyéb mechanizmusok is hozzájárulhatnak [106]. A jövőben mindenképpen további vizsgálatok lesznek szükségesek a neutrofil granulociták különböző *Candida* fajokkal szembeni védekezésben

betöltött pontos szerepének tisztázásához. Erre irányuló együttműködések kialakítása folyamatban van. Prof. Mócsai Attila kutatócsoportjával együttműködve tervezzük a neutrofilek szerepének vizsgálatát a nem-*albicans Candida* fajok által kiváltott fertőzések során. Önkritikusan fontos azonban megjegyezni, hogy kísérleti rendszerünknek több hiányossága is van. Egyrészt, amint azt fentebb már említettem, hővel elölt *Candida* sejtekkel dolgoztunk; másrészt nem határoztuk meg, hogy az egyes citokinek termeléséért mely sejtpopulációk felelősek. A PBMC frakcióban jelen lévő CD4⁺ sejtek jelentős része memória (CD45RO⁺) T-sejt: a naiv T-sejtek mellett (~ 40 %) mintegy 20 %-ban effektor memória T-sejtek, 40 %-ban pedig centrális memória T-sejtek vannak jelen [183]. Kimutatták, hogy IL-17 és IL-22 termelő, *C. albicans*-specifikus memóriasejtek egészséges egyének vérében is jelen vannak [184, 185]. Mivel a PBMC donorok kórtörténetét nem ismerjük, nem tudhatjuk azt sem, hogy milyen arányban vannak jelen a vérükben *Candida*-specifikus memóriasejtek, így nem lehetünk biztosak benne, hogy a termelt citokinek újonnan differenciálódott, vagy memória T-sejtekből származnak. Van de Veerdonk és munkatársai azonban azt tapasztalták, hogy amikor naiv (CD45RA⁺) vagy memória (CD45RA⁻) T-sejteket stimuláltak *C. albicans*-szal autológ monociták jelenlétében, 8 nap elteltével az eredetileg naiv T-sejtek minimális IL-17 termelést mutattak a memóriasejtekhez képest [102]. Eyerich és munkatársai egészséges és CMC-ben szenvedő betegek véréből izolált mononukleáris sejtek IL-17 és IL-22 termelését hasonlították össze *Candida* antigénnel való stimulációt követően, és azt tapasztalták, hogy az IL-17 termelő sejtek többsége a CCR6⁺ memória T-sejt populációban volt [128]. Mivel a *C. albicans* gyakrabban megtalálható az emberi szervezetben, mint a *C. parapsilosis*, nem zárhatjuk ki, hogy az alacsonyabb IL-17 termelés részben a memória T-sejtek alacsonyabb számának köszönhető. Ugyanakkor kísérleteink során viszonylag nagy számú (14) donorról dolgoztunk, és egyetlen esetben sem tapasztaltuk, hogy a *C. parapsilosis* a *C. albicans*-nál magasabb IL-17 és IL-22 termelést indukált volna; ami pedig várható lenne, ha a citokin termelés különbségét pusztán az antigénnel való előzetes találkozás gyakorisága határozná meg. Továbbá, Eyerich és munkatársai kimutatták, hogy a CMC-ben szenvedő betegek véréből izolált mononukleáris sejtek alacsonyabb IL-17 és IL-22 termelést mutatnak az egészséges donorokból származó sejtekhez képest, annak ellenére, hogy a betegekben a *Candida* antigének folyamatosan és nagy koncentrációban jelen vannak a szervezetben [128]. A *C. parapsilosis* által indukált Th polarizáció pontosabb vizsgálata a jövőben naiv T-sejtek izolálása és *in vitro* stimulációja segítségével, vagy *in vivo* rendszerben a Th-sejtek adoptív transzferét követően [186] lesz megvalósítható (bár egyelőre nem

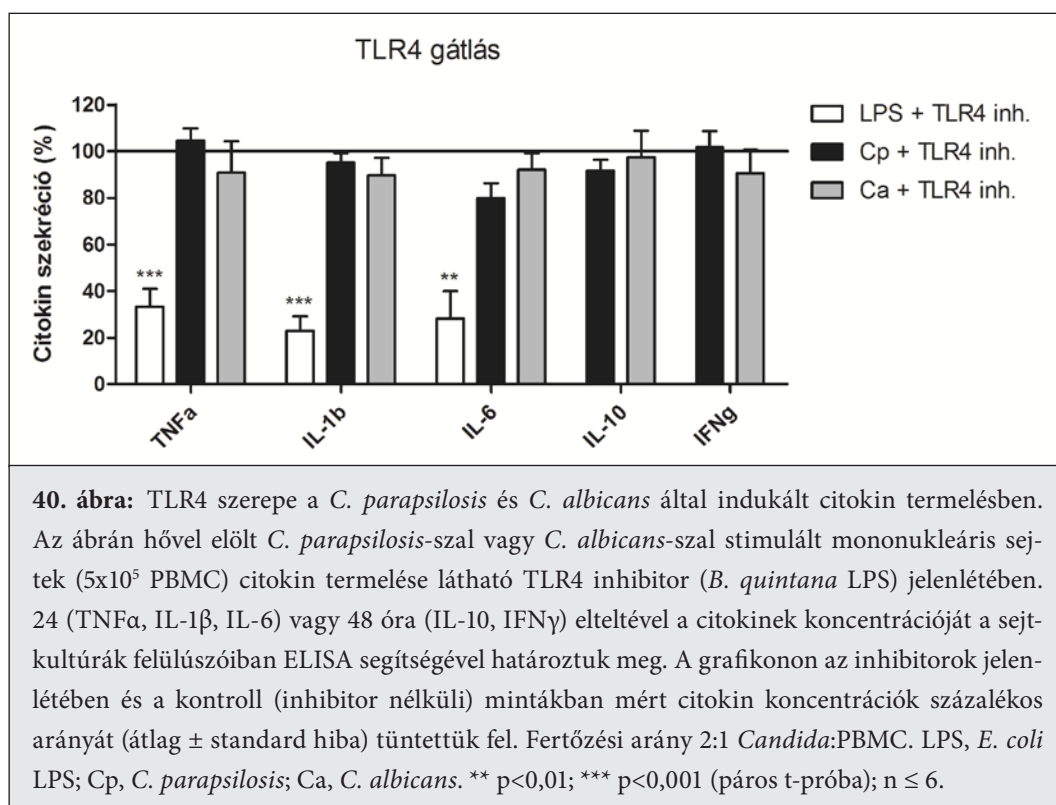
állnak rendelkezésünkre *C. parapsilosis*-specifikus antigének, és ebből adódóan erre a fajra specifikus TCR-ral rendelkező transzgenikus egér modellek sem, amelynek megoldásán szintén dolgozunk).

7.6.1 A *C. parapsilosis* immunológiai felismerésében szerepet játszó receptorok azonosítása

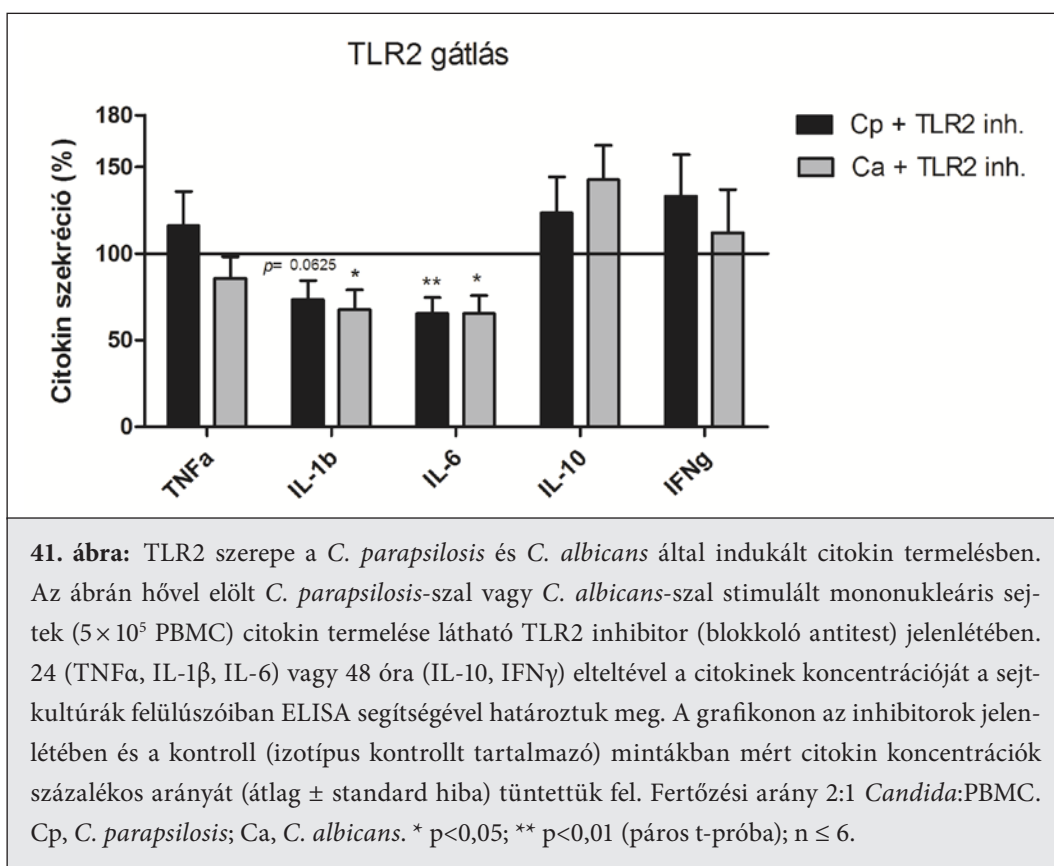
Annak érdekében, hogy információt nyerjünk a *C. parapsilosis* immunológiai felismeréséről, bizonyos PRR blokkolók jelenlétében vizsgáltuk a mononukleáris sejtek citokin termelését. Azt tapasztaltuk, hogy a Dectin-1 receptor laminarinnal történő gátlása jelentősen csökkentette mind a *C. albicans*-szal, mind a *C. parapsilosis*-szal stimulált mononukleáris sejtek citokin termelését, jelezve, hogy a receptor mindkét faj felismerésében szerepet játszik (39. ábra.). Továbbá, a TNF α , IL-1 β , IL-6 és IL-10 szintjében valamivel nagyobb csökkenést tapasztaltunk a *C. parapsilosis*-szal stimulált mintákban a *C. albicans*-szal stimulált sejt kultúrákhoz képest (bár ez a különbség csak az IL-6 esetén volt szignifikáns).



A TLR4 blokkolását *Bartonella quintana* LPS-sel végeztük, amely a receptor természetes antagonistája [187]. Míg a TLR4 gátlása jelentősen csökkentette az *E. coli* LPS-sel (TLR4 agonista) stimulált mononukleáris sejtek TNF α , IL-1 β és IL-6 termelését, a receptor blokkolása nem volt hatással a *C. parapsilosis* és *C. albicans* által indukált citokin termelésre (40. ábra).



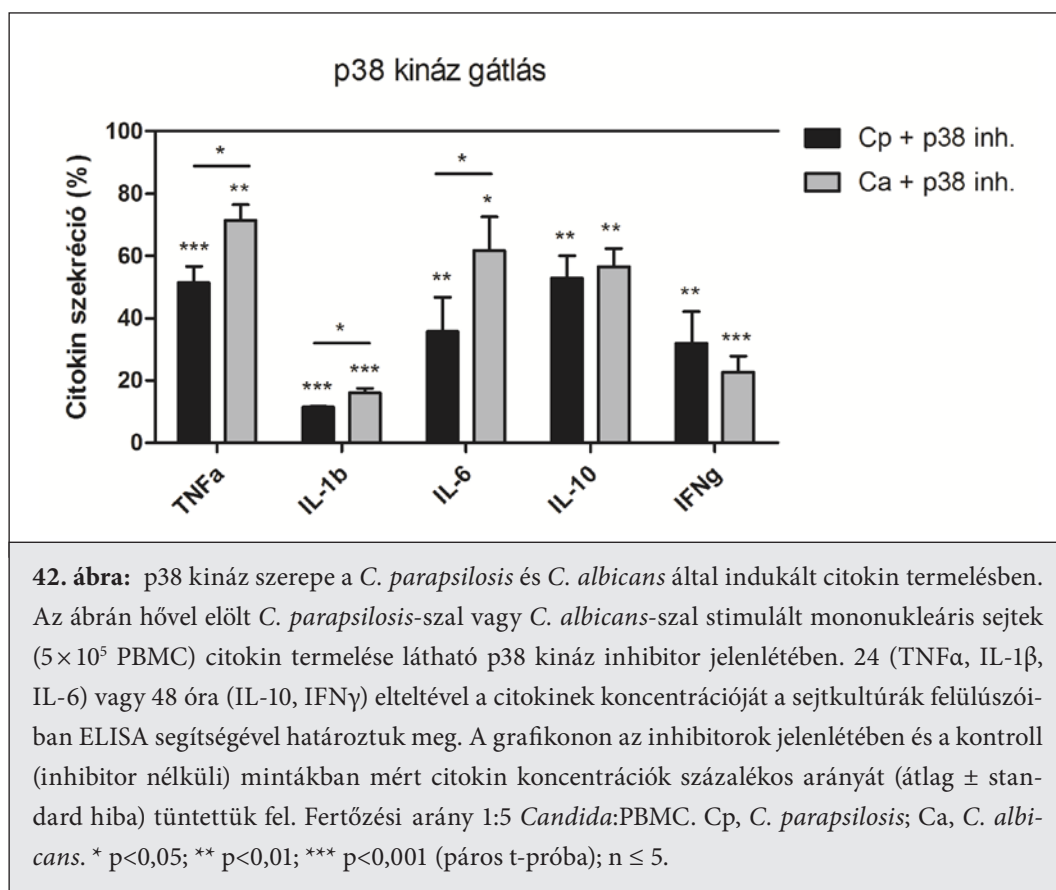
Ezen túlmenően a TLR2 receptor szerepét is megvizsgáltuk a *C. albicans* és *C. parapsilosis* felismerése során. Míg a TLR2 blokkolása kismértékben csökkentette a *C. parapsilosis* és *C. albicans* által indukált IL-1 β és IL-6 termelést, a TNF α , IL-10 és IFN γ termelését nem gátolta, sőt az utóbbi kettő citokin szekrécióját kismértékben növelte (41. ábra).



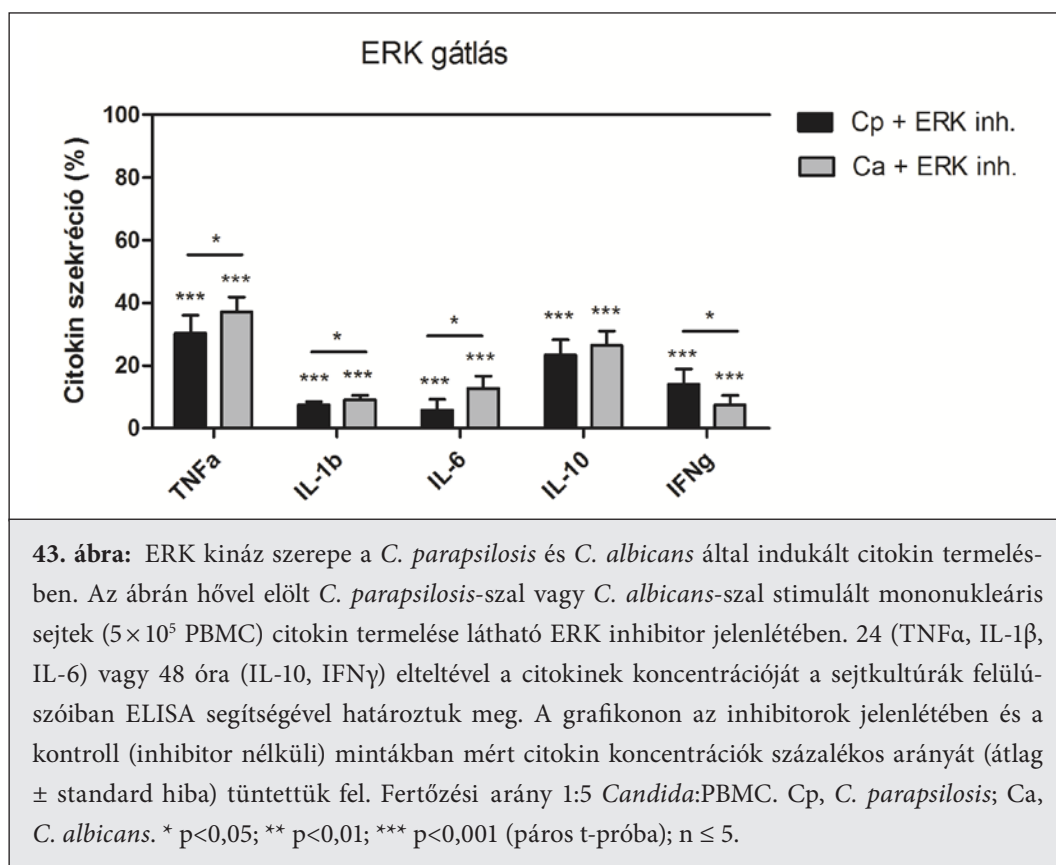
7.6.2 A *C. parapsilosis* felismerését követő intracelluláris jeltovábbítás elemeinek vizsgálata

A patogének felismerését követően a PRR-ek számos különböző jelátviteli útvonalat aktiválhatnak, amelyek végső soron specifikus génexpressziós változásokhoz és a citokin termelés indukciójához vezetnek. A MAP kinázok a szignalizációs kaszkád végén helyezkednek el, így aktivációt követően közvetlenül képesek bizonyos transzkripciós faktorok működését szabályozni [188]. Ismert, hogy mind a TLR-ek, mind a Syk-asszociált CLR-ek képesek aktiválni a p38, ERK és JNK klasszikus MAP kinázokat [96, 189]; az egyes MAP kinázok szerepe a *Candida* fajok által indukált citokin termelésben azonban nem teljesen tisztázott. Annak érdekében, hogy információt nyerjünk a p38, ERK és JNK szerepéről a *C. albicans* és *C. parapsilosis* felismerését követő citokin indukcióban, a mononukleáris sejtek citokin termelését különböző MAPK inhibitorok jelenlétében vizsgáltuk. Azt tapasztaltuk, hogy mindhárom klasszikus MAPK gátlása szignifikánsan csökkentette mind a *C. parapsilosis*-szal, mind a *C. albicans*-szal stimulált mononukleáris sejtek TNFα, IL-1β, IL-6, IL-10 és IFNγ termelését (42. ábra). A csökkenés mértéke

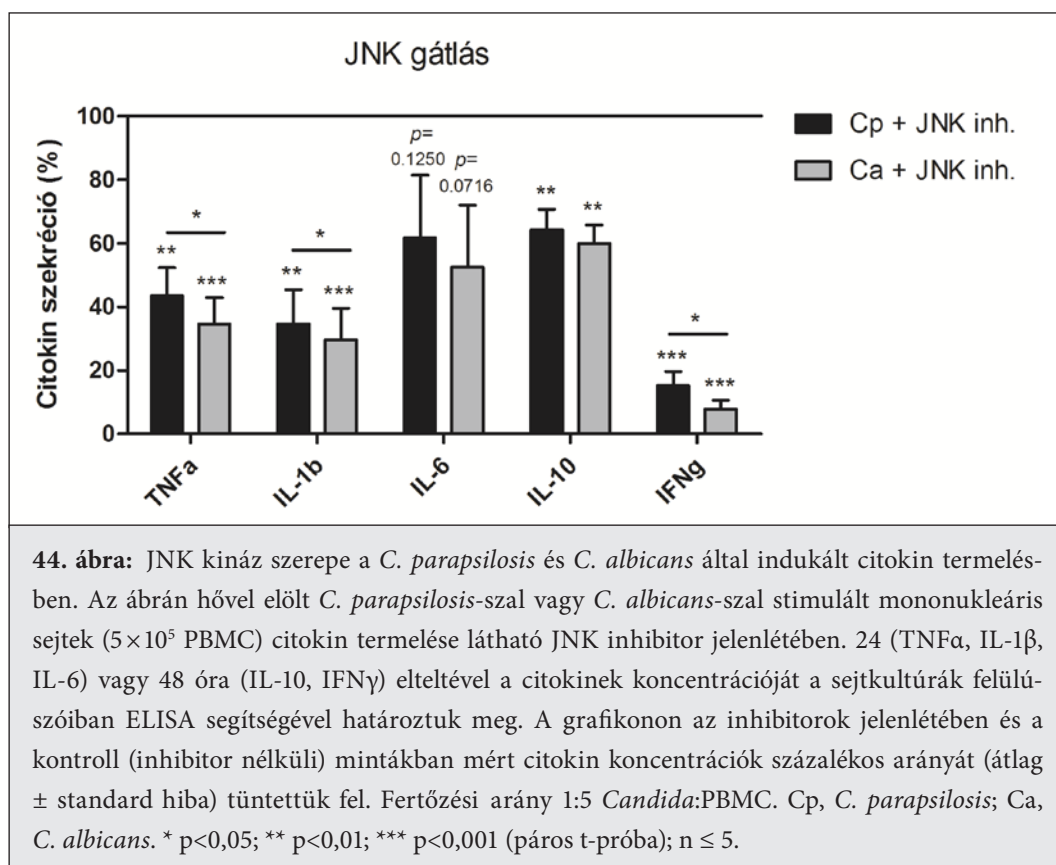
azonban különböző volt az egyes citokinek esetén. A p38 kináz gátlása legnagyobb mértékben az IL-1 β szintjét csökkentette mind *C. parapsilosis*-szal, mind *C. albicans*-szal stimulált mononukleáris sejtekben (42. ábra). Ugyanakkor a p38 kináz gátlása szignifikánsan nagyobb mértékben csökkentette a *C. parapsilosis*, mint a *C. albicans* által indukált TNF α , IL-1 β és IL-6 szekréciót.



Az ERK kináz gátlása esetén az IL-1 β , IL-6 és IFN γ szintjében tapasztaltuk a legnagyobb csökkenést. Továbbá, hasonlóan a p38 inhibíciónál tapasztaltakhoz, az ERK gátlása szignifikánsan nagyobb mértékben csökkentette a *C. parapsilosis*, mint a *C. albicans* által indukált TNF α , IL-1 β és IL-6 szekréciót (43. ábra). Ugyanakkor az ERK inhibitornak szignifikánsan nagyobb gátló hatása volt a *C. albicans*-szal stimulált, mint a *C. parapsilosis*-szal fertőzött sejtek IFN γ termelésére.



Míg a p38 kináz és az ERK gátlása szignifikánsan nagyobb mértékben csökkentette a *C. parapsilosis*, mint a *C. albicans* által indukált TNFα, IL-1β és IL-6 szekréciót, a JNK inhibíció a *C. albicans* által indukált TNFα, IL-1β és IFNγ termelésre volt nagyobb hatással (44. ábra). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy egyrészt mind a *C. parapsilosis*, mind a *C. albicans* felismerését követően több különböző jelátviteli útvonal aktiválódik, amelyek az egyes citokinek termelésének indukációjához vezetnek; másrészt, az egyes MAP kinázok citokin indukcióban betöltött szerepe különbözik *C. parapsilosis* és *C. albicans* stimuláció esetén.



Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a Dectin-1 receptor blokkolása következtében jelentősen csökkent a *C. parapsilosis*-szal vagy *C. albicans*-szal stimulált mononukleáris sejtek citokin termelése, ami arra utal, hogy ez a receptor mindkét faj felismerésében fontos szerepet játszik. A Dectin-1 szerepe a *C. albicans* és számos más gombafaj felismerésében régóta ismert [75], a *C. parapsilosis* esetében azonban még nem mutatták ki. Ezzel szemben kísérleti rendszerünkben a TLR4 nem játszott szerepet a *C. parapsilosis* vagy *C. albicans* által indukált citokin termelésben. Ugyan ismert, hogy a TLR4 képes felismerni a *C. albicans* O-mannánt és ennek következtében citokin termelést indukálni [81], bizonyították, hogy ez a receptor nem minden *C. albicans* törzs felismerésében játszik szerepet [83]. Továbbá, hőkezelés hatására megváltozik a *Candida* sejtek sejtfalszerkezete, és a belső réteget alkotó β-glükán jobban hozzáférhetővé válik [51]. Ezt az is bizonyítja, hogy a laminarin sokkal jobban gátolja a hővel elölt, mint az élő *C. albicans* sejtek által indukált citokin termelést [81]. A TLR2 szintén szerepet játszik a *C. albicans* elleni immunválaszban [49], és ismert az is, hogy ez a receptor együttműködik a Dectin-1-gyel a zimozán (*S. cerevisiae* β-1,3-glükán) által indukált citokin termelésben [99, 190]. A TLR2 monocitákban, makrofágokban és dendritikus sejtekben az ERK kináz aktivációján keresztül fokozza az IL-10 termelést, és ezáltal Th2 és Treg irányba tolja el a

Th polarizációt [49]. Továbbá, a *tlr2*^{-/-} egerek rezisztensebbek az invazív *C. albicans* fertőzéssel szemben [132]. Ennek ellenére mi azt tapasztaltuk, hogy bár a TLR2 blokkolása kismértékben csökkentette a *C. parapsilosis* és *C. albicans* által indukált IL-1 β és IL-6 termelést, a receptor gátlása nem csökkentette, sőt, kismértékben növelte a mononukleáris sejtek IL-10 szekrécióját. Ennek valószínűleg az lehet az oka, hogy kísérleti rendszerünkben a Dectin-1 receptor „felülírja” a TLR2 szerepét, mivel hővel előlt sejtek esetén a β -glükán a sejt falban könnyen hozzáférhetővé válik. Pro-inflammatorikus citokineken kívül, a Dectin-1 receptor az IL-10 termelését is indukálja [49], és ezzel összhangban a Dectin-1 receptor gátlása esetén csökkent IL-10 szintet tapasztaltunk. A Dectin-1, TLR4 és TLR2 blokkolása során sem tapasztaltunk azonban különbséget a *C. parapsilosis*-szal stimulált mononukleáris sejtek citokin termelésében a *C. albicans*-szal stimulált sejtek citokin szekréciójához képest, ami arra utal, hogy a két faj által indukált eltérő immunválasz kiváltásáért nem ezek a receptorok felelősek. Arra a kérdésre tehát, hogy különbözik-e a két patogén felismerése, további PRR-ok (TLR6, Dectin-2, mannóz receptor stb.) vizsgálata adhat választ. Mivel erre korábban nem volt lehetőségünk, ezen receptorok szerepének vizsgálata jelenleg folyik laboratóriumunkban.

A mintázatfelismerő receptorok vizsgálatán túlmenően kíváncsiak voltunk a receptorok által indukált jeltovábbításban részt vevő kinázok citokin indukcióban betöltött szerepére is. Ismert, hogy a MAPK kaszkád mind a TLR-ek, mind a CLR-ek által indított szignalizáció során aktiválódhat, az egyes MAP kinázok funkciója a különböző *Candida* fajok által kiváltott citokin indukcióban azonban kevésbé tisztázott. Annak érdekében, hogy információt nyerjünk ezen fehérjék szerepéről a *Candida* fajok felismerését követően, összehasonlítottuk a *C. parapsilosis*-szal és *C. albicans*-szal stimulált mononukleáris sejtek citokin termelését p38, ERK és JNK kináz inhibitor jelenlétében. Eredményeink megerősítik ezen kinázok szerepét a jelátvitelben a Dectin-1 aktivációja során, ugyanis mind a Dectin-1, mind a MAP kinázok blokkolása következtében jelentősen lecsökkent citokin szekréciót tapasztaltunk. Továbbá, bár a *C. parapsilosis*-szal és a *C. albicans*-szal stimulált sejtek citokin szekréciója hasonló mintázatot mutatott a MAP kinázok gátlása következtében (jelezve, hogy a két faj hasonló jelátviteli útvonalakat aktivál), bizonyos esetekben szignifikáns különbségeket tapasztaltunk a *C. parapsilosis*-szal és a *C. albicans*-szal stimulált sejtek citokin termelése között. Ezek az eredmények összességében arra utalnak, hogy a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* által kiváltott eltérő immunválasz mögött a MAP kinázok elérő aktivációja állhat, ami valószínűleg különböző PRR-ek aktivációjának, vagy a PRR-ek közötti együttműködés eltérő szabályozásának a következménye.

8. TOVÁBBI TERVEINK

A *C. parapsilosis* elleni immunválasz vizsgálata további terveink középpontjában áll. Mócsai Attila professzor kutatócsoportjával együttműködve kívánjuk vizsgálni a gyulladásos folyamatok szerepét a *C. parapsilosis* ellen kialakuló hatékony gazdaválaszban. Legújabb kutatási eredményeink arra utalnak ugyanis, hogy a *C. albicans*-hoz hasonlóan a *C. parapsilosis* is Syk-, ASC-, NLRP3-, és kaspáz-1 függő útvonalon keresztül indukálja az IL-1 β szekrécióját humán makrofágokban, az IL-1 β termelés beindulásához azonban hosszú inkubációra és viszonylag magas gomba sejtszámra van szükség. Bár egyelőre nem tisztázott, hogy az inflammaszóma aktív gátlása, vagy az aktivációs szignálok hiánya felelős az alacsony szintű IL-1 szekrécióért, immunológiai szempontból ennek mindenképpen nagy jelentősége van. Az IL-1 β többek között fontos szerepet játszik a Th17 sejtek differenciációjában [191], így hiánya a T-sejtes immunválaszt jelentősen befolyásolja. Így részben magyarázatot kaphatunk az előző fejezetben tárgyalt jelenségek mögötti mechanizmusokról. A továbbiakban IL-1 receptor, illetve NLRP3-deficiens egerek segítségével szeretnénk *in vivo* rendszerben vizsgálni az IL-1 β protektív szerepét *C. parapsilosis* fertőzés során. Tervezzük továbbá a T-sejtes immunválasz vizsgálatát is, különös tekintettel a T helper polarizáció (Th1, Th2, Th17 irányú differenciáció) tanulmányozására *in vivo* körülmények között. Legújabb kutatásainkban az egyik központi regulátor a Syk (spleen tyrosine kinase) kináz *C. parapsilosis* elleni immunválaszban betöltött szerepéről szeretnénk több információt nyerni. Ahogyan részletesen tárgyaltam korábban, a Syk fontos szerepet játszik a gombák elleni immunválasz kialakításában.

További céljaink között szerepel a Syk és a CARD9 szerepének alapos vizsgálata a *C. parapsilosis* ellen kialakuló immunválaszban. Egyik fő törekvésünk a Syk által vezérelt szignalizáció és a *C. parapsilosis* által kiváltott NLRP3 inflammaszóma aktiváció közötti kapcsolat felderítése. Fontos kiemelni, hogy az inflammaszóma aktivációja szorosan összefügg a különböző programozott sejthalál-útvonalakkal. Eredményeink alapján a *C. parapsilosis* viszonylag alacsony szintű nekrozist indukál makrofágokban, ami a „veszély” szignálok hiánya miatt részben felelős lehet a kismértékű inflammaszóma aktivációért. Kimutattuk azonban, hogy ASC és NLRP3 hiányában szignifikánsan csökken a *C. parapsilosis* által indukált sejthalál mértéke, ami arra utal, hogy nem csupán nekrozis, hanem valamilyen programozott sejthalál is lejátszódik a gazdasejtekben *C. parapsilosis* fertőzés esetén. A továbbiakban tervezzük a *C. parapsilosis* által

indukált sejthalál részletes vizsgálatát is. A két leggyakoribb gyulladásos folyamatokat kísérő programozott sejthalál forma a piroptózis és pironekrózis [192], amelyek molekuláris hátteréről azonban még viszonylag keveset tudunk. Mivel azonban a különböző sejthalál-formák jellegzetes morfológiai változásokkal járnak, a továbbiakban részletes mikroszkópos vizsgálatokat tervezünk a *C. parapsilosis* által kiváltott sejthalál tanulmányozása érdekében. A piroptózis például kiválóan vizsgálható fluoreszcens mikroszkópiával, GFP-vel kapcsolt ASC-t kifejező THP-1 sejtvonal segítségével [193]. Tervezünk továbbá elektronmikroszkópos vizsgálatokat is, melynek során elkülöníthetjük az apoptotikus, illetve nekrotikus sejteket. A későbbiekben ezek az eredmények hozzájárulhatnak ahhoz, hogy pontosabb képet alkothassunk egy általánosan alacsony gyulladásos választ indukáló patogén gomba ellen kialakuló immunválaszról.

9. A LEGFONTOSABB ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Az invazív *Candida* fertőzések világszerte komoly egészségügyi problémát jelentenek, amely főként a legyengült immunrendszerű betegeket veszélyezteti. 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 [16]. Továbbá, míg a *C. albicans* által okozott fertőzések száma hasonló gyermekek és felnőttek esetében, a *C. parapsilosis* fiatalokorúakban, különösen újszülöttekben, sokkal gyakrabban fordul elő [38]. 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. Ezen célkitűzések alapján elvégzett vizsgálataink főbb eredményei a következők:

9.1 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 [145]. Egy évvel később, ezen optimalizált szekvenciának egy másik változatát is kidolgozták, ahol a *C. albicans* *ACT1* promóter és *URA3* terminátor szekvenciáját alkalmazták (*caSAT1*) [146]. Ugyanezen munka során a *caSAT1* marker flipper variánsát is kidolgozták, lehetőséget nyitva több gén deléciójához, ugyanabban az organizmusban. A módszer sikeresen adaptáltuk és ennek eredményeként lehetővé vált a *C. parapsilosis* célzott genetikai módosítása.

9.2 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 [194], [150], [195]. 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 immunválaszát mind sejt szinten, mind pedig humorális szinten befolyásolják, ezáltal lehetőséget biztosítanak a gomba számára a gazdaszervezet kolonizációjához [160], [196], [197]. A gazdaszervezetből származó tápanyagok felhasználásán kívül hozzájárulnak még továbbá a gazdaszöveteken történő kitapadásához, a kompetitív mikroflóra líziséhez, valamint modulálhatják a gazda gyulladásos folyamatait, ami további szövetkárosodáshoz vezethet [160], [196].

Mindezidáig *Candida albicans*-ban 10 különböző lipáz enzim kódoló gént azonosítottak [150]. Ezen gének fertőzést követően különbözőképpen szabályozottak, valamint expressziójuk leginkább a fertőzés egy adott stádiumától függ [151]. Továbbá az egyes

gének különböző mértékben járulnak hozzá a gomba virulenciájához, melyek közül a *LIP5* és *LIP8* a leginkább kiemelték [151], [47].

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 mutatnak nagymértékű homológiát, ezért ezek a *LIP1* és *LIP2* elnevezést kapták [152]. Ezen gének *S. cerevisiae*-vel és *P. pastoris*-szal történő expresszáltatása során bebizonyult, hogy a két gén közül csak a *LIP2* kódol funkcionális fehérjét [152], [153].

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 [196]. Itt kell megemlíteni, hogy mivel a *C. parapsilosis* esetében csak két lipázt 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, a *C. albicans* esetében – ahogyan már említettem – 10 lipáz gént azonosítottak, amelyek egyidejű deléciója még ma is komoly kihívás (bár itt kívánom megjegyezni, hogy a napjainkban elterjedőben lévő CRISPR/CAS9 rendszer erre alkalmas lehet, hiszen ez a módszer alkalmas akár géncsaládok törlésére is, és folynak is ilyen irányú próbálkozások laborunkban, Prof. Geraldine Butler, Dublin, kutatócsoportjával együttműködésben). 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 [196].

Kidolgoztunk és továbbfejlesztettünk számos, a gazda-patogén kölcsönhatás vizsgálatára alkalmas rendszert, többek között egér makrofág sejtvonalakat, humán primer makrofágokat és dendritikus sejteket felhasználó rendszereket [196], [160], [198]. Mind az egér, mind pedig a humán forrásból származó makrofágok nagyobb hatékonysággal eliminálták 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 [196], [160], [198]. 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 mindkét esetben korai fago-lizoszóma aktiváció volt megfigyelhető [160], [198]. 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 megfigyelhetőek, úgymint atrófia, ödéma, és hasadékok megjelenése valamennyi szövetrétegben, ezek mellett a gazdasejtek apoptózisa is megfigyelhető volt [148]. Ezzel ellentétben a lipáz negatív *C. parapsilosis* törzzsel történő fertőzés során a szövetkárosodás minimális mértékű volt, és a fertőzött szövet jellegét tekintve inkább a kezeletlen kontrolléhoz volt hasonlítható [148]. 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 [148]. Mindezen eredmények arra utaltak, hogy a *C. parapsilosis* szekretált lipázok jelentős szerepet játszanak a gomba szövetekhez történő adhéziójában és szövetkárosításában.

A rágcsló vagy humán sejteket felhasználó modellrendszerek alkalmazása számos hasznos információt szolgáltatott a lipázok gazda-patogén kölcsönhatások során betöltött szerepéről, azonban a patológiás 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 [148], [158]. 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 [148].

Mivel ismeretes, hogy a *C. parapsilosis* fertőzések előfordulását tekintve az újszülötteknél, főleg alacsony születési súlyú csecsemők körében a gyakoribb [156], [157], 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 ismételten alacsonyabbnak bizonyult a gomba szervkolonizáló képessége a vad típusú törzzsel szemben [158].

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

9.3 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 [199]. *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 antimikrobiális proteinek bontására képesek, ezáltal elősegítve a mikroba szervezeten belüli terjedését [200], [201].

C. parapsilosis esetén ebben az időben (2009) Olga Hruskova-Heidingsfeldova és munkatársai sikeresen azonosították, tisztították és jellemezték a *C. parapsilosis* Sapp1 és Sapp2 fehérjeit [202], [203], 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 [203].

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 szekvenencia adatok felhasználásával elvégeztük a *SAPP1* lókuszt *in silico* analízisét. Az analízis két identikus 2871bp méretű szekvenciát azonosított egymástól 32kb távolságra, amely szakaszok egy-egy kópiában tartalmazták a *SAPP1* gént, így a két kópiát *SAPP1a* és *SAPP1b* néven különítettünk el egymástól. Geraldine Butler és munkatársai 2009 végén publikálták a *C. parapsilosis* annotált genomszekvenciáját [43], 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 $\Delta/\Delta\text{sapp1a}$ - $\Delta/\Delta\text{sapp1b}$ dupla deléciós törzset is. A *SAPP1* gének elvesztését a Sapp1 és Sapp2 fehérjék enzimaktivitásának vizsgálatára alkalmas HPLC módszerrel 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 [201], *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 [204]. Annak kiderítésére, hogy a Sapp1 fehérje rendelkezik-e hasonló szereppel, elvégeztük a vad típusú és a különböző Sapp1 mutáns törzsek szérumerzékenységének 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 fehérjének, hasonlóan a *C. albicans* Sap fehérjéhez, 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 [49]. Hogy ezeket a folyamatokat tanulmányozzuk, primer emberi sejteket használtunk modellként (PBMC és PBMC-DM sejtek). Áramlási citometriás méréseink szerint a vad típus-hoz 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 típussal 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 [205]. 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 gazdasejtek vad típusú és deléciós mutánsokkal szembeni gombaölési képességét. Mind a PBMC, mind az ezekből differenciáltatott 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.

9.4 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 elölt *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 mutatnak a *C. albicans*-szal fertőzött sejtekhez képest. A Th sejt citokinek 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.

9.5 A *C. parapsilosis* immunológiai felismerésében szerepet játszó receptorok azonosítása

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 indukciójában. Nem tapasztaltunk azonban jelentős különbséget a *C. parapsilosis*-szal és *C. albicans*-szal stimulált mononukleáris sejtek citokin termelésében a receptor blokkolók 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 egyéb receptorok aktivációja lehet felelős a két faj által indukált citokin termelés különbségeért. A potenciális további receptorok szerepének intenzív vizsgálata a *C. parapsilosis* felismerésében jelenleg folyik laboratóriumunkban.

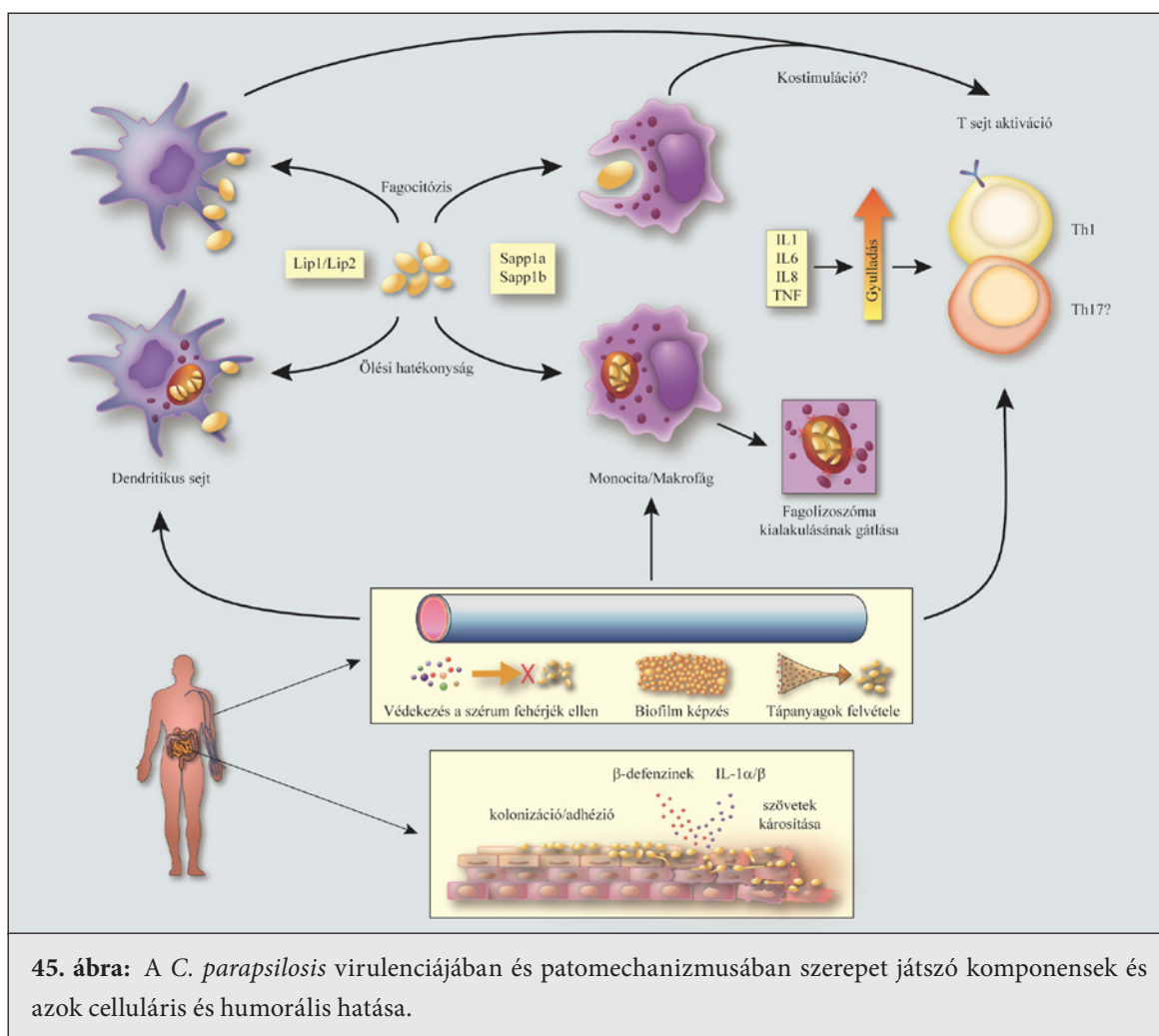
9.6 A *C. parapsilosis* felismerését követő intracelluláris jeltovábbítás elemeinek vizsgálata

A MAPK kaszkád 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- 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- 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 (45. 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 megbetegítőképesége mögött húzódó folyamatok hasonlóságaira és alapvető eltéréseire. Eredményeink rávilágítanak a különböző fajok tanulmányozásának fontosságára a *Candida* fertőzések mikrobiológiai és immunológiai hátterének kutatása során.



10. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK ÉS 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
2016-ban közlésre elfogadott publikációk	3

10.1 A dolgozatban felhasznált saját publikációk

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 *C. parapsilosis* Sensu Lato Species. *PLOS ONE* 8:(7) Paper e68704. 10 p. (2013) Független idéző: 13 Függő 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 Függő idéző: 1 Összesen: 6
10. Gácser 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 Függő 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 Függő idéző: 3 Összesen: 6
13. Tóth R, Alonso MF, Bain JM, Vágvolgyi C, Erwig L-P, Gácser 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)

10.2 A dolgozat témájához kapcsolódó egyéb saját publikációk

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, Mihu 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, Vágvölgyi 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)

11. IRODALOMJEGYZÉK

A dolgozat alapját képező doktori dolgozatok:

- Németh Tibor Mihály: Gazda – patogén kölcsönhatás vizsgálata *Candida* fertőzések során. 2014 SZTE, TTIK Mikrobiológiai Tanszék
 - Horváth Péter Ferenc: *Candida parapsilosis* szekretált aszpartil proteinázok virulenciában betöltött szerepének vizsgálata. 2014 SZTE, TTIK Mikrobiológiai Tanszék
 - Tóth Adél: Az opportunistá humánpatogén *Candida parapsilosis* élesztőgomba elleni természetes és adaptív immunválasz vizsgálata. 2015 SZTE, TTIK Mikrobiológiai Tanszék
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, Diekema DJ (2007) Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 20: 133-163.
 7. Matee MI, Scheutz F, Moshy J (2000) Occurrence of oral lesions in relation to clinical and immunological status among HIV-infected adult Tanzanians. *Oral Dis* 6: 106-111.
 8. Sobel JD (2007) Vulvovaginal candidosis. *Lancet* 369: 1961-1971.



9. Jarvis JN, Percival A, Bauman S, Pelfrey J, Meintjes G, et al. (2011) Evaluation of a novel point-of-care cryptococcal antigen test on serum, plasma, and urine from patients with HIV-associated cryptococcal meningitis. *Clin Infect Dis* 53: 1019-1023.
10. Marr KA, Balajee SA, McLaughlin L, Tabouret M, Bentsen C, et al. (2004) Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance. *J Infect Dis* 190: 641-649.
11. Obayashi T, Negishi K, Suzuki T, Funata N (2008) Reappraisal of the serum (1->3)-beta-D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections--a study based on autopsy cases from 6 years. *Clin Infect Dis* 46: 1864-1870.
12. Cole GT, Halawa AA, Anaissie EJ (1996) The role of the gastrointestinal tract in hematogenous candidiasis: from the laboratory to the bedside. *Clin Infect Dis* 22 Suppl 2: S73-88.
13. Fidel PL, Jr., Vazquez JA, Sobel JD (1999) *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev* 12: 80-96.
14. Yapar N (2014) Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Ther Clin Risk Manag* 10: 95-105.
15. Asmundsdottir LR, Erlendsdottir H, Haraldsson G, Guo H, Xu J, et al. (2008) Molecular epidemiology of candidemia: evidence of clusters of smoldering nosocomial infections. *Clin Infect Dis* 47: e17-24.
16. 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.
17. Arendrup MC (2010) Epidemiology of invasive candidiasis. *Curr Opin Crit Care* 16: 445-452.
18. Oeser C, Lamagni T, Heath PT, Sharland M, Ladhani S (2013) The epidemiology of neonatal and pediatric candidemia in England and Wales, 2000-2009. *Pediatr Infect Dis J* 32: 23-26.



19. Poikonen E, Lyytikäinen O, Anttila VJ, Koivula I, Lumio J, et al. (2010) Secular trend in candidemia and the use of fluconazole in Finland, 2004-2007. *BMC Infect Dis* 10: 312.
20. Ericsson J, Chryssanthou E, Klingspor L, Johansson AG, Ljungman P, et al. (2013) Candidaemia in Sweden: a nationwide prospective observational survey. *Clin Microbiol Infect* 19: E218-221.
21. Arendrup MC, Bruun B, Christensen JJ, Fuursted K, Johansen HK, et al. (2011) National surveillance of fungemia in Denmark (2004 to 2009). *J Clin Microbiol* 49: 325-334.
22. Puig-Asensio M, Padilla B, Garnacho-Montero J, Zaragoza O, Aguado JM, et al. (2014) Epidemiology and predictive factors for early and late mortality in Candida bloodstream infections: a population-based surveillance in Spain. *Clin Microbiol Infect* 20: O245-254.
23. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, et al. (2004) Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 39: 309-317.
24. Peman J, Canton E, Quindos G, Eraso E, Alcoba J, et al. (2012) Epidemiology, species distribution and in vitro antifungal susceptibility of fungaemia in a Spanish multicentre prospective survey. *J Antimicrob Chemother* 67: 1181-1187.
25. Nucci M, Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T, Tiraboschi IN, Cortes J, et al. (2013) Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. *PLoS One* 8: e59373.
26. Asmundsdottir LR, Erlendsdottir H, Gottfredsson M (2013) Nationwide study of candidemia, antifungal use, and antifungal drug resistance in Iceland, 2000 to 2011. *J Clin Microbiol* 51: 841-848.
27. Lockhart SR, Iqbal N, Cleveland AA, Farley MM, Harrison LH, et al. (2012) Species identification and antifungal susceptibility testing of Candida bloodstream isolates from population-based surveillance studies in two U.S. cities from 2008 to 2011. *J Clin Microbiol* 50: 3435-3442.
28. Wille MP, Guimaraes T, Furtado GH, Colombo AL (2013) Historical trends in the epidemiology of candidaemia: analysis of an 11-year period in a tertiary care hospital in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108.



29. Bustamante B, Martins MA, Bonfietti LX, Szeszs MW, Jacobs J, et al. (2014) Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* isolates from bloodstream infections in Lima, Peru. *J Med Microbiol* 63: 855-860.
30. Guinea J (2014) Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clin Microbiol Infect* 20 Suppl 6: 5-10.
31. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Ellis D, et al. (2010) Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* Species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *J Clin Microbiol* 48: 1366-1377.
32. Pfaller MA, Castanheira M, Messer SA, Moet GJ, Jones RN (2010) Variation in *Candida* spp. distribution and antifungal resistance rates among bloodstream infection isolates by patient age: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009). *Diagn Microbiol Infect Dis* 68: 278-283.
33. Gamaletsou MN, Walsh TJ, Zaoutis T, Pagoni M, Kotsopoulou M, et al. (2014) A prospective, cohort, multicentre study of candidaemia in hospitalized adult patients with haematological malignancies. *Clin Microbiol Infect* 20: O50-57.
34. Sinko J, Sulyok M, Denning DW (2015) Burden of serious fungal diseases in Hungary. *Mycoses* 58 Suppl 5: 29-33.
35. Doczi I, Peto Z, Fodor E, Bereczki L, Nagy E, et al. (2012) Evaluation of fungaemia infections in a Hungarian university hospital between 1996 and 2009. *Acta Microbiol Immunol Hung* 59: 29-41.
36. Pongracz J, Juhasz E, Ivan M, Kristof K (2015) Significance of yeasts in bloodstream infection: Epidemiology and predisposing factors of *Candida*emia in adult patients at a university hospital (2010-2014). *Acta Microbiol Immunol Hung* 62: 317-329.
37. Kristof K, Janik L, Komka K, Harmath A, Hajdu J, et al. (2010) Clinical microbiology of neonatal candidiasis in Hungary. *Acta Microbiol Immunol Hung* 57: 407-417.
38. 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.



39. Peman J, Canton E, Linares-Sicilia MJ, Rosello EM, Borrell N, et al. (2011) Epidemiology and antifungal susceptibility of bloodstream fungal isolates in pediatric patients: a Spanish multicenter prospective survey. *J Clin Microbiol* 49: 4158-4163.
40. Trofa D, Gacser A, Nosanchuk JD (2008) *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev* 21: 606-625.
41. Pappas PG, Rex JH, Lee J, Hamill RJ, Larsen RA, et al. (2003) A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clin Infect Dis* 37: 634-643.
42. Massey SE, Moura G, Beltrao P, Almeida R, Garey JR, et al. (2003) Comparative evolutionary genomics unveils the molecular mechanism of reassignment of the CTG codon in *Candida* spp. *Genome Res* 13: 544-557.
43. 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.
44. Lo HJ, Kohler JR, DiDomenico B, Loebenberg D, Cacciapuoti A, et al. (1997) Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* 90: 939-949.
45. Dominguez de Maria P, Sanchez-Montero JM, Sinisterra JV, Alcantara AR (2006) Understanding *Candida rugosa* lipases: an overview. *Biotechnol Adv* 24: 180-196.
46. Monod M, Borg-von ZM (2002) Secreted aspartic proteases as virulence factors of *Candida* species. *Biol Chem* 383: 1087-1093.
47. Gacser 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.
48. Noble SM, Johnson AD (2007) Genetics of *Candida albicans*, a diploid human fungal pathogen. *Annu Rev Genet* 41: 193-211.
49. 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.
50. Ruiz-Herrera J, Elorza MV, Valentin E, Sentandreu R (2006) Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res* 6: 14-29.
51. Gantner BN, Simmons RM, Underhill DM (2005) Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *EMBO J* 24: 1277-1286.

52. Marakalala MJ, Vautier S, Potrykus J, Walker LA, Shepardson KM, et al. (2013) Differential adaptation of *Candida albicans* in vivo modulates immune recognition by dectin-1. *PLoS Pathog* 9: e1003315.
53. Nosek J, Holesova Z, Kosa P, Gacser A, Tomaska L (2009) Biology and genetics of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Curr Genet* 55: 497-509.
54. Lin D, Wu LC, Rinaldi MG, Lehmann PF (1995) Three distinct genotypes within *Candida parapsilosis* from clinical sources. *J Clin Microbiol* 33: 1815-1821.
55. Tavanti A, Davidson AD, Gow NA, Maiden MC, Odds FC (2005) *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol* 43: 284-292.
56. Bertini A, De Bernardis F, Hensgens LA, Sandini S, Senesi S, et al. (2013) Comparison of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* adhesive properties and pathogenicity. *Int J Med Microbiol* 303: 98-103.
57. Sai S, Holland LM, McGee CF, Lynch DB, Butler G (2011) Evolution of mating within the *Candida parapsilosis* species group. *Eukaryot Cell* 10: 578-587.
58. Pryszcz LP, Nemeth T, Gacser A, Gabaldon T (2013) Unexpected genomic variability in clinical and environmental strains of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Genome Biol Evol* 5: 2382-2392.
59. Logue ME, Wong S, Wolfe KH, Butler G (2005) A genome sequence survey shows that the pathogenic yeast *Candida parapsilosis* has a defective *MTLa1* allele at its mating type locus. *Eukaryot Cell* 4: 1009-1017.
60. Mayer FL, Wilson D, Hube B (2013) *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* 4: 119-128.
61. Falgier C, Kegley S, Podgorski H, Heisel T, Storey K, et al. (2011) *Candida* species differ in their interactions with immature human gastrointestinal epithelial cells. *Pediatr Res* 69: 384-389.
62. Gacser A (2015) Adhesins in *Candida parapsilosis*: understudied players in virulence. *Virulence*: 0.
63. Krcmery V, Barnes AJ (2002) Non-*albicans* *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect* 50: 243-260.
64. Abi-Said D, Anaissie E, Uzun O, Raad I, Pinzcowski H, et al. (1997) The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. *Clin Infect Dis* 24: 1122-1128.

65. Emerson RJt, Camesano TA (2004) Nanoscale investigation of pathogenic microbial adhesion to a biomaterial. *Appl Environ Microbiol* 70: 6012-6022.
66. Panagoda GJ, Ellepola AN, Samaranayake LP (2001) Adhesion of *Candida parapsilosis* to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hydrophobicity. *Mycoses* 44: 29-35.
67. Fernanado PH, Panagoda GJ, Samaranayake LP (1999) The relationship between the acid and alkaline phosphatase activity and the adherence of clinical isolates of *Candida parapsilosis* to human buccal epithelial cells. *APMIS* 107: 1034-1042.
68. Kantarcioglu AS, Yucel A (2002) Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses* 45: 160-165.
69. Hamal P, Dostal J, Raclavsky V, Krylova M, Pichova I, et al. (2004) Secreted aspartate proteinases, a virulence factor of *Candida* spp.: occurrence among clinical isolates. *Folia Microbiol (Praha)* 49: 491-496.
70. Brown GD, Gordon S (2001) Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature* 413: 36-37.
71. Hernandez-Santos N, Gaffen SL (2012) Th17 cells in immunity to *Candida albicans*. *Cell Host Microbe* 11: 425-435.
72. van de Veerdonk FL, Netea MG (2010) T-cell Subsets and Antifungal Host Defenses. *Curr Fungal Infect Rep* 4: 238-243.
73. LeibundGut-Landmann S, Gross O, Robinson MJ, Osorio F, Slack EC, et al. (2007) Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat Immunol* 8: 630-638.
74. Brown GD (2011) Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes. *Annu Rev Immunol* 29: 1-21.
75. Romani L (2011) Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol* 11: 275-288.
76. Janeway CA, Jr. (1989) Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54 Pt 1: 1-13.
77. Plato A, Hardison SE, Brown GD (2015) Pattern recognition receptors in antifungal immunity. *Semin Immunopathol* 37: 97-106.
78. Bellocchio S, Montagnoli C, Bozza S, Gaziano R, Rossi G, et al. (2004) The contribution of the Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens in vivo. *J Immunol* 172: 3059-3069.
79. Kumar H, Kawai T, Akira S (2011) Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 30: 16-34.



80. Netea MG, Gow NA, Munro CA, Bates S, Collins C, et al. (2006) Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J Clin Invest* 116: 1642-1650.
81. Netea MG, Van Der Graaf CA, Vonk AG, Verschueren I, Van Der Meer JW, et al. (2002) The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. *J Infect Dis* 185: 1483-1489.
82. Netea MG, Gow NA, Joosten LA, Verschueren I, van der Meer JW, et al. (2010) Variable recognition of *Candida albicans* strains by TLR4 and lectin recognition receptors. *Med Mycol* 48: 897-903.
83. Jouault T, Ibata-Ombetta S, Takeuchi O, Trinel PA, Sacchetti P, et al. (2003) *Candida albicans* phospholipomannan is sensed through toll-like receptors. *J Infect Dis* 188: 165-172.
84. Wagener J, Malireddi RK, Lenardon MD, Koberle M, Vautier S, et al. (2014) Fungal chitin dampens inflammation through IL-10 induction mediated by NOD2 and TLR9 activation. *PLoS Pathog* 10: e1004050.
85. Biondo C, Malara A, Costa A, Signorino G, Cardile F, et al. (2012) Recognition of fungal RNA by TLR7 has a nonredundant role in host defense against experimental candidiasis. *Eur J Immunol* 42: 2632-2643.
86. Jaeger M, van der Lee R, Cheng SC, Johnson MD, Kumar V, et al. (2015) The RIG-I-like helicase receptor MDA5 (IFIH1) is involved in the host defense against *Candida* infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*.
87. Zhong Y, Kinio A, Saleh M (2013) Functions of NOD-Like Receptors in Human Diseases. *Front Immunol* 4: 333.
88. Zelensky AN, Gready JE (2005) The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J* 272: 6179-6217.
89. Hardison SE, Brown GD (2012) C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity. *Nat Immunol* 13: 817-822.
90. Steele C, Rapaka RR, Metz A, Pop SM, Williams DL, et al. (2005) The beta-glucan receptor dectin-1 recognizes specific morphologies of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog* 1: e42.
91. Taylor PR, Tsoni SV, Willment JA, Dennehy KM, Rosas M, et al. (2007) Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection. *Nat Immunol* 8: 31-38.



92. Saijo S, Fujikado N, Furuta T, Chung SH, Kotaki H, et al. (2007) Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans*. *Nat Immunol* 8: 39-46.
93. Ferwerda B, Ferwerda G, Plantinga TS, Willment JA, van Spriel AB, et al. (2009) Human dectin-1 deficiency and mucocutaneous fungal infections. *N Engl J Med* 361: 1760-1767.
94. Plato A, Willment JA, Brown GD (2013) C-type lectin-like receptors of the dectin-1 cluster: ligands and signaling pathways. *Int Rev Immunol* 32: 134-156.
95. Xu S, Huo J, Lee KG, Kurosaki T, Lam KP (2009) Phospholipase Cgamma2 is critical for Dectin-1-mediated Ca^{2+} flux and cytokine production in dendritic cells. *J Biol Chem* 284: 7038-7046.
96. Hara H, Saito T (2009) CARD9 versus CARMA1 in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 30: 234-242.
97. Gringhuis SI, den Dunnen J, Litjens M, van der Vlist M, Wevers B, et al. (2009) Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF-kappaB activation through Raf-1 and Syk. *Nat Immunol* 10: 203-213.
98. Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM (2003) Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med* 197: 1107-1117.
99. Hoving JC, Wilson GJ, Brown GD (2014) Signalling C-type lectin receptors, microbial recognition and immunity. *Cell Microbiol* 16: 185-194.
100. Robinson MJ, Osorio F, Rosas M, Freitas RP, Schweighoffer E, et al. (2009) Dectin-2 is a Syk-coupled pattern recognition receptor crucial for Th17 responses to fungal infection. *J Exp Med* 206: 2037-2051.
101. van de Veerdonk FL, Marijnissen RJ, Kullberg BJ, Koenen HJ, Cheng SC, et al. (2009) The macrophage mannose receptor induces IL-17 in response to *Candida albicans*. *Cell Host Microbe* 5: 329-340.
102. Jouault T, El Abed-El Behi M, Martinez-Esparza M, Breuilh L, Trinel PA, et al. (2006) Specific recognition of *Candida albicans* by macrophages requires galectin-3 to discriminate *Saccharomyces cerevisiae* and needs association with TLR2 for signaling. *J Immunol* 177: 4679-4687.
103. Linden JR, De Paepe ME, Laforce-Nesbitt SS, Bliss JM (2013) Galectin-3 plays an important role in protection against disseminated candidiasis. *Med Mycol* 51: 641-651.

104. Walsh TJ, Gamaletsou MN (2013) Treatment of fungal disease in the setting of neutropenia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2013: 423-427.
105. Fradin C, De Groot P, MacCallum D, Schaller M, Klis F, et al. (2005) Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Mol Microbiol* 56: 397-415.
106. Cheng SC, Joosten LA, Kullberg BJ, Netea MG (2012) Interplay between *Candida albicans* and the mammalian innate host defense. *Infect Immun* 80: 1304-1313.
107. Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A (2006) Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol* 8: 668-676.
108. Smeeckens SP, van de Veerdonk FL, Joosten LA, Jacobs L, Jansen T, et al. (2011) The classical CD14(+)(+) CD16(-) monocytes, but not the patrolling CD14(+) CD16(+) monocytes, promote Th17 responses to *Candida albicans*. *Eur J Immunol* 41: 2915-2924.
109. Kim HS, Choi EH, Khan J, Roilides E, Francesconi A, et al. (2005) Expression of genes encoding innate host defense molecules in normal human monocytes in response to *Candida albicans*. *Infect Immun* 73: 3714-3724.
110. Netea MG, van Tits LJ, Curfs JH, Amiot F, Meis JF, et al. (1999) Increased susceptibility of TNF-alpha lymphotoxin-alpha double knockout mice to systemic candidiasis through impaired recruitment of neutrophils and phagocytosis of *Candida albicans*. *J Immunol* 163: 1498-1505.
111. Romani L, Mencacci A, Cenci E, Spaccapelo R, Toniatti C, et al. (1996) Impaired neutrophil response and CD4+ T helper cell 1 development in interleukin 6-deficient mice infected with *Candida albicans*. *J Exp Med* 183: 1345-1355.
112. Hise AG, Tomalka J, Ganesan S, Patel K, Hall BA, et al. (2009) An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Cell Host Microbe* 5: 487-497.
113. Gladiator A, LeibundGut-Landmann S (2013) Innate lymphoid cells: new players in IL-17-mediated antifungal immunity. *PLoS Pathog* 9: e1003763.
114. Gladiator A, Wangler N, Trautwein-Weidner K, LeibundGut-Landmann S (2013) Cutting edge: IL-17-secreting innate lymphoid cells are essential for host defense against fungal infection. *J Immunol* 190: 521-525.
115. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B (2012) CD4(+)T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol* 2012: 925135.

116. Mosmann TR, Coffman RL (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7: 145-173.
117. Shevach EM (2001) Certified professionals: CD4(+)CD25(+) suppressor T cells. *J Exp Med* 193: F41-46.
118. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, et al. (2005) A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 6: 1133-1141.
119. Borghi M, Renga G, Puccetti M, Oikonomou V, Palmieri M, et al. (2014) Antifungal Th Immunity: Growing up in Family. *Front Immunol* 5: 506.
120. Balish E, Wagner RD, Vazquez-Torres A, Pierson C, Warner T (1998) Candidiasis in interferon-gamma knockout (IFN-gamma^{-/-}) mice. *J Infect Dis* 178: 478-487.
121. Haraguchi N, Ishii Y, Morishima Y, Yoh K, Matsuno Y, et al. (2010) Impairment of host defense against disseminated candidiasis in mice overexpressing GATA-3. *Infect Immun* 78: 2302-2311.
122. Wuthrich M, Deepe GS, Jr., Klein B (2012) Adaptive immunity to fungi. *Annu Rev Immunol* 30: 115-148.
123. Romani L, Bistoni F, Puccetti P (2002) Fungi, dendritic cells and receptors: a host perspective of fungal virulence. *Trends Microbiol* 10: 508-514.
124. Shen F, Gaffen SL (2008) Structure-function relationships in the IL-17 receptor: implications for signal transduction and therapy. *Cytokine* 41: 92-104.
125. Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y (2008) The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* 28: 454-467.
126. Huang W, Na L, Fidel PL, Schwarzenberger P (2004) Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida albicans host defense in mice. *J Infect Dis* 190: 624-631.
127. Conti HR, Shen F, Nayyar N, Stocum E, Sun JN, et al. (2009) Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *J Exp Med* 206: 299-311.
128. Eyerich K, Foerster S, Rombold S, Seidl HP, Behrendt H, et al. (2008) Patients with chronic mucocutaneous candidiasis exhibit reduced production of Th17-associated cytokines IL-17 and IL-22. *J Invest Dermatol* 128: 2640-2645.

129. Puel A, Cypowyj S, Bustamante J, Wright JF, Liu L, et al. (2011) Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. *Science* 332: 65-68.
130. Glocker EO, Hennigs A, Nabavi M, Schaffer AA, Woellner C, et al. (2009) A homozygous CARD9 mutation in a family with susceptibility to fungal infections. *N Engl J Med* 361: 1727-1735.
131. van de Veerdonk FL, Joosten LA, Shaw PJ, Smeekens SP, Malireddi RK, et al. (2011) The inflammasome drives protective Th1 and Th17 cellular responses in disseminated candidiasis. *Eur J Immunol* 41: 2260-2268.
132. Netea MG, Suttmüller R, Hermann C, Van der Graaf CA, Van der Meer JW, et al. (2004) Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J Immunol* 172: 3712-3718.
133. Kroetz DN, Deepe GS, Jr. (2010) CCR5 dictates the equilibrium of proinflammatory IL-17+ and regulatory Foxp3+ T cells in fungal infection. *J Immunol* 184: 5224-5231.
134. McKinley L, Logar AJ, McAllister F, Zheng M, Steele C, et al. (2006) Regulatory T cells dampen pulmonary inflammation and lung injury in an animal model of pneumocystis pneumonia. *J Immunol* 177: 6215-6226.
135. Leung S, Liu X, Fang L, Chen X, Guo T, et al. (2010) The cytokine milieu in the interplay of pathogenic Th1/Th17 cells and regulatory T cells in autoimmune disease. *Cell Mol Immunol* 7: 182-189.
136. Linden JR, Kunkel D, Laforce-Nesbitt SS, Bliss JM (2013) The role of galectin-3 in phagocytosis of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* by human neutrophils. *Cell Microbiol* 15: 1127-1142.
137. Moyes DL, Murciano C, Runglall M, Kohli A, Islam A, et al. (2012) Activation of MAPK/c-Fos induced responses in oral epithelial cells is specific to *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* hyphae. *Med Microbiol Immunol* 201: 93-101.
138. Bahri R, Curt S, Saidane-Mosbahi D, Rouabhia M (2010) Normal human gingival epithelial cells sense *C. parapsilosis* by toll-like receptors and module its pathogenesis through antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines. *Mediators Inflamm* 2010: 940383.
139. Kohler GA, White TC, Agabian N (1997) Overexpression of a cloned IMP dehydrogenase gene of *Candida albicans* confers resistance to the specific inhibitor mycophenolic acid. *J Bacteriol* 179: 2331-2338.

140. Staib P, Kretschmar M, Nichterlein T, Hof H, Morschhauser J (2000) Differential activation of a *Candida albicans* virulence gene family during infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 6102-6107.
141. Strauss A, Michel S, Morschhauser J (2001) Analysis of phase-specific gene expression at the single-cell level in the white-opaque switching system of *Candida albicans*. *J Bacteriol* 183: 3761-3769.
142. Gacser A, Salomon S, Schafer W (2005) Direct transformation of a clinical isolate of *Candida parapsilosis* using a dominant selection marker. *FEMS Microbiol Lett* 245: 117-121.
143. Kosa P, Gavenciakova B, Nosek J (2007) Development of a set of plasmid vectors for genetic manipulations of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Gene* 396: 338-345.
144. Morschhauser J, Staib P, Kohler G (2005) Targeted gene deletion in *Candida albicans* wild-type strains by MPAR flipping. *Methods Mol Med* 118: 35-44.
145. 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.
146. 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.
147. Fonzi WA, Irwin MY (1993) Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* 134: 717-728.
148. Gacser 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.
149. Gacser A, Schafer W, Nosanchuk JS, Salomon S, Nosanchuk JD (2007) Virulence of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in reconstituted human tissue models. *Fungal Genet Biol* 44: 1336-1341.
150. 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.
151. Stehr F, Felk A, Gacser 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.



152. 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.
153. 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.
154. Hernandez R, Rupp S (2009) Human epithelial model systems for the study of *Candida* infections in vitro: part II. Histologic methods for studying fungal invasion. *Methods Mol Biol* 470: 105-123.
155. Miliotis MD (1991) Acridine orange stain for determining intracellular enteropathogens in HeLa cells. *J Clin Microbiol* 29: 830-831.
156. 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.
157. 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.
158. Trofa D, Soghier L, Long C, Nosanchuk JD, Gacser 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.
159. Toth R, Alonso MF, Bain JM, Vagvolgyi C, Erwig LP, et al. (2015) Different *Candida parapsilosis* clinical isolates and lipase deficient strain trigger an altered cellular immune response. *Front Microbiol* 6: 1102.
160. 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.
161. Trofa D, Agovino M, Stehr F, Schafer W, Rykunov D, et al. (2009) Acetylsalicylic acid (aspirin) reduces damage to reconstituted human tissues infected with *Candida* species by inhibiting extracellular fungal lipases. *Microbes Infect* 11: 1131-1139.
162. Orsi CF, Colombari B, Blasi E (2010) *Candida metapsilosis* as the least virulent member of the '*C. parapsilosis*' complex. *Med Mycol* 48: 1024-1033.

163. Bonfietti LX, Martins Mdos A, Szeszs MW, Pukiskas SB, Purisco SU, et al. (2012) Prevalence, distribution and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* bloodstream isolates. *J Med Microbiol* 61: 1003-1008.
164. Garcia-Effron G, Canton E, Peman J, Dilger A, Roma E, et al. (2012) Epidemiology and echinocandin susceptibility of *Candida parapsilosis* sensu lato species isolated from bloodstream infections at a Spanish university hospital. *J Antimicrob Chemother* 67: 2739-2748.
165. Pryszcz LP, Nemeth T, Saus E, Ksiezopolska E, Hegedusova E, et al. (2015) The Genomic Aftermath of Hybridization in the Opportunistic Pathogen *Candida metapsilosis*. *PLoS Genet* 11: e1005626.
166. Pryszcz LP, Nemeth T, Gacser A, Gabaldon T (2014) Genome comparison of *Candida orthopsilosis* clinical strains reveals the existence of hybrids between two distinct subspecies. *Genome Biol Evol* 6: 1069-1078.
167. Yan L, Yang C, Tang J (2013) Disruption of the intestinal mucosal barrier in *Candida albicans* infections. *Microbiol Res* 168: 389-395.
168. Ott SJ, Kuhbacher T, Musfeldt M, Rosenstiel P, Hellmig S, et al. (2008) Fungi and inflammatory bowel diseases: Alterations of composition and diversity. *Scand J Gastroenterol* 43: 831-841.
169. Weide MR, Ernst JF (1999) Caco-2 monolayer as a model for transepithelial migration of the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mycoses* 42 Suppl 2: 61-67.
170. Selsted ME, Ouellette AJ (2005) Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat Immunol* 6: 551-557.
171. Saegusa S, Totsuka M, Kaminogawa S, Hosoi T (2007) Cytokine responses of intestinal epithelial-like Caco-2 cells to non-pathogenic and opportunistic pathogenic yeasts in the presence of butyric acid. *Biosci Biotechnol Biochem* 71: 2428-2434.
172. Lehrer RI, Ganz T, Szklarek D, Selsted ME (1988) Modulation of the in vitro candidacidal activity of human neutrophil defensins by target cell metabolism and divalent cations. *J Clin Invest* 81: 1829-1835.
173. Aerts AM, Francois IE, Cammue BP, Thevissen K (2008) The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins. *Cell Mol Life Sci* 65: 2069-2079.

174. Smeekens SP, van de Veerdonk FL, van der Meer JW, Kullberg BJ, Joosten LA, et al. (2010) The *Candida* Th17 response is dependent on mannan- and beta-glucan-induced prostaglandin E2. *Int Immunol* 22: 889-895.
175. van der Graaf CA, Netea MG, Verschueren I, van der Meer JW, Kullberg BJ (2005) Differential cytokine production and Toll-like receptor signaling pathways by *Candida albicans* blastoconidia and hyphae. *Infect Immun* 73: 7458-7464.
176. Wang ZY, Sato H, Kusam S, Sehra S, Toney LM, et al. (2005) Regulation of IL-10 gene expression in Th2 cells by Jun proteins. *J Immunol* 174: 2098-2105.
177. De Luca A, Montagnoli C, Zelante T, Bonifazi P, Bozza S, et al. (2007) Functional yet balanced reactivity to *Candida albicans* requires TRIF, MyD88, and IDO-dependent inhibition of Rorc. *J Immunol* 179: 5999-6008.
178. Romani L, Puccetti P (2006) Protective tolerance to fungi: the role of IL-10 and tryptophan catabolism. *Trends Microbiol* 14: 183-189.
179. Chirico G, Maccario R, Montagna D, Chiara A, Gasparoni A, et al. (1990) Natural killer cell activity in preterm infants: effect of intravenous immune globulin administration. *J Pediatr* 117: 465-466.
180. Chirico G, Marconi M, De Amici M, Gasparoni A, Mingrat G, et al. (1985) Deficiency of neutrophil bactericidal activity in term and preterm infants. A longitudinal study. *Biol Neonate* 47: 125-129.
181. Black A, Bhaumik S, Kirkman RL, Weaver CT, Randolph DA (2012) Developmental regulation of Th17-cell capacity in human neonates. *Eur J Immunol* 42: 311-319.
182. Destin KG, Linden JR, Laforce-Nesbitt SS, Bliss JM (2009) Oxidative burst and phagocytosis of neonatal neutrophils confronting *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*. *Early Hum Dev* 85: 531-535.
183. Sathaliyawala T, Kubota M, Yudanin N, Turner D, Camp P, et al. (2013) Distribution and compartmentalization of human circulating and tissue-resident memory T cell subsets. *Immunity* 38: 187-197.
184. Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, et al. (2007) Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* 8: 639-646.
185. Liu Y, Yang B, Zhou M, Li L, Zhou H, et al. (2009) Memory IL-22-producing CD4⁺ T cells specific for *Candida albicans* are present in humans. *Eur J Immunol* 39: 1472-1479.

186. Wuthrich M, Hung CY, Gern BH, Pick-Jacobs JC, Galles KJ, et al. (2011) A TCR transgenic mouse reactive with multiple systemic dimorphic fungi. *J Immunol* 187: 1421-1431.
187. Popa C, Abdollahi-Roodsaz S, Joosten LA, Takahashi N, Sprong T, et al. (2007) Bartonella quintana lipopolysaccharide is a natural antagonist of Toll-like receptor 4. *Infect Immun* 75: 4831-4837.
188. Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M (2004) AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci* 117: 5965-5973.
189. Kawai T, Akira S (2006) TLR signaling. *Cell Death Differ* 13: 816-825.
190. Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Marshall AS, et al. (2003) Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med* 197: 1119-1124.
191. Cheng SC, van de Veerdonk FL, Lenardon M, Stoffels M, Plantinga T, et al. (2011) The dectin-1/inflammasome pathway is responsible for the induction of protective T-helper 17 responses that discriminate between yeasts and hyphae of *Candida albicans*. *J Leukoc Biol* 90: 357-366.
192. Yang Y, Jiang G, Zhang P, Fan J (2015) Programmed cell death and its role in inflammation. *Mil Med Res* 2: 12.
193. Fernandes-Alnemri T, Wu J, Yu JW, Datta P, Miller B, et al. (2007) The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell Death Differ* 14: 1590-1604.
194. 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.
195. Ghannoum MA (2000) Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 13: 122-143, table of contents.
196. Attila Gácser 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.
197. 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.
198. 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.



199. Hube B, Naglik J (2001) *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology* 147: 1997-2005.
200. Hube B (1998) Possible role of secreted proteinases in *Candida albicans* infections. *Rev Iberoam Micol* 15: 65-68.
201. 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.
202. Dostal J, Dlouha H, Malon P, Pichova I, Hruskova-Heidingsfeldova O (2005) The precursor of secreted aspartic proteinase Sapp1p from *Candida parapsilosis* can be activated both autocatalytically and by a membrane-bound processing proteinase. *Biol Chem* 386: 791-799.
203. 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.
204. 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.
205. 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.