

**AZ OPPORTUNISTA HUMÁNPATOGÉN *CANDIDA PARAPSILOSIS*
ÉLESZTŐGOMBA ELLENI TERMÉSZETES ÉS ADAPTÍV
IMMUNVÁLASZ VIZSGÁLATA**

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

TÓTH ADÉL

TÉMAVEZETŐ:

**DR. GÁCSEI ATTILA
TUDOMÁNYOS FŐMUNKATÁRS**

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA



**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR
MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK**

SZEGED

2015

Tartalomjegyzék

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
2. BEVEZETÉS	7
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	9
3.1. AZ OPPORTUNISTA GOMBAFERTŐZÉSEK KLINIKAI JELENTŐSÉGE.....	9
3.2. AZ INVAZÍV <i>CANDIDA</i> FERTŐZÉSEK EPIDEMIOLOGIÁJA	11
3.3. A <i>C. PARAPSILOSIS</i> FERTŐZÉS EPIDEMIOLOGIÁJA	15
3.4. A <i>CANDIDA</i> NEMZETSÉG ÉS A <i>C. ALBICANS</i> ÁLTALÁNOS JELLEMZÉSE	16
3.5. A <i>C. PARAPSILOSIS</i> ÁLTALÁNOS JELLEMZÉSE	18
3.6. A GOMBÁK ELLEN KIALAKULÓ IMMUNVÁLASZ	19
3.6.1. <i>Patogén gombák elleni természetes immunitás</i>	21
3.6.1.1. Mintázatfelismerő receptorok.....	21
3.6.1.1.1. Toll-szerű receptorok (TLR).....	21
3.6.1.1.2. RIG-I-szerű receptorok (RLR).....	24
3.6.1.1.3. C-típusú lektin receptorok (CLR)	24
3.6.1.1.4. NOD-szerű receptorok (NLR)	27
3.6.1.2. Az inflammaszómák	27
3.6.1.2.1. Az IL-1 β élettani szerepe	29
3.6.1.2.2. Az inflammaszóma aktiváció szerepe a gombák elleni immunválaszban	30
3.6.1.3. A természetes immunitás effektor sejtjei.....	31
3.6.2. <i>A gombák ellen kialakuló adaptív immunválasz</i>	33
3.6.2.1. T-sejtes immunválasz	33
3.6.2.1.1. Th1 sejtek.....	34
3.6.2.1.2. Th2 sejtek.....	35
3.6.2.1.3. Th17 sejtek.....	36
3.6.2.1.4. Treg sejtek.....	37
3.6.2.1.5. CD8 ⁺ T-sejtek	37
3.6.2.1.6. $\gamma\delta$ T-sejtek.....	37
3.6.2.2. B-sejtes immunválasz	38
3.6.3. <i>A C. parapsilosis elleni immunválasz</i>	38
4. CÉLKITŰZÉSEK	40
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	41
5.1. ALKALMAZOTT <i>CANDIDA</i> TÖRZSEK ÉS HUMÁN SEJTKULTÚRÁK.....	41
5.1.1. <i>Alkalmazott Candida törzsek</i>	41
5.1.2. <i>Alkalmazott humán sejt kultúrák</i>	42
5.2. TÁPTALAJOK, TÁPOLDATOK, PUFFEREK ÉS EGYÉB REAGENSEK.....	42
5.3. ALKALMAZOTT INHIBITOROK.....	43
5.4. SEJT TENYÉSZTÉS, PRIMER SEJTEK IZOLÁLÁSA.....	44

5.5. KÍSÉRLETI MÓDSZEREK	46
5.5.1. <i>In vitro</i> fertőzési modellek	46
5.5.2. Áramlási citometriás vizsgálatok	47
5.5.3. Laktát-dehidrogenáz (LDH) aktivitás mérése	50
5.5.4. Enzimmötött immunoszorbens próba (ELISA)	50
5.5.5. RNS izolálás, cDNS szintézis és qRT-PCR.....	51
5.5.6. Lizoszóma-károsodás meghatározása katepszin B aktivitás-mérés alapján.....	52
5.5.7. Reaktív oxigéngyök (ROS) termelés mérése.....	53
5.6. STATISZTIKAI ANALÍZIS.....	53
6. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....	54
6.1. HUMÁN PERIFÉRIÁS VÉRŐL ISOLÁLT MONONUKLEÁRIS SEJTEK <i>C. PARAPSILOSIS</i> ÉS <i>C. ALBICANS</i> FERTŐZÉSRE ADOTT VÁLASZREAKCIÓJÁNAK ÖSSZEHASONLÍTÁSA.....	54
6.1.1. <i>A C. parapsilosis és a C. albicans által indukált T helper sejt polarizáció összehasonlítása</i>	54
6.1.1.1. PBMC stimuláció mint <i>in vitro</i> modell	54
6.1.1.2. Gyulladásos citokinek indukciója mononukleáris sejtekben <i>C. parapsilosis</i> és <i>C. albicans</i> fertőzés hatására	55
6.1.1.3. IFN γ , IL-10, IL-17 és IL-22 citokinek indukciója mononukleáris sejtekben <i>C. parapsilosis</i> és <i>C. albicans</i> fertőzés hatására.....	56
6.1.1.4. Th polarizáció vizsgálata áramlási citometriával intracelluláris citokin festést követően	57
6.1.1.5. <i>A C. parapsilosis és a C. albicans által indukált T helper sejt polarizáció összehasonlítása – összefoglalás/értékelés</i>	58
6.1.2. <i>A C. parapsilosis immunológiai felismerésében szerepet játszó receptorok azonosítása</i>	62
6.1.3. <i>A C. parapsilosis felismerését követő intracelluláris jelátvitel elemének vizsgálata</i>	64
6.1.4. <i>A C. parapsilosis immunológiai felismerésében szerepet játszó receptorok azonosítása és az intracelluláris jelátvitel vizsgálata – összefoglalás/értékelés</i> ...	67
6.2. <i>C. PARAPSILOSIS</i> ÉS <i>C. ALBICANS</i> ÁLTAL INDUKÁLT INFLAMMASZÓMA AKTIVÁCIÓ ÖSSZEHASONLÍTÁSA.....	69
6.2.1. <i>Gyulladásos citokinek indukciója mononukleáris sejtekben élő C. parapsilosis és C. albicans stimuláció hatására</i>	69
6.2.2. <i>C. parapsilosis és C. albicans által indukált IL-1β termelés vizsgálata THP-1 makrofágokban</i>	71
6.2.3. <i>Pro-IL-1β transzkripció és transzláció vizsgálata C. parapsilosis és a C. albicans fertőzést követően</i>	73
6.2.4. <i>Kaspázok szerepe a C. parapsilosis és a C. albicans által indukált IL-1β termelésben</i>	75
6.2.5. <i>Az NLRP3 inflammaszóma szerepe a C. albicans és C. parapsilosis által indukált IL-1β termelésben</i>	76

6.2.6. <i>Syk, TLR2, TLR4 és IRAK szerepe a C. albicans és C. parapsilosis által indukált IL-1β termelésben</i>	77
6.2.7. <i>Pszeudohifa képzés hatása az IL-1β szekrécióra</i>	79
6.2.8. <i>C. parapsilosis és C. albicans által indukált reaktív oxigéngyök termelés vizsgálata</i>	80
6.2.9. <i>K⁺ efflux és katepszin B felszabadulás szerepének vizsgálata az inflammaszóma aktivációban</i>	82
6.2.10. <i>C. parapsilosis és C. albicans fagocitózisának vizsgálata</i>	84
6.2.11. <i>C. parapsilosis és C. albicans által indukált apoptózis és nekrosis vizsgálata</i>	85
6.2.12. <i>C. parapsilosis és C. albicans által indukált inflammaszóma aktiváció összehasonlítása – összefoglalás/értékelés</i>	86
7. ÖSSZEFOGLALÁS	93
8. SUMMARY	97
9. IRODALOMJEGYZÉK	101
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	114

1. Rövidítések jegyzéke

AIDS	<u>a</u> cquired <u>i</u> mmune <u>d</u> eficiency <u>s</u> yndrome (szerzett immunhiányos tünetegyüttes)
AIM2	<u>a</u> bsent in <u>m</u> elanoma 2
AP-1	<u>a</u> ctivator <u>p</u> rotein 1
APC	<u>a</u> ntigen <u>p</u> resenting <u>c</u> ell (antigén prezentáló sejt)
ASC	<u>a</u> poptosis-associated <u>s</u> peck-like protein containing a <u>C</u> ARD
BCL10	<u>B</u> <u>c</u> ell <u>l</u> ymphoma 10
BSA	<u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin (marha szérum albumin)
CARD	<u>c</u> aspase-recruitment <u>d</u> omain
CD	<u>c</u> luster of <u>d</u> ifferentiation (differenciációs klaszter)
CLR	<u>C</u> -type <u>l</u> ectin <u>r</u> eceptor (C-típusú lektin receptor)
CMC	<u>c</u> hronic <u>m</u> ucocutaneous <u>c</u> andidiasis (krónikus mukokután candidiasis)
CRD	<u>c</u> arbohydrate <u>r</u> ecognition <u>d</u> omain (szénhidrát felismerő domén)
CTLD	<u>C</u> -type <u>l</u> ectin <u>d</u> omain (C-típusú lektin domén)
CXCL	<u>C</u> <u>X</u> <u>C</u> chemokine <u>l</u> igand (CXC kemokin ligand)
DCFDA	<u>d</u> ichlorofluorescein <u>d</u> iacetate (diklorofluorescein-diacetát)
DC-SIGN	<u>d</u> endritic <u>c</u> ell-specific <u>i</u> ntercellular adhesion molecule-3-grabbing <u>n</u> on-integrin
DMSO	<u>d</u> imethyl <u>s</u> ulfoxide (dimetil-szulfoxid)
ELISA	<u>e</u> nzyme-linked <u>i</u> mmunosorbent <u>a</u> ssay (enzimkötött immunoszorbens próba)
ERK	<u>e</u> xtracellular signal- <u>r</u> egulated <u>k</u> inase
FBS	<u>f</u> etal <u>b</u> ovine <u>s</u> erum (fötális borjúsérum)
FC	<u>f</u> low <u>c</u> ytometry (áramlási citometria)
FITC	<u>f</u> luorescein <u>i</u> sothiocy <u>a</u> nate (fluoreszcein-izotiocianát)
GAPDH	<u>g</u> lycer <u>a</u> ldehyde 3- <u>p</u> hosphate <u>d</u> e <u>h</u> ydrogenase (glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz)
GATA-3	<u>t</u> rans-acting T-cell-specific transcription factor <u>G</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> -3
GM-CSF	<u>g</u> ranulocyte- <u>m</u> acrophage <u>c</u> olony- <u>s</u> timulating <u>f</u> actor (granulocita-makrofág kolónia stimuláló faktor)
HIV	<u>h</u> uman <u>i</u> mmunodeficiency <u>v</u> irus (humán immundeficiencia vírus)
IFN	<u>i</u> nterferon
IL	<u>i</u> nterleukin
ILC	<u>i</u> nnate <u>l</u> ymphoid <u>c</u> ell
IRAK	<u>i</u> nterleukin-1 <u>r</u> eceptor <u>a</u> ssociated <u>k</u> inase
ITAM	<u>i</u> mmunoreceptor <u>t</u> irozin-alapú <u>a</u> ktivációs <u>m</u> otívum
JNK	<u>c</u> - <u>J</u> un <u>N</u> -terminal <u>k</u> inase
LDH	<u>l</u> actate <u>d</u> e <u>h</u> ydrogenase (laktát-dehidrogenáz)
LPS	<u>l</u> ipopolysaccharide (lipopoliszacharid)
MALT1	<u>m</u> ucosa-associated <u>l</u> ymphoid <u>t</u> issue lymphoma translocation protein 1
MAPK	<u>m</u> itogen- <u>a</u> ctivated protein <u>k</u> inase (mitogén-aktivált protein kináz)
MDA5	<u>m</u> elanoma <u>d</u> ifferentiation- <u>a</u> ssociated protein 5

MHC	<u>m</u> ajor <u>h</u> istocompatibility <u>c</u> omplex (fő hisztokompatibilitási komplex)
MKK	<u>m</u> itogen-activated protein <u>k</u> inase <u>k</u> inase (mitogén-aktivált protein kináz kináz)
MR	<u>m</u> annóz <u>r</u> eceptor
MYD88	<u>m</u> yeloid <u>d</u> ifferentiation primary response protein <u>88</u>
NADPH	<u>n</u> icotinamide <u>a</u> denine <u>d</u> inucleotide <u>p</u> hosphate (nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát)
NFκB	<u>n</u> uclear <u>f</u> actor <u>κ</u> B
NK	<u>n</u> atural <u>k</u> iller (cell) természetes ölő (sejt)
NLR	<u>N</u> OD-like <u>r</u> eceptor (NOD-szerű receptor)
NLRC4	<u>N</u> LR family <u>C</u> ARD domain-containing protein <u>4</u>
NLRP3	<u>N</u> LR family <u>p</u> yrin domain-containing protein <u>3</u>
NOD	<u>n</u> ucleotide <u>o</u> ligomerization <u>d</u> omain (nukleotid oligomerizációs domén)
PAMP	<u>p</u> athogen <u>a</u> ssociated <u>m</u> olecular <u>p</u> attern (patogén-asszociált molekuláris mintázat)
PBA	<u>P</u> BS- <u>B</u> SA
PBMC	<u>p</u> eripheral <u>b</u> lood <u>m</u> ononuclear <u>c</u> ell (perifériás vér mononukleáris sejt)
PBMC-DM	<u>p</u> eripheral <u>b</u> lood <u>m</u> ononuclear <u>c</u> ell- <u>d</u> erived <u>m</u> acrophages (perifériás vér mononukleáris sejtekből differenciáltatott makrofágok)
PBS	<u>p</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline (foszfát pufferelt sóoldat)
PCR	<u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction (polimeráz láncreakció)
PI	<u>p</u> ropidium <u>i</u> odide (propidium jodid)
PKCδ	<u>p</u> rotein <u>k</u> inase <u>C</u> δ (protein kináz Cδ)
PMA	<u>p</u> horbol <u>m</u> yristate <u>a</u> cetate (forbol-mirisztin-acetát)
PRR	<u>p</u> attern <u>r</u> ecognition <u>r</u> eceptor (mintázatfelismerő receptor)
PYD	<u>p</u> yrin <u>d</u> omain
qRT-PCR	<u>q</u> uantitative <u>r</u> eal-time <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction (kvantitatív valós-idejű polimeráz láncreakció)
RIG-I	<u>r</u> etinoic acid- <u>i</u> nducible <u>g</u> ene- <u>I</u>
ROS	<u>r</u> eactive <u>o</u> xygen <u>s</u> pecies (reaktív oxigéngyökök)
Syk	<u>s</u> pleen tyrosine (<u>Y</u>) <u>k</u> inase
SZMC	<u>S</u> zeged <u>M</u> icrobiological <u>C</u> ollection (Szeged Mikrobiológiai Törzsgyűjtemény)
T-bet	<u>T</u> -box protein expressed in <u>T</u> cells
TCR	<u>T</u> -cell <u>r</u> eceptor (T-sejt receptor)
TGFβ	<u>t</u> ransforming <u>g</u> rowth <u>f</u> actor-β (transzformáló növekedési faktor- β)
Th	<u>T</u> helper (segítő T-sejt)
THP-1	humán monocita-szerű sejtvonal elnevezése
TIR	<u>T</u> oll/ <u>i</u> nterleukin-1 <u>r</u> eceptor
TLR	<u>T</u> oll-like <u>r</u> eceptor (Toll-szerű receptor)
TMB	<u>t</u> etramethylbenzidine (tetrametil-benzidin)
Treg	<u>r</u> egulátoros <u>T</u> -sejt
YPD	<u>y</u> east extract <u>p</u> eptone <u>d</u> extrose (élesztőkivonat pepton dextróz)

2. Bevezetés

Az utóbbi évtizedek folyamán a fejlett országokban többszörösére nőtt az invazív gombafertőzések száma (Pfaller és Diekema, 2007). Annak ellenére, hogy az elmúlt években számos új antifungális szer került bevezetésre, ezekhez a fertőzésekhez még mindig jelentős mortalitás társul. A súlyos, különösen a hosszú kórházi kezelést igénylő betegségek (pl. rák, AIDS), az immunszuppresszív terápia (kemoterápia, kortikoszteroid kezelés), bizonyos immunhiányos állapotok (pl. neutropénia, AIDS), a hosszú antibiotikus kezelés, illetve bizonyos invazív beavatkozások mind kockázati tényezőknek számítanak az opportunistá patogén gombák által okozott fertőzésekre való fogékonyság tekintetében (Pfaller és Diekema, 2007; Brown és mtsi., 2012). Mivel a modern orvostudomány fejlődésének köszönhetően (pl. a transzplantációs műtétek és egyéb immunszuppressziót igénylő beavatkozások növekvő gyakorisága miatt) egyre nő a veszélyeztetett populáció nagysága, a súlyos gombafertőzések egyre több beteget érintenek. Az opportunistá patogén gombák közül előfordulásuk alapján kiemelkednek a *Candida* fajok, amelyek az invazív mikózisok leggyakoribb okozói (Azie és mtsi., 2012; Paramythiotou és mtsi., 2014). A modern antifungális szerek (pl. echinokandinok) használata ellenére a halálozási arány invazív candidiasis-ban szenvedő betegeknél az 50 %-ot is meghaladhatja (Wisplinghoff és mtsi., 2004). Noha a szisztémás candidiasis okozója leggyakrabban a *C. albicans*, az utóbbi években az egyéb *Candida* fajok előfordulási gyakorisága figyelemreméltó növekedést mutat (Pfaller és mtsi., 2010b). A *C. parapsilosis* geográfiai régiótól függően a második vagy harmadik leggyakrabban izolált invazív candidiasist okozó faj a *C. albicans* után (Guinea, 2014), jelenleg világszerte ezeknek a fertőzéseknek mintegy 17 %-áért felelős (Pfaller és mtsi., 2011). A *C. parapsilosis* különösen súlyos problémát jelent az alacsony születési súlyú csecsemők esetében, ebben a speciális pácienscsoportban előfordulása olykor a *C. albicans*-ét is meghaladhatja (Dotis és mtsi., 2012).

Noha az utóbbi években intenzíven vizsgálják az invazív candidiasis patogenezisét, a kutatási eredmények túlnyomó többsége a *C. albicans* által kiváltott immunválasz vizsgálatára épül. Egyre több tanulmány bizonyítja azonban, hogy az egyes *Candida* fajok eltérő túlélési stratégiákkal rendelkeznek, és az általuk kiváltott védekezési mechanizmusok is nagymértékben különböznek. Például, míg a *C. albicans* makrofágokban intenzív gyulladásos választ vált ki, amely végső soron a makrofágok

piroptózisához (intenzív citokin termeléssel járó programozott sejthalál) vezet (Wellington és mtsi., 2014), a *C. glabrata* fagocitózist követően megakadályozza a fagoszóma savasodását, és szabadon replikálódik, míg végül a makrofág egyszerűen szétesik (Seider és mtsi., 2011). A *C. parapsilosis* virulencia faktorairól, illetve az általa indukált védekezési mechanizmusokról azonban jelenleg kevés ismeretünk van. Mindössze néhány tanulmány foglalkozik a *C. parapsilosis* immunológiai felismerésével és fagocitákkal való interakciójával, az ellene kialakuló adaptív immunválaszt pedig még egyáltalán nem vizsgálták.

Munkánk során célunk a *C. parapsilosis* által kiváltott természetes és adaptív immunválasz néhány aspektusának jellemzése, illetve a *C. albicans* által indukált védekezési mechanizmusokkal való összehasonlítása volt. Vizsgáltuk a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* által indukált citokin termelést és T helper sejt polarizációt humán perifériás vérből származó mononukleáris sejtekben, valamint egyes mintázatfelismerő receptorok, illetve intracelluláris jelátvitelben részt vevő molekulák szerepét a *Candida* fajok által indukált gyulladásos válasz során. Részletesen vizsgáltuk továbbá a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* által indukált inflammaszóma aktivációt humán THP-1 makrofágokban.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Az opportunistá gombafertőzések klinikai jelentősége

A legfrissebb becslések szerint napjainkban az invazív mikózisok közel annyi halálesetet okoznak évente, mint a tuberkulózis (1,4 millió) vagy malária (1,2 millió) (Brown és mtsi., 2012; Murray és mtsi., 2014). További problémát jelent, hogy a szisztémás gombafertőzések igen magas mortalitással járnak, amely megközelítheti a 60-70 %-ot is (Brissaud és mtsi., 2012; Paramythiotou és mtsi., 2014). Az invazív mikózisok túlnyomó többségét ún. opportunistá patogén fajok okozzák, amelyek egészséges egyénekben nem váltanak ki megbetegedést, az immunrendszer legyengülése esetén azonban gyorsan elterjedhetnek a szervezetben. Ezért különösen veszélyeztetettek a hematológiai rendellenességekben (pl. neutropénia) szenvedők, szerv transzplantáción átesettek, HIV fertőzöttek, illetve kemoterápiában vagy immunszuppresszív kezelésben részesülő betegek (Low és Rotstein, 2011; Brown és mtsi., 2012). Az invazív gombafertőzések több mint 90 %-át *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus* és *Pneumocystis* fajok okozzák (Brown és mtsi., 2012). Az opportunistá mikózisok legnagyobb hányadáért világszerte *Candida* fajok felelősek (részletesen ld. „Az invazív *Candida* fertőzések epidemiológiája” c. részt), amelyek a nosokomiális véráramfertőzések negyedik leggyakoribb kiváltó okai (Pfaller és Diekema, 2007). 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 (Matee és mtsi., 2000; Sobel, 2007).

A környezetben is igen gyakori *Aspergillus* fajok közül a legtöbb megbetegedést az *A. fumigatus* és *A. flavus* okozza, de az *A. niger* vagy a laboratóriumi modellorganizmusként igen gyakran alkalmazott *A. nidulans* is képes fertőzést kiváltani (Kousha és mtsi., 2011). A megbetegedések többnyire a légutakat érintik, ezért a krónikus tüdőbetegségben (pl. tuberkulózis, COPD (krónikus obstruktív tüdőbetegség), szarkoidózis) szenvedők különösen fogékonyak az *Aspergillus* fertőzésekre (Hope és mtsi., 2005). A betegségek skálája a belélegzett spórák által okozott allergiától az invazív aspergillosis-ig terjed, egyes esetekben éveken át elhúzódó krónikus tüdőfertőzés is kialakulhat (Dagenais és Keller, 2009). Az invazív aspergillosis igen súlyos állapot, kezelés mellett is 50 %-os halálozási arány jellemzi, késői felismerés vagy a kezelés teljes elmulasztása esetén pedig közel 100 %-ban végzetes (Brown és mtsi., 2012).

A cryptococcosis különösen olyan betegek körében gyakori, akiknél a celluláris (CD4⁺ T-sejtes) immunválasz csökkent működése figyelhető meg, így az AIDS-ben szenvedő páciensek különösen veszélyeztetettek (Brown és mtsi., 2012). Ezen betegek körében az USA-ban a *Cryptococcus* fertőzés mortalitása 15-20 % között változik, míg Latin-Amerikában és Afrika egyes területein a halálozási arány a 70 %-ot is elérheti (Park és mtsi., 2009). A legtöbb megbetegedést a *Cryptococcus neoformans* élesztőgomba okozza, azonban bizonyos területeken a *C. gattii* is gyakran előfordul (MacDougall és mtsi., 2007). A fertőzés többnyire a tüdőn keresztül történik, majd a mikroba a központi idegrendszert támadja meg, súlyos agyhártya- és agyvelőgyulladást okozva. Becslések szerint a *Cryptococcus*-ok okozta agyhártyagyulladás globálisan évente közel egymillió embert érint (Park és mtsi., 2009). A *Pneumocystis jirovecii* által okozott tüdőgyulladás szintén elsősorban az AIDS-ben szenvedőket sújtja (Carmona és Limper, 2011). Globálisan a *Pneumocystis* fertőzések száma évente mintegy 400.000-re tehető, bár a diagnózis körül felmerülő problémák megnehezítik a pontos becsléseket (Brown és mtsi., 2012).

A súlyos gombafertőzések 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 (Jarvis és mtsi., 2011), 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 (Marr és mtsi., 2004). Bár a β -glükán kimutatásán alapuló teszt hatékonynak bizonyult a gombafertőzések detektálására (Obayashi és mtsi., 2008), alacsony specificitása miatt mégsem igazán terjedt el (Low és Rotstein, 2011). Tüdő- vagy májfertőzés esetén gyakori a CT felvétel alapján felállított diagnózis, hátránya azonban, hogy a gombafertőzés 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 minden esetben elég specifikusak és érzékenyek, ráadásul a fejlődő országokban többnyire nem is hozzáférhetőek (Brown és mtsi., 2012).

Ugyanakkor az invazív gombafertőzések 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 (Brown és mtsi., 2012). Annak ellenére, hogy az opportunistá patogén gombák klinikai jelentősége egyre nő, a fertőzések immunológiai hátterének sok aspektusát még mindig nem ismerjük. A fertőzések során lejátszódó gazda-patogén interakciók pontosabb megismerésével válhat lehetségessé a hatékonyabb antifungális terápia kidolgozása.

3.2. Az invazív *Candida* fertőzések epidemiológiája

A *Candida* fajok a normál humán flóra tagjaként gyakran megtalálhatóak a szájüregben, a bélrendszerben, és egészséges egyénekben általában nem okoznak megbetegedést (Cole és mtsi., 1996; Fidel és mtsi., 1999). 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, immunszuppresszív terápia) kísérő immunhiányos állapotok; (2) olyan invazív beavatkozások (pl. hasüregi műtétek, katéterek használata, parenterális táplálás) amelyek a szervezet fizikai védelmi vonalainak (nyálkahártya barrierek) sérüléséhez vezetnek (Yapar, 2014). A fertőzést okozó *Candida* gombák származhatnak endogén forrásból (tápcsatorna, nyálkahártya felszínek), de lehetnek exogén eredetűek is (pl. egészségügyi dolgozók bőréről is átjuthatnak a betegre) (Asmundsdottir és mtsi., 2008).

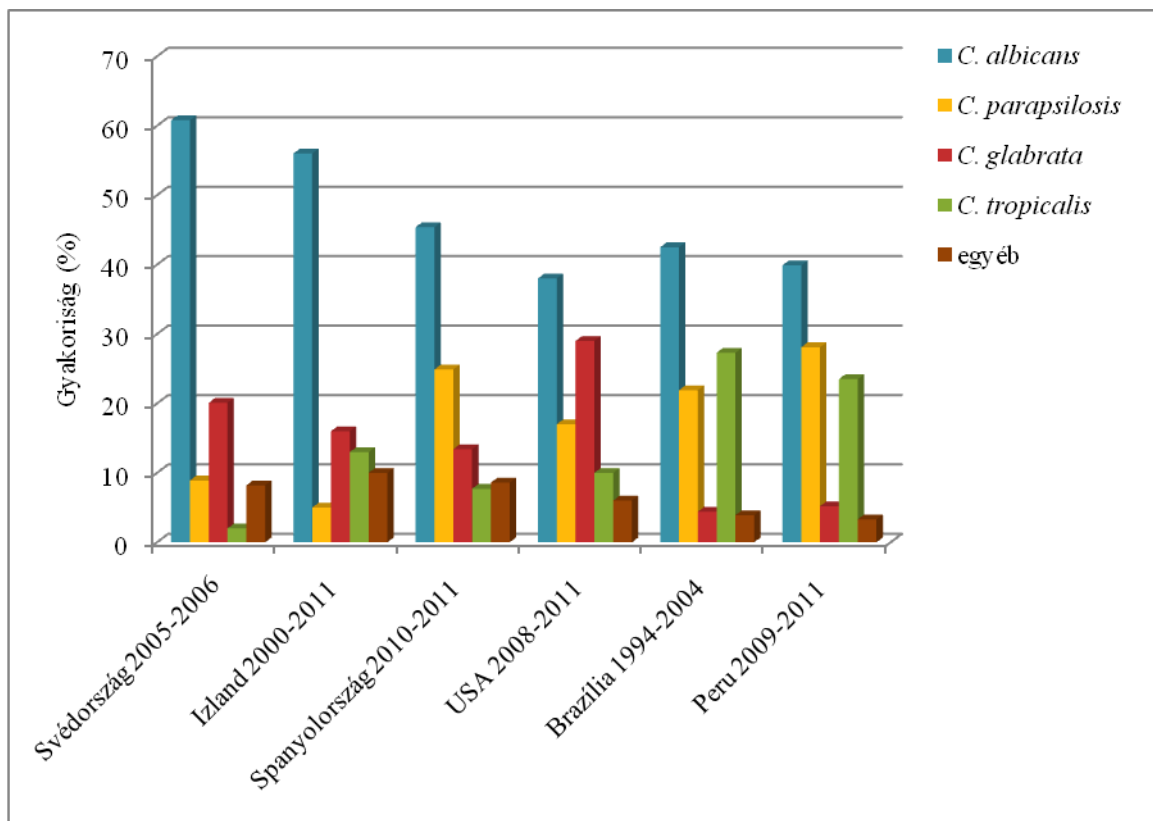
Invazív candidiasis-ról akkor beszélünk, ha a kórokozók a véráramba kerülnek (candidemia), illetve ha a fertőzés szétterjed a szervezetben (disszeminált candidiasis), és az egyes szerveket érintő „mély” fertőzés alakul ki (Pfaller és mtsi., 2011). Az invazív candidiasis-nak sokféle klinikai manifesztációja lehet, okozhat endophthalmitis-t (szem belső rétegeinek gyulladása), endocarditis-t (szívbelhártya-gyulladás), osteomyelitis-t (csontgyulladás), peritonitis-t (hashártyagyulladás) és meningitis-t (agyhártyagyulladás) is (Pappas, 2006; Tragiannidis és mtsi., 2013). Mivel a legtöbb esetben a vérből mutatják ki a kórokozókat, az invazív candidiasist gyakran a candidemia-val azonosítják. Globálisan a candidemia éves előfordulási gyakorisága 2-11/100.000 fő között változik (Arendrup, 2010), amely becslések szerint mintegy 400.000 új esetet jelent évente (Brown és mtsi., 2012). A helyzet komolyságát jelzi, hogy az USA-ban 2000 és 2005 között 52 %-kal nőtt a

candidemia éves előfordulási gyakorisága: míg a betegség 2000-ben 100.000 lakosból átlagosan 3,65-öt érintett, 2005-re ez a szám 5,56-ra nőtt (Zilberberg és mtsi., 2008). 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 (Yapar, 2014). Angliában és Walesben 100.000 főből 1,52-re jut egy fertőzés (Oeser és mtsi., 2013), míg Finnországban az invazív candidiasis gyakorisága 2,86/100.000 fő (Poikonen és mtsi., 2010), Svédországban pedig 4,2/100.000 fő (Ericsson és mtsi., 2013). Kivételt képez azonban Európán belül Dánia, ahol 2004 és 2009 között 100.000 lakosból évente 8,6 esetben regisztráltak invazív *Candida* fertőzést (Arendrup és mtsi., 2011), illetve Spanyolország, ahol a legújabb felmérések szerint 100.000 lakosra 8,1 eset jut (Puig-Asensio és mtsi., 2014).

Mivel invazív candidiasis leggyakrabban nozokomiális fertőzésként fordul elő, nagy jelentősége van a kórházban ápolott betegek körében előforduló fertőzések gyakoriságát felmérő tanulmányoknak. A nozokomiális véráramfertőzések mintegy 8-10 %-át *Candida* fajok okozzák (Wisplinghoff és mtsi., 2004). Általában elmondható, hogy candidemia 1000 kórházi felvételtől 1 esetben fordul elő, bár a számok régióként erősen változóak lehetnek (Yapar, 2014). Egy, a közelmúltban készült átfogó tanulmány szerint Spanyolországban 0,92 candidiasis eset jut 1000 betegre (Peman és mtsi., 2012), míg például Latin-Amerikában ez a szám régiótól függően 0,33 és 1,95 között változik (Nucci és mtsi., 2013). Az intenzív osztályon kezelt betegek különösen fogékonyak a gombás megbetegedésekre, a nozokomiális *Candida* véráramfertőzések felét ezeknél a betegeknél regisztrálják (Wisplinghoff és mtsi., 2004). Fontos megemlíteni továbbá, hogy az invazív candidiasis gyermekek körében gyakrabban fordul elő, mint felnőtteknél, az alacsony születési súllyal rendelkező csecsemők pedig különösen veszélyeztetettek (Brissaud és mtsi., 2012).

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* (Pfaller és Diekema, 2007). Gyakorlatilag minden betegcsoportban a *C. albicans* fordul elő leggyakrabban, átlagosan a invazív candidiasis esetek mintegy 50 %-át okozva (Pfaller és Diekema, 2007). 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.*

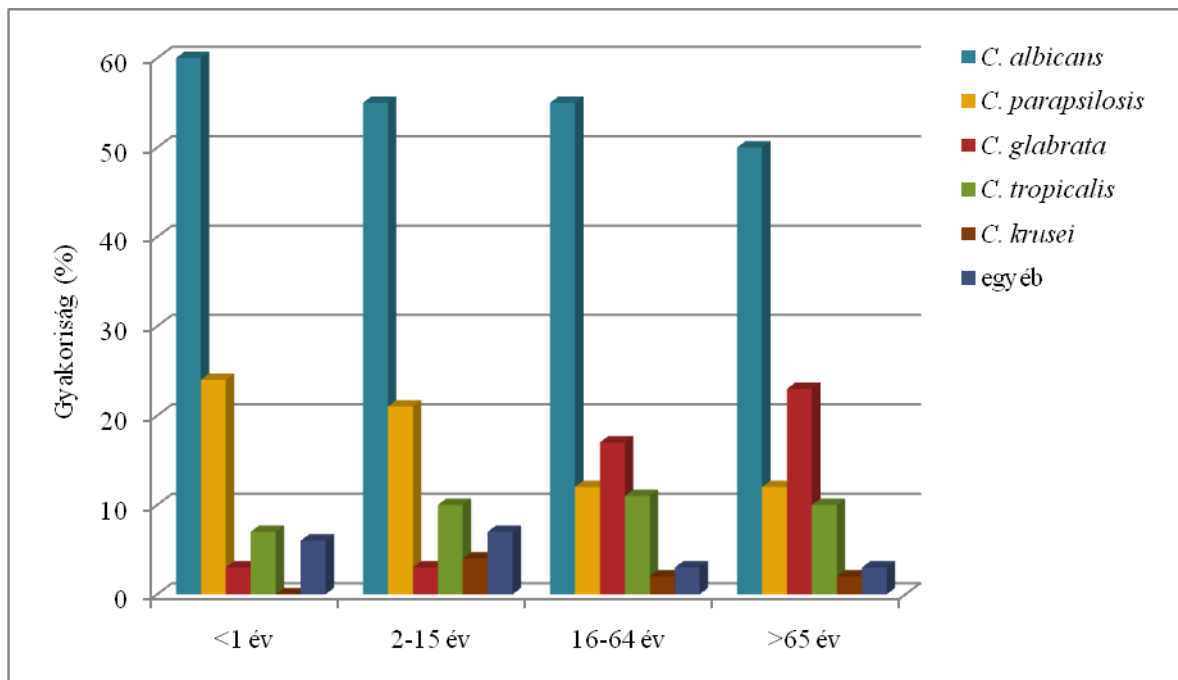
parapsilosis (17,1 %), majd a *C. tropicalis* (10,6 %) és *C. krusei* (2,0 %) (Pfaller és mtsi., 2011). Fontos azonban megjegyezni, hogy a különböző fajok előfordulási gyakorisága geográfiai régiók szerint jelentős varianciát mutat (1. ábra).



1. ábra. Invazív candidiasis-t okozó fajok országok szerinti előfordulási gyakorisága. (Lockhart és mtsi., 2012; Asmundsdottir és mtsi., 2013; Ericsson és mtsi., 2013; Wille és mtsi., 2013; Bustamante és mtsi., 2014; Puig-Asensio és mtsi., 2014)

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 (Guinea, 2014). 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 (Pfaller és mtsi., 2010b; Pfaller és mtsi., 2011). 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 (Yapar, 2014).

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 candidemiát, míg a 0-19 évesek körében ez a gombafaj mindössze a fertőzések 2 %-áért volt felelős (Pfaller és mtsi., 2010a). Ezzel szemben az utóbbi korcsoportban *C. parapsilosis* okozta a megbetegedések 28,5 %-át (Pfaller és mtsi., 2010a). Egy másik, az ezredfordulón készült globális felmérés hasonló statisztikát mutatott a *Candida* fajok korcsoportok szerinti megoszlását illetően (2. ábra).



2. ábra. Invazív candidiasis-t okozó fajok korcsoportok szerinti előfordulási gyakorisága (Pfaller és mtsi., 2002).

Korcsoporttól függetlenül, *C. glabrata* által okozott fertőzés gyakrabban alakul ki rosszindulatú daganatos megbetegedésekben szenvedőkben, szervátültetettekben, illetve hosszantartó antibiotikumos kezelés esetén (Pfaller és Diekema, 2007; Yapar, 2014). Ezzel szemben a *C. parapsilosis* fertőzés veszélyének különösen a intravaszkuláris katétert viselők és a parenterális táplálásban részesülő betegek vannak kitéve (Pfaller és Diekema,

2007). 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 (az esetek 50 %-ában) izolált faj (Gamaletsou és mtsi., 2014).

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 a tanulmányozására, ami azért is fontos, mert a *C. albicans*-hoz viszonyítva ezekről a patogénekről jelentősen kevesebb ismeretünk van.

3.3. A *C. parapsilosis* fertőzés epidemiológiája

A *C. parapsilosis* klinikai jelentősége nagymértékben megnőtt az elmúlt évek folyamán. Míg globális felmérések szerint 1997 és 2000 között világszerte az invazív candidiasis esetek 4,8 %-át okozta, ez a szám 2009-re 17,1 %-ra nőtt (Pfaller és mtsi., 2010b; Pfaller és mtsi., 2011). 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 (Pfaller és Diekema, 2007). Figyelemre méltó, hogy a *C. parapsilosis* fertőzés igen gyakori újszülöttek körében, különösen az alacsony súllyal világra jött csecsemők esetében. Egy, a közelmúltban készült, 36 tanulmány adatait összesítő elemzés szerint a *C. parapsilosis* az újszülött kori candidiasis esetek 33,47 %-áért felelős (Pammi és mtsi., 2013). Egyre több tanulmány 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 spanyol tanulmány szerint a 16 év alatti korcsoportnál a *C. parapsilosis* okozta az invazív gombafertőzések 46,8 %-át, míg a *C. albicans* a fertőzések 36,5 %-áért volt felelős (Peman és mtsi., 2011).

Amint az az előzőekben 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 (Yapar, 2014). Igen magas továbbá az előfordulási gyakorisága Latin-Amerikában, ahol egyes területeken prevalenciája a *C. albicans*-ét is meghaladhatja (Trofa és mtsi., 2008; Nucci és mtsi., 2013).

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 (Pappas és mtsi., 2003; Trofa és mtsi., 2008). Érdekes módon gyermekek körében a mortalitás általában alacsonyabb: egy, az USA-ban készült felmérés szerint 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 (Pappas és mtsi., 2003). Meg kell azonban jegyezni, hogy ezek a számok nagyban függenek a páciensek alapbetegségétől, illetve egyéb hajlamosító tényezőktől (pl. műtétek, immunszuppresszív terápia) meglététől is.

3.4. 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 kládba tartozik, amelynek tagjaira jellemző, hogy esetükben a CUG kodon rendhagyó módon szerint kódol leucin helyett (Massey és mtsi., 2003). 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 nagyságú, és mintegy 6107 gént tartalmaz (Butler és mtsi., 2009).

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

dimorf faj található, amelyek bizonyos környezeti körülmények (pl. tápanyag- vagy oxigénellátottság) megváltozása esetén morfológiai 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 (Lo és mtsi., 1997). A *Candida* fajok számos extracelluláris enzimet termelnek, amelyek közül többnek (pl. *C. rugosa* lipáz termelésének) biotechnológiai jelentősége van (Dominguez de Maria és mtsi., 2006). Ugyanakkor a különböző hidrolitikus enzimek termelésének képessége fontos virulencia faktor lehet; *C. albicans* esetén például jól ismert a lipázok és proteinázok patogenitásban betöltött szerepe (Monod és Borg-von, 2002; Gacser és mtsi., 2007a).

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 (Noble és Johnson, 2007). Ezzel szemben a szintén diploid *Lodderomyces elongisporus* ivaros szaporodásra képes, homotallikus organizmus, míg a *C. parapsilosis* és *C. tropicalis* egyáltalán nem rendelkezik szexuális ciklussal (Butler és mtsi., 2009). A haploid fajok között a homo- és heterotallikus szervezeteket egyaránt találunk (Butler és mtsi., 2009).

A *Candida* sejteket vastag, főként poliszacharidokból álló sejtfal veszi körül. A sejtfal szerkezetéről a *C. albicans* esetében van a legtöbb ismeretünk, de alapvetően a többi faj is hasonló felépítésű sejtfallal rendelkezik. A sejtfal 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 (Netea és mtsi., 2008). A β -glükán réteg a sejtfal száraz tömegének mintegy 60 %-át alkotja, β -1,3- és β -1,6-glükánból áll, amelyek egymáshoz és a kitinhez kovalens kötésekkel kapcsolódnak (Ruiz-Herrera és mtsi., 2006). A belső réteget kívülről teljesen befedi a mannoproteinek rétege, így az csak az élesztők osztódása során kialakuló sarjhegeknél válik hozzáférhetővé (Gantner és mtsi., 2005). A kívül található mannoprotein réteg (vagy egyszerűen mannán) erőteljesen glikozilált fehérjéket tartalmaz. A sejtfal fehérjék glikozil-foszfatidil-inozitol (GPI) egységekkel kapcsolódnak a β -1,3-glükánhoz vagy kitinhez (Netea és mtsi., 2008). A fehérjék lehetnek *O*-mannoziláltak, ebben az esetben a mannóz egységek szerinhez vagy treoninhez kapcsolódnak, vagy *N*-mannoziláltak, ekkor aszparaginhez kapcsolódnak a cukor egységek (Netea és mtsi., 2008). 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 (Netea és mtsi., 2008). A *C. albicans* sejtfalában kis mennyiségben lipidek is előfordulnak. Immunológiai szempontból jelentős például a foszfolipomannán, amelyet β -1,2-mannóz egységekhez kapcsolódó foszfoinozitol-ceramid alkot (Ruiz-Herrera és mtsi., 2006).

3.5. A *C. parapsilosis* általános jellemzése

A *C. parapsilosis*-t elsőként Ashford izolálta 1928-ban, és *Monilia parapsilosis*-ként írta le, majd az organizmust 1932-ben nevezték át *C. parapsilosis*-nak (Nosek és mtsi., 2009). 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 (Lin és mtsi., 1995). 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 és *C. metapsilosis*-ról (II. és III. csoport) beszélünk (Tavanti és mtsi., 2005). 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 (Bertini és mtsi., 2013). Újabb tanulmányok szintén alátámasztották, hogy a fajkomplex tagjai közül a *C. metapsilosis* a legkevésbé virulens (Nemeth és mtsi., 2013).

A *C. parapsilosis* a normál humán mikrobiális flóra tagját képezi, a kéz bőrén különösen gyakran megtalálható (Pfaller és Diekema, 2007). Széleskörűen előfordul azonban a környezetben is, izolálható például talajból vagy tengervízből is (Nosek és mtsi., 2009). A *C. albicans*-szal ellentétben a *C. parapsilosis* valódi micéliumok képzésére nem képes, bizonyos körülmények között azonban ún. pseudohifákat, megnyúlt élesztősejtekből álló hifaszerű képleteket hozhat létre (Nosek és mtsi., 2009). Csoportunk korábban kimutatta, hogy a pseudohifa-képzésnek szerepe lehet a virulenciában is, a pseudomicélium-képző *C. parapsilosis* törzsek ugyanis ellenállóbbak a primer humán makrofágok ölümechanizmusainak, és jobban károsítják ezeket a sejteket a kizárólag élesztő morfológiát mutató törzsekhez képest (Nemeth és mtsi., 2013). A *C. parapsilosis* potenciális patogenitási faktorai közé tartozik a különböző hidrolitikus enzimek termelésének képessége is, amelyek közül a szekretált lipázokról és aszpartil proteinázokról bizonyították be, hogy szerepet játszanak az organizmus virulenciájában

(Gacser és mtsi., 2007b; Horvath és mtsi., 2012; Nemeth és mtsi., 2013; Toth és mtsi., 2014a). A *C. parapsilosis* jellemzője továbbá, hogy könnyen képez biofilmet magas glükóz, illetve lipid tartalmú médiumban, aminek különös jelentősége van parenterális táplálásban részesülő betegek esetén (Nosek és mtsi., 2009). Az intenzív biofilm képzés ezen kívül katétereken, protéziseken és egyéb orvosi eszközökön is megfigyelhető (Trofa és mtsi., 2008).

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* lókuszban (Sai és mtsi., 2011). A CDC317 jelű *C. parapsilosis* izolátum teljes genomszekvenciája 2009 óta elérhető (Butler és mtsi., 2009). A haploid genom mérete 13,1 Mb, és mintegy 5700 ORF-et (nyitott leolvasási keretet) tartalmaz (Butler és mtsi., 2009). Az azóta eltelt időben további izolátumok teljes genomszekvenciáját is meghatározta kutatócsoportunk (Pryszcz és mtsi., 2013).

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 hasonlóságot 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 (Logue és mtsi., 2005). Számos olyan *C. albicans*-specifikus génszekvencia is létezik azonban, amely a *C. parapsilosis* genomjából hiányzik (Nosek és mtsi., 2009). 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.

3.6. A gombák ellen kialakuló immunválasz

Az opportunistá patogén gombák különleges helyet foglalnak el a kórokozó mikrobák között. Sok faj ártalmatlan kommenzalistaként van jelen a szervezetben, és normál körülmények között semmilyen negatív hatással sincs a gazdára. Ezt a kapcsolatot olyan, komplex mechanizmusok teszik lehetővé, amelyeknek a kialakulása évmilliókon keresztül a ko-evolúció eredménye (Romani, 2011). Míg az immunrendszer szigorúan szabályozza a

mikroba populációk nagyságát a szervezetben, a kommenzalista gombák különböző túlélési mechanizmusok egész tárházát fejlesztették ki életben maradásuk érdekében. A gazdaszervezethez ilyen módon való adaptáció egy igen érzékeny egyensúlyi állapot kialakulásához vezetett, amely normál körülmények között lehetővé teszi a gazdával való békés együttélést. Azonban mivel a modern orvostudomány egyre több olyan beavatkozást alkalmaz, amely az immunrendszer működésének megváltoztatásával jár együtt (pl. szervátültetést kísérő immunszuppresszív terápia), ez az érzékeny egyensúly könnyen felborulhat, ami a gombák túlzott elszaporodásához vezethet a szervezetben. Hatékony immunválasz hiányában pedig a kialakuló fertőzés a gazdára nézve akár végzetes is lehet. Ugyanakkor fontos hangsúlyozni, hogy sok esetben éppen a túlzott gyulladásos válasz az, ami a legnagyobb károsodást okozza a szervezetben (Romani, 2011). A patogének elszaporodása miatt az immunrendszer szabályozó mechanizmusai felborulhatnak, ami kontrollálhatatlan gyulladás, végső soron pedig szepszis kialakulásához vezethet. Ilyen esetekben a kóros immunfolyamatok megfékezése éppolyan fontos lehet, mint a patogének eliminációját célzó antifungális terápia.

A gombafertőzések immunológiai hátterének kutatása az elmúlt két évtized során kezdődött meg intenzíven. Nagy áttörést jelentett például a különböző mintázatfelismerő receptorok (pattern recognition receptor, PRR), köztük a Dectin-1, mint fő β -glükán receptor azonosítása (Brown és Gordon, 2001). 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 (van de Veerdonk és Netea, 2010; Hernandez-Santos és Gaffen, 2012). 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 (LeibundGut-Landmann és mtsi., 2007).

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 (Netea és mtsi., 2008). Az idegen molekuláris mintázatok felismerése a receptor típusától, illetve sejttípustól függően különböző gyulladásos mediátorok termeléséhez vezet, illetve indukálja a patogén közvetlen eliminációját (Brown, 2011). Ugyanakkor a patogének

antigén prezentáló sejtek (antigen presenting cell, APC), például dendritikus sejtek általi bekebelezése az adaptív immunválasz iniciációjában játszik kulcsszerepet (Romani, 2011).

3.6.1. Patogén gombák elleni természetes immunitás

3.6.1.1. Mintázatfelismerő receptorok

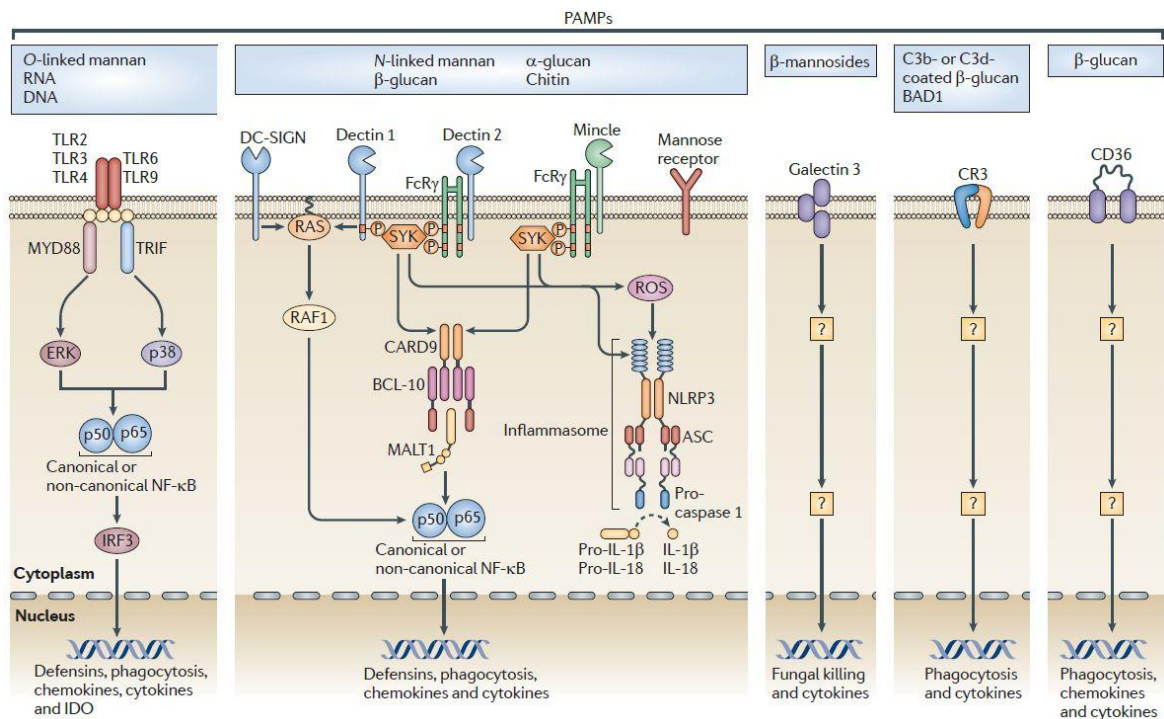
A mintázatfelismerő receptor (PRR) fogalmát Janeway vezette be 1989-ben (Janeway, 1989). Definíciója szerint a PRR-ek olyan, evolúciósan konzervált receptorok, amelyek képesek különböző patogén-asszociált molekuláris mintázatok (pathogen associated molecular patterns, PAMPs) felismerésére. Az elgondolás szerint a PRR-ek az immunológiai felismerés primitívebb változatát képviselik, amely evolúciósan megelőzte a T- és B-limfociták egyedi specifitású antigénkötő receptorainak kialakulását (Janeway, 1989).

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, CLRs), RIG-I-szerű receptorok (RIG-I-like receptors, RLRs), valamint a NOD-szerű receptorok (NOD-like receptors, NLRs) (Plato és mtsi., 2015). A gombák felismerésében részt vevő fontosabb receptorok a 3. ábrán láthatóak.

3.6.1.1.1. Toll-szerű receptorok (TLR)

A PRR-ek közül a Toll-szerű receptorok családja a legjobban tanulmányozott és jellemzett. A múlt század végén fedezték fel, hogy a *Drosophila melanogaster* Toll gén szerepet játszik a patogének elleni védekezésben (a mutáns gént hordozó legyek fogékonyabbak voltak gombafertőzésekre) (Lemaitre és mtsi., 1996). Később azonosították a Toll receptorok emlős homológjait (Toll-szerű receptorok) is: egérben a család 12 (TLR1-9 és TLR 11-13), míg emberben 10 (TLR1-10) funkcióképes tagját írták le (Kumar és mtsi., 2011). Míg a TLR1-9 mind egérben, mind emberben megtalálható, a TLR10 rágcsálókban, a TLR11 pedig humán sejtekben nem expresszálódik, génjeik ugyanis korai stop kodont kódolnak (Ishii és mtsi., 2008; Kumar és mtsi., 2011). A TLR-ek I-es típusú transzmembrán proteinek, amelyeknek az extracelluláris doménje a patogén felismerésben

fontos szerepet játszó leucin-gazdag ismétlődéseket (leucin rich repeats, LRR), citoplazmatikus régiója pedig TIR (Toll/interleukin-1 receptor) domént tartalmaz (Kumar és mtsi., 2011). Az egyes TLR-ek sejten belüli lokalizációja is eltérő: míg a TLR 1, 2, 4, 5, 6 és 10 a sejtfelszínen expresszálódik, a TLR 3, 7, 8 és 9 endoszómális elhelyezkedésű (Kumar és mtsi., 2011). A TLR-ek egyedi ligand specificitással rendelkeznek: a TLR 1, 2, 4, 5, 6 többnyire a bakteriális komponensek (pl. lipopeptidek, peptidoglikán, lipopoliszacharid, flagellin) felismerésében játszik fontos szerepet, míg az endoszómális TLR-ek különösen a vírus nukleinsavak felismeréséhez szükségesek (Kumar és mtsi., 2011). Az újonnan felfedezett TLR ligandok, ezzel együtt pedig a receptorok által felismert patogének listája ugyanakkor évről évre bővül.



3. ábra. A gombák felismerésében részt vevő legfontosabb mintázatfelismerő receptorok. (Romani, 2011)

A TLR-ek által közvetített szignalizációban kulcsszerepe van a MyD88 (myeloid differentiation primary response protein 88) adaptor molekulának, amely a receptorok aktivációját követően a TIR doménhez kapcsolódik (egyedül a TLR3 és TLR4 képes a MyD88-tól függetlenül is jeltovábbítást indukálni) (Kawai és Akira, 2006). Ezt követően a MyD88 fehérje interleukin-1 receptor-asszociált kinázokat (IRAK1 és IRAK4) toboroz a

receptorhoz, majd ezen kinázok foszforilációja a TRAF6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 6) aktivációjához vezet. A jelátvitel további lépései a TAK1 (transforming growth factor- β -activated protein kinase 1), majd az IKK (I κ B kinase) komplex aktivációja, ami végül az NF κ B (nuclear factor κ B) transzkripciós faktor aktivációjához vezet (Kawai és Akira, 2006). Az NF κ B számos gyulladásos mediátor transzkripcióját szabályozza, aktivációja többek között különböző gyulladásos citokinek szintézisét indukálja (Kumar és mtsi., 2011). Ugyanakkor a TAK1 foszforilálja az MKK3-at (MAP kináz kináz 3) és az MKK6-ot (MAP kináz kináz 6) is, ami a JNK (c-Jun N-terminal kinase) és a p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase) aktivációját eredményezi (Kawai és Akira, 2006). Az ERK (extracellular signal-regulated kinase) MAP kináz szintén aktiválódhat a TLR-ek stimulációját követően, ennek az útvonalnak a részletei azonban kevésbé tisztázottak. A MAP kinázok az AP-1 (activator protein 1) transzkripciós faktort aktiválják. Az AP-1 faktort különböző, főként a c-Jun és c-Fos fehérjecsaldókba tartozó proteinek dimerjei alkotják, és aktivációja különböző növekedési faktorok, citokinek és kemokinek termelődését indukálja (Hess és mtsi., 2004). A TLR3 és TLR4 MyD88-tól független szignalizációt is kiválthat, ekkor a TRIF (TIR domain-containing adapter inducing IFN β) adaptor aktivációja az I-es típusú interferonok, főként IFN β (interferon β) termeléséhez vezet (Kawai és Akira, 2006).

Ugyan mára bebizonyosodott, hogy a gombák felismerésében a C-típusú lektin receptorok játsszák a legfontosabb szerepet, bizonyos TLR-ek is kiemelkedő jelentőséggel bírnak. Ezt támasztja alá az, hogy a *myd88*^{-/-} egerek fogékonyabbak a *C. albicans* és *A. fumigatus* fertőzésre, mint a vad-típusú állatok (Bellocchio és mtsi., 2004). 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-negatív baktériumok sejtfalában található lipopoliszacharid (LPS) felismerésében (Kumar és mtsi., 2011). Képes azonban érzékelni a *C. albicans* sejtfalában található O-mannán-t is (Netea és mtsi., 2006). Egy korábbi tanulmányban megállapították, hogy *tlr4*^{-/-} egerek fogékonyabbak a disszeminált candidiasis-ra, mint a vad típusúak, ami a kemokin termelés defektjével volt magyarázható (Netea és mtsi., 2002). Ugyanakkor fontos kiemelni, hogy a TLR4 nem minden *C. albicans* törzs felismerésében játszik szerepet (Netea és mtsi., 2010a). A TLR2 többek között a bakteriális peptidoglikán felismerésében játszik fontos szerepet, de számos más ligandja is ismert (Kumar és mtsi., 2011). 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-rel (pl. Dectin-1) is képes együttműködni, és a kölcsönhatások függvényében specifikus citokin választ kiváltani (Plato és mtsi., 2015). A TLR2 a TLR6-tal együttműködve valószínűleg a *C. albicans* foszfolipomannánt ismeri fel (Jouault és mtsi., 2003). A TLR7 és TLR9 szerepe az antifungális immunitásban kevésbé tisztázott, de mindkettőt kapcsolatba hozták a *C. albicans* felismerésével (Biondo és mtsi., 2012; Wagener és mtsi., 2014).

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 (Plato és mtsi., 2015).

3.6.1.1.2. RIG-I-szerű receptorok (RLR)

A citoplazmatikus lokalizációjú RIG-I-szerű receptorok (RIG-I (retinoic acid-inducible gene-I), MDA5 (melanoma differentiation-associated protein 5), LGP2 (laboratory of genetics and physiology 2)) elsődleges szerepe a virális RNS felismerése, ami különböző citokinek és interferonok termelődését indukálja (Kumar és mtsi., 2011). Egy közelmúltban készült tanulmány szerint azonban az MDA5 receptornak 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 (Jaeger és mtsi., 2015).

3.6.1.1.3. C-típusú lektin receptorok (CLR)

A C-típusú lektin receptorok (CLR) 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 (Plato és mtsi., 2015). A C-típusú lektin receptorokra jellemző CRD-t C-típusú lektin doménnek (C-type lectin domain, CTLD) is nevezzük (Zelensky és Gready, 2005). 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 (Zelensky és Gready, 2005). A CLR-ek esszenciális szerepet játszanak a gombák elleni védekezésben (Hardison és Brown, 2012). A CLR-ek legnagyobb számban myeloid sejteken, úgymint

makrofágokon és dendritikus sejteken expresszálódnak, de megtalálhatóak limfocitákon, granulocitákon és epitelsejteken is (Plato és mtsi., 2015).

A Dectin-1 az egyik legjobban jellemzett CLR, amely számos, különböző szerkezetű β -glükán molekula felismerésére képes (Brown és Gordon, 2001). A Dectin-1 receptor szerepét különböző gombafertőzések 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 *Pneumocystis carinii* fertőzéssel szemben (Steele és mtsi., 2005; Saijo és mtsi., 2007; Taylor és mtsi., 2007). Érdekes módon a Dectin-1 receptor nem minden *C. albicans* törzs felismerésében játszik szerepet, ami többek között a különböző törzsek eltérő adaptációs képességével (a sejtfal összetétel *in vivo* körülmények közötti megváltozásával) magyarázható (Marakalala és mtsi., 2013). A Dectin-1 hiánya emberben is fokozza a gombafertőzésekre való fogékonyságot, többek között krónikus *Candida* bőr- és nyálkahártya fertőzésekhez (chronic mucocutaneous candidiasis, CMC) vezet (Ferwerda és mtsi., 2009). A Dectin-1 receptor extracellulárisan egyetlen CTLD-t tartalmaz, míg intracelluláris doménjében ITAM-szerű (immunoreceptor tirozin-alapú aktivációs motívum-szerű) motívum található, amely a szignalizáció elindításáért felelős (Plato és mtsi., 2015). 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 a PLC γ 2-t (phospholipase γ 2), ami több lépésen keresztül PKC δ (protein kináz C δ) aktivációt eredményez (Plato és mtsi., 2013). A PKC δ aktivációja egyrészt ROS termelést és inflammaszóma aktivációt indukál az ERK foszforilációján keresztül, másrészt a CARD9 (caspase recruitment domain-containing protein 9)-Bcl10 (B cell lymphoma 10)-Malt1 (mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1) komplex aktivációját váltja ki (Plato és mtsi., 2015). A CARD9-Bcl10-Malt1 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 (Hardison és Brown, 2012; Plato és mtsi., 2015). A Dectin-1/Syk szignalizáció a MAP kinázok (p38, ERK, JNK) aktivációját is kiváltja (Hara és Saito, 2009; Xu és mtsi., 2009), ám ennek az útvonalnak a pontos lépései még nem teljesen tisztázottak. A Dectin-1 aktivációja fagocitózist, ROS termelést és inflammaszóma aktivációt (ld. később) is indukál (Plato és mtsi., 2015), továbbá az adaptív immunválasz (különösen a Th17 sejtek differenciációjának) szabályozásában (ld. később) is fontos szerepe van (LeibundGut-Landmann és mtsi., 2007; Gringhuis és mtsi., 2009). A Dectin-1

receptor számos TLR-rel képes együttműködni a patogének felismerése során (Plato és mtsi., 2013). Kimutatták például, hogy a Dectin-1 expressziója fokozza a TLR2 által indukált NF κ B aktivációt és citokin termelést (Gantner és mtsi., 2003).

A Dectin-2 receptor szintén egyetlen CTLD-t tartalmaz, azonban nem β -glükán, hanem mannóz tartalmú struktúrák aktiválják (Brown, 2011). Számos gombafaj, többek között a *C. albicans*, *A. fumigatus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *C. neoformans* és *Histoplasma capsulatum* felismerésében vesz részt (Plato és mtsi., 2015); ezen kívül allergiás folyamatokban is szerepet játszik (Hoving és mtsi., 2014). A Dectin-2 receptor szintén a Syk kinázt aktiválja, azonban – mivel intracelluláris doménje nem tartalmaz ITAM-szerű motívumot – a jeltovábbításhoz szükség van a receptor FcR γ adapterrel való asszociációjára (Plato és mtsi., 2015). 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 (Plato és mtsi., 2015). A Dectin-2 receptor is szerepet játszik azonban a Th17 válasz szabályozásában (Robinson és mtsi., 2009).

A mannóz receptor (MR) egyike a legkorábban azonosított CLR-eknek; nyolc extracelluláris CTLD-t tartalmaz, amelyek segítségével mannóz-, fukóz-, valamint N-acetil glükózamin-tartalmú struktúrákat ismer fel (Plato és mtsi., 2015). 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 (van de Veerdonk és mtsi., 2009). Ugyanakkor a MR deficiens egerek csak a *C. neoformans* fertőzéssel szemben mutatnak csökkent rezisztenciát, *C. albicans*-szal és *P. carinii*-vel szemben nem (Brown, 2011).

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 (Plato és mtsi., 2015). A DC-SIGN többek között *C. albicans*, *A. fumigatus* és *Mycobacterium* fajok felismerésére képes, és a ligand természetétől függően különféle szignalizációs útvonalakat aktiválhat (Plato és mtsi., 2015). Több CLR-rel is képes együttműködni, és azok aktivációját szabályozva pro- vagy antiinflammatorikus választ kiváltani (Plato és mtsi., 2015). A Galectin-3 ugyan nem a C-típusú, hanem az S-típusú lektin receptorok közé tartozik, azonban fontos szerepe van a *C. albicans* felismerésében (Jouault és mtsi., 2006). Kimutatták, hogy a makrofágok galectin-3 segítségével felismerik a *C. albicans*-t (illetve a

gomba sejtfalában található β -1,2-mannánt), a *S. cerevisiae*-t azonban nem (Jouault és mtsi., 2006). Továbbá, a galectin-3 szerepet játszik szisztémás *C. albicans* és *C. parapsilosis* fertőzés esetén is (Linden és mtsi., 2013a).

3.6.1.1.4. NOD-szerű receptorok (NLR)

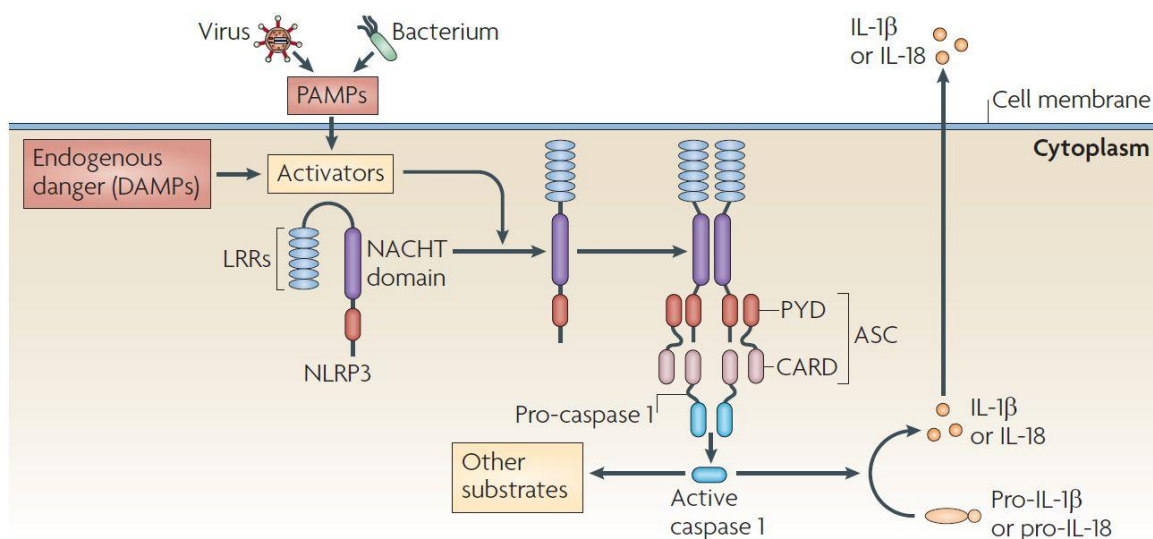
Az intracelluláris lokalizációjú NOD-szerű receptorok családja emberben 23, egérben 34 tagot számlál (Kumar és mtsi., 2011). A receptorok általános felépítésére jellemző, hogy három doménből állnak: a C-terminális domén leucin gazdag ismétlődéseket tartalmaz, ezt tartják felelősnek a mikrobiális PAMP-ok 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 (Kumar és mtsi., 2011). 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) (Zhong és mtsi., 2013). 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 (Kumar és mtsi., 2011). A gombák elleni immunválaszban azonban azoknak a NLR-oknak van kiemelkedő szerepe, amelyek az inflammaszómák kialakításában vesznek részt.

3.6.1.2. Az inflammaszómák

Az inflammaszómák olyan intracelluláris multiprotein komplexek, amelyek az IL-1 családba tartozó gyulladásos citokinek (IL-1 β , IL-18) érett formájának kialakításáért felelősek (Martinon és mtsi., 2002). Általános felépítésükre jellemző, hogy tartalmaznak valamilyen (többnyire az NLR családba tartozó) szenzor fehérjét, amelyhez az ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) adapteren keresztül prokaspáz-1 kapcsolódik (Vanaja és mtsi., 2015). Az ASC adapter két doménből áll, N-terminálisán PYD, C-terminálisán CARD helyezkedik el (Martinon és mtsi., 2009). A prokaspáz-1 szintén CARD domént tartalmaz, így az inflammaszóma összeszerelődésekor a fehérjék PYD-PYD és CARD-CARD interakciókon keresztül kapcsolódnak egymáshoz

(Tsuchiya és Hara, 2014). A legújabb kutatási eredmények szerint az ASC-tartalmú inflammaszómák filamentáris szerkezetűek: a szenzor fehérjék oligomerizációját ASC filamentumok kialakulása követi, ami a pro-kaspáz-1 multimerek kialakulásához szolgál bázisul (Lu és Wu, 2015). A komplex aktivációja során az inaktív pro-kaspáz-1 elhasad, aktív kaspáz-1 enzimet eredményezve, amely a pro-IL-1 β és pro-IL-18 elhasításával létrehozza a citokinek bioaktív formáját (Kumar és mtsi., 2011). Hagyományosan az inflammaszómáknak négy típusát (NLRP1, NLRP3, NLRC4 és AIM2) különböztetjük meg, azonban a közelmúltban újabb komplexeket (pl. NLRP6, NLRP12) is felfedeztek (Vanaja és mtsi., 2015). A legelsőként leírt NLRP1 inflammaszóma NLRP1, ASC, valamint kaspáz-1 és kaspáz-5 fehérjék komplexe (Martinon és mtsi., 2002). Míg a komplexet egerekben az anthrax letális toxin aktiválja, a kissé eltérő szerkezetű humán NLRP1 inflammaszóma a muramil dipeptidok felismeréséért felelős (Tsuchiya és Hara, 2014). Az AIM2 (absent in melanoma 2) fehérje a PYHIN fehérjecsaládba tartozik, és PYD doménjén keresztül képes kapcsolódni az ASC-hez, kialakítva így az AIM2 inflammaszómát. A komplexet bakteriális és virális dsDNS aktiválja, és többek között *Listeria monocytogenes* és *Streptococcus pneumoniae* felismerésében játszik szerepet (Tsuchiya és Hara, 2014). Az NLRC4 inflammaszómát szintén főként bakteriális kórokozók aktiválják, például *Shigella flexneri* vagy *Salmonella typhimurium* (Kumar és mtsi., 2011). Ugyan a pro-kaspáz-1 CARD doménjén keresztül közvetlenül is képes az NLRC4-hez kapcsolódni, a kaspáz aktivációhoz szükség van az ASC adapterre is (Tsuchiya és Hara, 2014). Jelenleg az NLRP3 inflammaszómáról van a legtöbb ismeretünk. Az NLRP3 (másik nevén cryopyrin), ASC és pro-kaspáz-1 fehérjékből álló komplexet számos endogén és exogén stimulus aktiválhatja, amelyek lehetnek oldott és partikuláris természetűek is (4. ábra). Gyakran említett aktivátorok például az ATP, nátrium-urát kristályok, alumínium és nigericin (Tsuchiya és Hara, 2014). Patogének közül számos baktérium (pl. *Staphylococcus*, *Streptococcus*), vírus (pl. influenza vírus) és gomba (pl. *C. albicans*, ld. később) képes aktiválni az NLRP3 inflammaszómát (Vanaja és mtsi., 2015). A jelenlegi elképzelés szerint ezek az aktivátorok nem közvetlenül az NLRP3 szenzorral lépnek kapcsolatba, hanem bizonyos celluláris eseményeket indukálnak, amelyeket az inflammaszóma érzékelni képes. Az inflammaszóma aktivációval leggyakrabban kapcsolatba hozott „veszély” szignálok az intracelluláris K⁺ koncentráció csökkenése, reaktív oxigéngyökök képződése, illetve a lizoszóma membrán károsodása (Vanaja és mtsi., 2015). Bár egyre nagyobb ismeretanyag halmozódik fel az

inflammaszómákról, aktivációjuk pontos mechanizmusa továbbra sem tisztázott. Számos mechanizmust, illetve molekulát azonosítottak azonban, amelyek az inflammaszóma aktivációt szabályozzák. Az NLRP3 inflammaszóma negatív regulációjában fontos szerepet játszanak többek között az I-es típusú interferonok, a TRIM fehérjék, a nitrogén-monoxid, bizonyos endogén mikroRNS-ek és az autofágia, de a CD4⁺ T-sejtekről is kimutatták, hogy gátolhatják az inflammaszóma aktivációt (Chen és Sun, 2013).



4. ábra. Az NLRP3 inflammaszóma szerkezete és aktivációja. (Tschopp és Schroder, 2010)

3.6.1.2.1. Az IL-1 β élettani szerepe

Az IL-1 β az egyik legjelentősebb gyulladásos citokin, amelynek steril gyulladások és mikrobiális fertőzések során is igen fontos szerepe van (Netea és mtsi., 2010b). Az IL-1 β -t főként monociták, makrofágok és dendritikus sejtek termelik, de egyéb sejttípusok is szekretálják (van de Veerdonk és Netea, 2013). Az IL-1 β inaktív formában termelődik (pro-IL-1 β), és proteolitikus hasítást követően alakul ki az érett, bioaktív formája (Netea és mtsi., 2010b). Noha bizonyos szerin proteázok (pl. proteináz-3, kimotripszin, elasztáz) is képesek az IL-1 β érett formájának kialakítására, a legjelentősebb a pro-IL-1 β kaszpáz-1 általi hasítása inflammaszóma aktivációt követően (Netea és mtsi., 2014). Az IL-1 β funkciója igen sokrétű; többek között fokozza egyéb gyulladásos mediátorok (TNF α , IL-6, kemokinek) termelését, fokozza az NK sejtek aktivációját, serkenti a fagocitózist, valamint hozzájárul a dendritikus sejtek éréséhez és a Th17 sejtek differenciációjához (Dinarello,

2011). Ezen kívül hatással van a központi idegrendszerre is, fontos szerepet játszik a lázzal, aluszékonysággal és étvágytalansággal járó akut-fázis reakció kiváltásában különböző fertőzések során (Netea és mtsi., 2010b). Fontos kiemelni, hogy az IL-1 β túlzott mértékű termelődése krónikus gyulladás kialakulásához vezethet. Számos ún. autoinflammatorikus szindrómát leírtak, amelyek során súlyos ízületi gyulladás, láz és bőr léziók figyelhetők meg, a tünetek azonban IL-1Ra (IL-1 receptor antagonist) kezelés hatására jelentősen javulnak (Netea és mtsi., 2010b). Ebbe a betegségcsoportba tartoznak az ún. cryopyrin-asszociált periodikus szindrómák (cryopyrin-associated periodic syndromes, CAPS), amikor NLRP3 mutáció miatt inflammaszóma hiperaktiváció figyelhető meg (Netea és mtsi., 2010b).

3.6.1.2.2. Az inflammaszóma aktiváció szerepe a gombák elleni immunválaszban

Több patogén gombáról (*C. albicans*, *A. fumigatus*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *C. neoformans*) is kimutatták, hogy képes aktiválni az NLRP3 inflammaszómát (Hise és mtsi., 2009; Said-Sadier és mtsi., 2010; Lei és mtsi., 2013; Tavares és mtsi., 2013). *C. albicans* fertőzés esetén az inflammaszóma aktiváció fontos szerepet játszik a szervezet védelmében; kimutatták, hogy a kaszpáz-1-, ASC- és NLRP3-deficiens egerek sokkal kevésbé ellenállóak a *C. albicans* fertőzéssel szemben, mint a vad típusú állatok (Hise és mtsi., 2009; van de Veerdonk és mtsi., 2011).

Az NLRP3 inflammaszóma aktivációja makrofágokban és dendritikus sejtekben kétlépéses folyamat: elsőként az NLRP3 és pro-IL-1 β fehérjék expressziójára van szükség, amelyet mikrobiális fertőzés esetén a PRR-ok aktivációja indukál, majd második lépésben összeszerelődik az inflammaszóma és aktiválódik a kaszpáz-1 (Tsuchiya és Hara, 2014). A Dectin-1/Syk útvonal különösen fontos szerepet játszik a *C. albicans* által indukált inflammaszóma aktivációban (Gross és mtsi., 2009; Cheng és mtsi., 2011); kimutatták, hogy dendritikus sejtekben a Syk kináz szükséges mind a pro-IL-1 β expresszióhoz, mind az inflammaszóma aktivációjához (Gross és mtsi., 2009). Míg dendritikus sejtekben a TLR-ek által indukált MyD88 aktiváció nem szükséges az inflammaszóma aktivációhoz (Gross és mtsi., 2009), makrofágokban a *C. albicans* által indukált IL-1 β termelés TLR2- és Dectin-1-függő (Hise és mtsi., 2009). Különböző tanulmányok kimutatták, hogy a fagocitózis, katepszin B aktivitás, ROS termelés és K⁺ efflux mind kapcsolatba hozható a *C. albicans* által indukált inflammaszóma aktivációval (Gross és mtsi., 2009; Joly és mtsi.,

2009), azonban ezen mechanizmusok pontos funkciója az aktiváció folyamatában továbbra sem tisztázott, ráadásul sejttípusonként is eltérő lehet (Joly és Sutterwala, 2010). A hifaképzés szerepe a *C. albicans* által indukált inflammaszóma aktivációban szintén ellentmondásos; míg bizonyos tanulmányok szerint az élesztő-hifa átalakulás esszenciális az aktivációhoz (Joly és mtsi., 2009; Cheng és mtsi., 2011), mások arra a következtetésre jutottak, hogy bizonyos, csak élesztőszerű növekedésre képes *C. albicans* mutánsok is képesek inflammaszóma aktivációt kiváltani, ugyanakkor más mutánsok esetében fonalas növekedés mellett sem történik IL-1 β szekréció (Wellington és mtsi., 2012). Ezen eredmények alapján úgy tűnik, hogy nem a hifák fizikai jelenléte, hanem bizonyos, a fonalas növekedéshez köthető faktorok megváltozott expressziója szükséges az inflammaszóma aktivációjához. A többi inflammaszóma (AIM2, NLRP1, NLRC4) szerepéről gombafertőzések esetén kevés ismeretünk van; kimutatták azonban, hogy az NLRC4 inflammaszóma szerepet játszik a mukóza védelmében orális candidiasis esetén (Tomalka és mtsi., 2011). Ezzel ellentétben *in vitro* tanulmányok szerint makrofágokban és dendritikus sejtekben a *C. albicans* által indukált IL-1 β szekréció független az NLRC4-től (Gross és mtsi., 2009; Joly és mtsi., 2009).

3.6.1.3. A természetes immunitás effektor sejtjei

A természetes immunrendszer effektor sejtjei (neutrofil granulociták, monociták, makrofágok, dendritikus sejtek) kulcsszerepet töltenek be a patogén gombák elleni védekezésben (Brown, 2011). A neutrofilek szerepét a szervezet védelmében legjobban a neutropéniában szenvedő betegek gombafertőzésekre való fogékonysága jelzi (Walsh és Gamaletsou, 2013). Ezen sejtek legfőbb funkciója a patogének bekebelezése és közvetlen elpusztítása (Romani, 2011). 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 (Netea és mtsi., 2008). A neutrofilek igen hatékonyak a gombák szaporodásának megfékezésében; kimutatták például, hogy drasztikus transzkripciós változásokat indukálnak a *C. albicans* sejtjeiben, ami a hifaképzés repressziójához vezet (Fradin és mtsi., 2005). A neutrofilek mind intracelluláris, mind extracelluláris mechanizmusok segítségével képesek eliminálni a különböző kórokozókat (Cheng és mtsi., 2012). Fagocitózist követően a bekebelezett patogént tartalmazó fagoszómák lizoszómákkal

fuzionálnak, majd különböző hidrolitikus enzimek, antimikrobiális peptidek és reaktív oxigéngyökök segítségével megtörténik a patogén elpusztítása (Cheng és mtsi., 2012). A reaktív oxigéngyökök képződésében igen fontos szerepet játszik a NADPH-oxidáz, egy több alegységből álló enzimkomplex, amely aktivációt követően szerelődik össze a fagoszóma membránjában (Brown, 2011). A NADPH-oxidáz a molekuláris oxigént szuperoxiddá alakítja, majd ebből további reaktív intermedierek (hidrogén-peroxid, hidroxil gyök) képződnek (Brown, 2011). A neutrofilek képesek a *Candida* sejteket ún. extracelluláris csapdák (neutrophil extracellular trap, NET) segítségével is elpusztítani (Urban és mtsi., 2006).

Ugyan a monociták és makrofágok általában alacsonyabb fungicid aktivitással rendelkeznek, mint a neutrofilek (Cheng és mtsi., 2012), nagyon fontos szerepük van a patogének elleni gyulladásos válasz kialakításában (Netea és mtsi., 2006). 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 (Netea és mtsi., 2008). Meg kell azonban jegyezni, hogy a PRR-ok megjelenését a sejtfelszínen 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 (Kim és mtsi., 2005; Netea és mtsi., 2006; Smeekens és mtsi., 2011). Ezeknek a fehérjéknek egyrészt kulcsszerepük van a fagociták antimikrobiális aktivitásának fokozásában (Netea és mtsi., 2006), másrészt fontos szerepet játszanak a CD4⁺ T-sejtek polarizációjában is (Romani, 2011). A gyulladásos citokinek protektív szerepét bizonyítja az is, hogy az *il6*^{-/-}, *tnfa*^{-/-}, és *il1r*^{-/-} egerek fokozott érzékenységet mutatnak az invazív *Candida* fertőzéssel szemben a vad típusú állatokhoz képest (Romani és mtsi., 1996; Netea és mtsi., 1999; Hise és mtsi., 2009).

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 a patogén mikroorganizmusokkal szemben. Különösen nagy számú mintázatfelismerő receptort hordoznak (Netea és mtsi., 2008), a kórokozók fagocitózist követően pedig fontos szerepük van az antigének prezentálásában és így az adaptív immunválasz elindításában (Cheng és mtsi., 2012). A dendritikus sejtek is számtalan különféle citokin termelésére

képesek, amelyek egyrészt hozzájárulnak a gyulladásos válasz kialakításához, másrészt meghatározzák a T-sejtes immunválasz irányát (Romani, 2011).

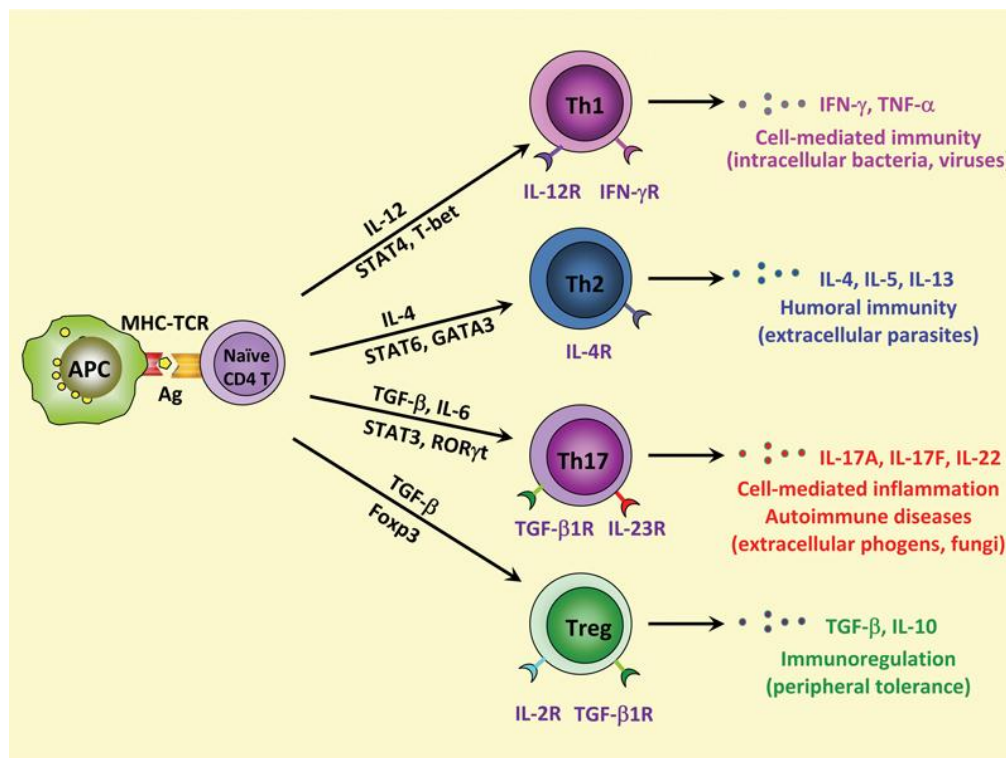
A fent említett sejtípusokon kívül az ún. ILC sejtek (innate lymphoid cells) is fontos szerepet játszanak a gombák elleni immunválaszban. Ezen sejtek közös jellemzője, hogy limfoid eredetűek, de nem hordoznak antigén-specifikus receptort (Gladiator és LeibundGut-Landmann, 2013). Különösen fontos, hogy több ILC populáció is képes IL-17 termelésre, ami fontos szerepet játszik a *C. albicans* elleni immunválaszban (Gladiator és mtsi., 2013).

3.6.2. A gombák ellen kialakuló adaptív immunválasz

3.6.2.1. 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 (Luckheeram és mtsi., 2012). A T-limfociták között megkülönböztetünk $CD4^+$ Th, valamint $CD8^+$ citotoxikus T-sejteket. Míg a $CD8^+$ T-sejtek a vírusfertőzött, illetve tumoros sejtek közvetlen eliminációjában játszanak fontos szerepet (Kaeck és Cui, 2012), a $CD4^+$ limfociták más immunsejtek (makrofágok, B-limfociták, $CD8^+$ T-sejtek), illetve egyéb sejtípusok aktivációját és effektor funkcióit szabályozzák (Luckheeram és mtsi., 2012). 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 (van de Veerdonk és Netea, 2010). A CD^+ Th sejteket funkcióik és citokin profiljuk alapján különböző populációkra oszthatjuk. Míg hagyományosan a Th sejtek két nagy csoportját (Th1 és Th2) különítették el (Mosmann és Coffman, 1989), később felfedezték a $CD4^+$ $CD25^+$ regulátoros T-sejteket (Treg) (Shevach, 2001), majd a Th17 populációt (Park és mtsi., 2005) (5. ábra). A naív T limfociták effektor sejtekké történő differenciálódásának első lépése a T-sejt receptor (TCR) aktivációja az APC által MHC I vagy MHC II molekulákon prezentált antigénekkal való kölcsönhatás következtében. A Th polarizációt (a Th1, Th2, Th17, Treg vonalak kialakulását) sok faktor szabályozza, többek között a citokin környezet, az antigén

koncentrációja, az APC típusa, illetve a kostimulációs molekulák jelenléte (Luckheeram és mtsi., 2012). Mivel a különböző PRR-ek aktivációja meghatározza az APC által szekretált citokinek spektrumát, ezek a receptorok kulcsszerepet játszanak a Th sejtek differenciációjának szabályozásában (Romani, 2011). Míg az antigén stimulus megszűnése (a fertőző ágens eliminációja) után az effektor T-sejtek túlnyomó többsége elpusztul, a sejtek néhány százaléka hosszú életű T_{CM} (T central memory) és T_{EM} (T effector memory) memóriasejttekké differenciálódik (Sallusto és mtsi., 2004).



5. ábra. A különböző Th populációk differenciációja naiv $CD4^+$ T limfocitákból. (Leung és mtsi., 2010)

3.6.2.1.1. Th1 sejtek

A Th1 sejtek differenciálódásához szükséges legfontosabb citokin az antigén prezentáló sejtek által termelt IL-12 (Luckheeram és mtsi., 2012). A Th1 sejtek nagy mennyiségben termelnek $IFN\gamma$ -t, ami a fagociták aktivációjának fokozása által kulcsszerepet játszik az intracelluláris patogének elleni védelemben (Luckheeram és mtsi., 2012). Továbbá, a Th1 sejtek indukálják az opszonizáló antitestek szintézisét, ami szintén hozzájárul a hatékony fagocitózishoz (Borghi és mtsi., 2014). 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 (Luckheeram és mtsi., 2012). Számos példa bizonyítja, hogy gombafertőzések esetén a Th1 irányú differenciáció szükséges a patogének hatékony eliminációjához (Romani, 2011). Az IFN γ szerepét jelzi például, hogy az IFN γ deficiens egerek sokkal fogékonyabbak az invazív candidiasis-ra, mint a vad típusú állatok (Balish és mtsi., 1998). A Th1 válasz protektív szerepét továbbá *H. capsulatum* és *A. fumigatus* fertőzések esetén is bizonyították (van de Veerdonk és Netea, 2010).

3.6.2.1.2. Th2 sejtek

A Th2 sejtek az extracelluláris paraziták elleni védelemben, valamint allergiás folyamatokban játszanak fontos szerepet (Luckheeram és mtsi., 2012). 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 (Luckheeram és mtsi., 2012). A Th2 irányú válasz általában hátrányosnak tekinthető a gombafertőzések kimenetele szempontjából (Romani, 2011). 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 (Romani, 2011). 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 (Haraguchi és mtsi., 2010). 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 gombafertőzések (pl. *C. neoformans*, *H. capsulatum*) esetében többnyire Th2-domináns válasz mutatható ki (Wuthrich és mtsi., 2012). *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 (Romani és mtsi., 2002). Ennek hátterében az áll, hogy a hifák sejtfalában a β -glükán nem hozzáférhető a Dectin-1 számára (Gantner és mtsi., 2005; Romani, 2011), ami egyfajta túlélési stratégia a patogén részéről.

3.6.2.1.3. Th17 sejtek

A Th17 populáció kiemelkedő szerepét gombafertőzések 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 (Hernandez-Santos és Gaffen, 2012). Legfontosabb effektor citokinjeik az IL-17, IL-21 és IL-22 (Luckheeram és mtsi., 2012). Az IL-17 intenzív gyulladásos választ indukál, számos citokin (pl. IL-6, GM-CSF) és kemokin (pl. KC (keratinocyte chemoattractant), IL-8, CCL5 (chemokine ligand 5) termelését serkenti, kulcsszerepet játszik a neutrofilek fertőzés helyére történő vándorlásának szabályozásában (Shen és Gaffen, 2008). Az IL-22 szintén lehet gyulladásos hatású (számos sejttypusban fokozza különböző citokinek és kemokinek szintézisét (Ouyang és mtsi., 2008)), ugyanakkor fontos szerepet játszik a mukóza védelmében különböző gyulladáscsökkentő antimikrobiális peptidek (S100A8, S100A9) szekréciójának fokozása által (Romani, 2011). Az első tanulmány, amely az IL-17 gombafertőzések 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 (Huang és mtsi., 2004). Azóta a Th17 populáció, illetve az IL-17 kritikus szerepét gombafertőzések során számos tanulmány megerősítette. Kimutatták, hogy a Th17 populáció fontos szerepet játszik az orális candidiasis elleni védelemben is, a Th17 deficiens egerek ugyanis fogékonyabbak erre a fertőzésre (Conti és mtsi., 2009). 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 (Eyerich és mtsi., 2008); továbbá, az IL-17R mutációt a CMC egyik lehetséges kiváltó okaként azonosították (Puel és mtsi., 2011). A Th17 differenciációban több CLR (Dectin-1, Dectin-2, mannóz receptor) is fontos szerepet játszik (van de Veerdonk és Netea, 2010). A Dectin-1 vagy CARD9 mutációt hordozó betegek szintén fogékonyak a CMC-ra, aminek a hátterében a defektív IL-17 válasz áll (Ferwerda és mtsi., 2009; Glocker és mtsi., 2009). A Th17 populáció szerepét azonban nemcsak *C. albicans*, hanem *C. neoformans*, *H. capsulatum* és *P. braziliensis* fertőzés esetén is bizonyították (van de Veerdonk és Netea, 2010). 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 (van de Veerdonk és mtsi., 2011).

3.6.2.1.4. Treg sejtek

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 (Luckheeram és mtsi., 2012). 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 (Netea és mtsi., 2004; Kroetz és Deepe, 2010), *Pneumocystis* fertőzés esetén a Treg-ek jelenléte jelentősen csökkenti a tüdőben kialakuló gyulladást és szöveti károsodást, így pozitív hatású a betegség kimenetele szempontjából (McKinley és mtsi., 2006). Továbbá, fiziológias körülmények között a Treg-ek által termelt IL-10-re szükség van a normál mikrobiális egyensúly és tolerancia fenntartásához (Romani, 2011).

3.6.2.1.5. CD8⁺ T-sejtek

A citotoxikus T-limfocitáknak általában kisebb szerepet tulajdonítanak a gombák elleni védekezésben, mint a Th populációnak, azonban több tanulmány is megerősíti, hogy fontosak lehetnek a gombaellenes immunválaszban. Kimutatták például, hogy a CD8⁺ T-sejtek képesek gátolni a *C. albicans* hifák növekedését *in vitro* (Benó és mtsi., 1995). Orális candidiasis-ban szenvedő HIV fertőzöttekben a CD8⁺ sejtek infiltrációja mutatható ki a szájnyálkahártyában, jelezve ezen sejtek szerepét az immunválaszban (Myers és mtsi., 2003). CD4⁺ T-sejt hiányos egér modellben a CD8⁺ sejtek fontos szerepet játszanak az orális candidiasis elleni védelemben (Marquis és mtsi., 2006). *H. capsulatum* fertőzés esetén leírták, hogy a dendritikus sejtek képesek az extracelluláris antigéneket MHC I molekuláikon prezentálni (keresztprezentáció) és így hatékony CD8⁺ választ kiváltani (Lin és mtsi., 2005). Ezen túlmenően a CD8⁺ sejtek protektív szerepét *C. neoformans* és *P. carinii* fertőzés esetén is kimutatták (van de Veerdonk és Netea, 2010).

3.6.2.1.6. $\gamma\delta$ T-sejtek

A kis diverzitású $\gamma\delta$ TCR-rel rendelkező $\gamma\delta$ T-sejtek a természetes és adaptív immunitás határán helyezkednek el, mert egyrészt képesek antigén-specifikus adaptív választ kiváltani, másrészt bizonyos stimulusok által közvetlenül is aktiválhatók (Kobayashi és Tanaka, 2015). A $\gamma\delta$ T-sejtek főleg a perifériás szövetekben lokalizálódnak, és intenzív IL-17 termelésre képesek (Shibata és mtsi., 2008). Az utóbbi években, több tanulmányban is kimutatták a $\gamma\delta$ T-sejtek szerepét a *C. albicans* fertőzés elleni immunválaszban. Dejima és munkatársai kimutatták, hogy szisztémás candidiasis esetén a $\gamma\delta$ T-sejtek által termelt IL-17 a tüdőben nélkülözhetetlen a neutrofil infiltrációhoz (Dejima és mtsi., 2011). Egy másik tanulmány arról számol be, hogy orális candidiasis esetén a helyileg termelődő IL-17 túlnyomórészt $\gamma\delta$ T-sejtekből és ún. természetes Th17 sejtekből (nTh17) származik (Conti és mtsi., 2014). A $\gamma\delta$ T-sejtek tehát fontos szerepet játszanak candidiasis esetén a mukóza védelmében.

3.6.2.2. B-sejtes immunválasz

Noha gombafertőzések során sok esetben kimutathatóak a vérből antigén-specifikus immunglobulinok, ezek tényleges protektív szerepére minimális bizonyíték van (Wuthrich és mtsi., 2012). Ugyanakkor számos tanulmányban kimutatták, hogy gomba antigének ellen termeltetett monoklonális antitestek védelmet biztosítanak *C. albicans*, *C. neoformans* és *H. capsulatum* fertőzés ellen (Mukherjee és mtsi., 1993; Nosanchuk és mtsi., 2003; Bugli és mtsi., 2013). A jövőben azonban mindenképpen további kutatásokra lesz szükség a B-sejtes immunválasz gombafertőzések során játszott szerepének megértéséhez.

3.6.3. 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. Mindössze néhány tanulmány vizsgálta eddig a *C. parapsilosis* immunológiai felismerését, vagy az általa indukált citokin termelést. Az elmúlt években csoportunk vizsgálta a *C. parapsilosis* által kiváltott gyulladásos választ egér és humán makrofágokban (Nemeth és mtsi., 2014; Toth és mtsi.,

2014a), valamint videó mikroszkópia segítségével összehasonlította a *C. albicans* és *C. parapsilosis* interakcióját egér és humán makrofágokkal fagocitózis, sejtkárosító képesség és intracelluláris ölés tekintetében (Toth és mtsi., 2014b). 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 (Linden és mtsi., 2013a; Linden és mtsi., 2013b). Ezen túlmenően néhány tanulmányban vizsgálták a *C. parapsilosis* epítelsejtekkel való interakcióját (Bahri és mtsi., 2010; Moyes és mtsi., 2012). Egyetlen tanulmányban sem vizsgálták még azonban átfogóan a *C. parapsilosis* immunológiai felismerését, valamint a *C. parapsilosis* által indukált Th-sejtes immunválaszt, illetve az inflammaszóma-aktivációt.

4. Célkitűzések

Annak ellenére, hogy a *C. parapsilosis* fertőzések klinikai jelentősége egyre nő, a betegségek immunológiai hátteréről még midig 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 kölcsönhatása az emlős immunrendszerrel jelentősen különbözhet. Annak érdekében, hogy több információt nyerjünk a *C. parapsilosis* ellen kialakuló immunválaszról, az alábbi célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

I. Humán perifériás vérből izolált mononukleáris sejtek *C. parapsilosis* és *C. albicans* fertőzésre adott válaszreakciójának összehasonlítása

- A *C. parapsilosis* és a *C. albicans* által indukált T helper sejt polarizáció összehasonlítása
- A *C. parapsilosis* immunológiai felismerésében szerepet játszó receptorok azonosítása
- A *C. parapsilosis* felismerését követő intracelluláris jelátvitel elemeinek vizsgálata

II. *C. parapsilosis* és *C. albicans* által kiváltott inflammaszóma aktiváció összehasonlítása PMA-indukált THP-1 makrofágokban

5. Anyagok és módszerek

5.1. Alkalmazott *Candida* törzsek és humán sejtkultúrák

5.1.1. Alkalmazott *Candida* törzsek

A munkánk során felhasznált *Candida* törzseket az 1. táblázat tartalmazza. Kísérleteink során típustörzsként a *C. parapsilosis* GA1 (Gacser és mtsi., 2005) és a *C. albicans* SC5314 (Gillum és mtsi., 1984) vad típusú, laboratóriumi törzseket használtuk. Az összes *Candida* törzs elérhető a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar Mikrobiológiai Tanszékének törzsgyűjteményében (Szeged Microbiological Collection (SZMC), <http://www.sci.u-szeged.hu/microbiology/>).

1. táblázat. Felhasznált *Candida* törzsek.

Fajnév	Törzs	SZMC kód	Származási hely	Forrás	Referencia
<i>C. parapsilosis</i>	GA1	SZMC 8110	Hamburg, Németország	humán vér	(Gacser és mtsi., 2005)
<i>C. parapsilosis</i>	CLIB214	SZMC 1560	Puerto Rico	n. a.	(Guerin és mtsi., 1989)
<i>C. parapsilosis</i>	CLIB214 HF*	SZMC 22802	laboratóriumunkban létrehozott törzs	n. a.	n. a.
<i>C. parapsilosis</i>	75	SZMC 8002	Debrecen, Magyarország	humán fül	n. a.
<i>C. parapsilosis</i>	79	SZMC 1596	Debrecen, Magyarország	humán seb	n. a.
<i>C. parapsilosis</i>	82	SZMC 8111	USA	ép humán bőr	(Valach és mtsi., 2012)
<i>C. albicans</i>	SC5314	SZMC 1523	New York, USA	invazív candidiasisban szenvedő beteg	(Gillum és mtsi., 1984)
<i>C. albicans</i>	L43	SZMC 22800	n. a.	n. a.	n. a.
<i>C. albicans</i>	L44	SZMC 22801	n. a.	n. a.	n. a.
<i>C. metapsilosis</i>	PL 429	SZMC 1548	Kalifornia, USA	humán	(Lott és mtsi., 1993; Valach és mtsi., 2012)

n. a., nincs adat. * A *C. parapsilosis* CLIB214 törzséből létrehozott, a 200390 jelű (ismeretlen funkciójú) génre homozigóta mutáns, hiperfilamentáló fenotípust mutató törzs. Genotípusa: *leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, CPAR2_200390::LEU2/CPAR2_200390::HIS1*.

5.1.2. Alkalmazott humán sejt kultúrák

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

THP-1 sejt vonal: akut mieloid leukémiás betegből származó monocita-szerű sejt vonal (Sigma-Aldrich)

THP-1-defASC sejt vonal: ASC-deficiens THP-1 sejt vonal (Invivogen)

THP-1-defNLRP3 sejt vonal: NLRP3-deficiens THP-1 sejt vonal (Invivogen)

5.2. Táptalajok, tápoldatok, pufferek és egyéb reagensek

PBS (phosphate buffered saline): 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄ (pH 7,4)

YPD (yeast extract-peptone-dextrose) tápoldat/táptalaj: 0,5 m/V% élesztőkivonat, 1 m/V% pepton, 1 m/V% glükóz tartalmú tápoldat 100 I.U./ml penicillinnel és 100 µg/ml streptomycinnel (Sigma-Aldrich), továbbá szilárd táptalaj esetén 2 m/V% agarral kiegészítve

RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640) tápoldat: RPMI 1640 tápoldat (Lonza v. Life Technologies) 50 µg/ml gentamicinnel, vagy 100 I.U./ml penicillin és 100 µg/ml streptomycin kombinációjával kiegészítve

THP-1 tápoldat: RPMI 1640 tápoldat 10 V/V% hőinaktivált borjúszérummal (fetal bovine serum, FBS; Lonza), 100 I.U./ml penicillinnel, 100 µg/ml streptomycinnel és 0,05 µM β-merkaptotetanollal kiegészítve, 0,22 µm pórusméretű szűrőn átszűrve

PBMC-DM tápoldat: 100 I.U./ml penicillint, 100 µg/ml streptomycint és 10 ng/ml granulocita-monocita kolónia stimuláló faktort (GM-CSF, Sigma-Aldrich) tartalmazó szérummentes X-VIVO 15 (Lonza) tápoldat

tripánkék festék: 0,4 m/V% tripánkék festék PBS pufferben

FC puffer: 2 V/V% FBS PBS pufferben

PBA puffer: 1 m/V% bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich) PBS pufferben

ELISA mosópuffer: 0,1 V/V% Tween-20 PBS pufferben

ELISA szubsztrát puffer: 0,11 M Na-acetát puffer, pH 5,5 (96 %-os ecetsavval beállítva)

ELISA szubsztrát oldat: 0,1 mg/ml TMB és 0,003 V/V% H₂O₂ ELISA szubsztrát pufferben

TMB: 6 mg/ml TMB (tetramethylbenzidine, Sigma-Aldrich) DMSO-ban oldva

E. coli LPS: *E. coli* LPS desztillált vízben oldva (Sigma-Aldrich), végkoncentráció 10 ng/ml

PMA: forbol-mirisztol-acetát DMSO-ban oldva (Sigma-Aldrich), végkoncentráció 10 nM

5.3. Alkalmazott inhibitorok

A kísérletek során felhasznált különböző inhibitorokat a 2. táblázat tartalmazza.

2. táblázat. Felhasznált inhibitorok.

Inhibitor	Reagens	Gyártó	Hordozó	Végkoncentráció
Syk inhibitor	ER 27319 maleate	RnD Systems	DMSO	5 μ M
TLR4 inhibitor	CLI-095	Invivogen	DMSO	5 μ M
TLR4 inhibitor	<i>Bartonella quintana</i> LPS	saját preparátum	desztillált víz	100 ng/ml
TLR2 inhibitor	Human TLR2 MAb (Clone 383936)	RnD Systems	PBS	0,15 μ g/ml
p38 kináz inhibitor	SB 202190	Sigma-Aldrich	DMSO	1 μ M
JNK inhibitor	SP 600125	A. G. Scientific	DMSO	20 μ M
MEK/ERK inhibitor	U0126	Promega	DMSO	10 μ M
IRAK-1/4 inhibitor	CAS 509093-47-4	EMD Millipore	DMSO	5 μ M
Dectin-1 inhibitor	Laminarin	Sigma-Aldrich	desztillált víz	50 μ g/ml
Kaspáz-1 inhibitor	Z-WEHD-FMK	RnD Systems	DMSO	10 μ M
Kaspáz-8 inhibitor	Z-IETD-FMK	RnD Systems	DMSO	10 μ M
Pán-kaspáz inhibitor	Z-VAD-FMK	RnD Systems	DMSO	10 μ M
NADPH-oxidáz inhibitor	Apocynin	RnD Systems	DMSO	600 μ M
Fagocitózis inhibitor	Cytochalasin D	RnD Systems	DMSO	2,5 μ M
Katepszin B inhibitor	CA-074-Me	RnD Systems	DMSO	25 μ M

5.4. Sejtenyésztés, primer sejtek izolálása

Candida törzsek tenyésztése

A felhasznált *Candida* törzsek fenntartása YPD táptalajon történt havonkénti átoltással, az izolátumokat 4 °C-on tároltuk. A kísérleteket megelőző napon a szükséges törzsekből átoltottunk 2 ml YPD tápoldatot tartalmazó steril centrifugacsövekbe, amelyeket éjszakára 30 °C-os rázó inkubátorba helyeztünk (200 rpm). Másnap a sejteket centrifugálással (3000 rpm, 5 p, 25 °C) összegyűjtöttük, kétszer PBS pufferrel mostuk, majd Bürker kamra segítségével meghatároztuk a szuszpenziók sejtszámát. Hővel előlt *Candida* sejtek használata esetén a szuszpenziókat 30 percig 100 °C-os vízfürdőben inkubáltuk.

PBMC izolálás

A perifériás vérből származó mononukleáris sejtek izolálása egészséges felnőtt donoroktól származó ún. *buffy coat* vérkészítményből történt, amelyet a Szegedi Regionális Vérellátó Központ biztosított. A *buffy coat* készítményekből PBMC frakciót Ficoll gradiens centrifugálással különítettük el. Ehhez a vért 1:2 arányban PBS pufferrel hígítottuk, Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare) oldatra rétegeztük, majd centrifugálást (900 rpm, 30 p, 25 °C) követően összegyűjtöttük a külön réteget képező mononukleáris sejteket. Ezután az izolált sejtfrakciót kétszer jéghideg PBS pufferrel mostuk (centrifugálás körülményei: 1000 rpm, 10 p, 4 °C), majd jéghideg RPMI 1640 tápoldatba vettük fel. A sejtszuspenziók koncentrációját tripánkék festést követően Bürker-kamra segítségével határoztuk meg. A sejtek izolálást követően azonnal felhasználásra kerültek.

PBMC-DM differenciáltatás

Primer makrofágok differenciáltatásához a frissen izolált mononukleáris sejteket 12 mintahelyes lemezekben osztottuk szét (10^7 PBMC/mintahely), majd 1,5 óra inkubációt követően (37 °C, 5 % CO₂ és 100 % relatív páratartalom) az úszó sejteket eltávolítottuk, és a letapadt monocitákat PBS pufferrel mostuk. Ezt követően a monocitákat 7 napig PBMC-DM tápoldatban (ld. **5.2. alfejezet**) tenyésztettük a tápoldat két naponkénti cseréjével.

THP-1 sejtek tenyésztése

A THP-1 sejteket THP-1 tápoldatban (ld. **5.2. alfejezet**) tartottuk fenn, $0,5 - 2 \times 10^6$ sejt/ml koncentrációban, 37 °C-on, 5 % CO₂ és 100 % relatív páratartalom mellett. A sejt kultúrákat a szuszpenzió töménységétől függően 2-3 naponta átoltottuk. A sejtek életképességét tripánkék festéssel rendszeresen ellenőriztük.

THP-1 sejtek differenciáltatása

A THP-1 sejtek differenciáltatásához a sejteket 24 órán keresztül 24 lyukú lemezekben (5×10^5 sejt/mintahely) tenyésztettük 10 nM forbol-mirisztil-acetáttal (PMA, Sigma-Aldrich) kiegészített THP-1 tápoldatban (500 µl/mintahely). A kezelés után a sejtek makrofág-szerű morfológiát mutattak: megnagyobbodtak és letapadtak a tenyésztőedény aljára.

Sejtek életképességének meghatározása tripánkék festéssel

A tripánkék egy olyan ún. vitális festék, amely az elpusztult sejteket sötétkékre festi, az élő sejtek membránján azonban nem képes áthatolni. A sejtek életképességének meghatározásához 50 µl sejtsuszpenzióhoz 50 µl tripánkék festéket adtunk, majd Bürker-kamra segítségével meghatároztuk a színtelen, illetve kékre festődött sejtek számát.

5.5. Kísérleti módszerek

5.5.1. *In vitro* fertőzési modellek

PBMC stimuláció

A mononukleáris sejtek stimulációjához 5×10^6 sejt/ml koncentrációjú PBMC szuszpenziót (RPMI 1640 tápoldatban) osztottunk szét 96 lyukú, U-aljú Greiner Bio-One lemezekre (100 µl/mintahely). A sejtekhez 100-100 µl, 10^5 , 10^6 vagy 10^7 sejt/ml koncentrációjú *Candida* szuszpenziót (RPMI 1640 tápoldatban) vagy steril RPMI 1640 tápoldatot (kontroll) adtunk, majd a lemezeket meghatározott ideig (24 óra, 48 óra, 6 nap vagy 7 nap) inkubáltuk. Az adott kísérletben alkalmazott *Candida*:PBMC fertőzési arányt az ábrákon vagy az ábrák alatt tüntettük fel (ld. Eredmények és értékelés). Különböző inhibitorok alkalmazása során 100 µl PBMC szuszpenzióhoz először 50 µl inhibítort (vagy hordozót) tartalmazó RPMI 1640 tápoldatot adtunk, majd egy óra inkubációt követően 50 µl *Candida* szuszpenziót adtunk a kultúrához. 6 vagy 7 napos inkubáció esetén a tenyésztéshez használt RPMI 1640 tápoldatot 10 % humán szérummal (ún. pooled human serum, amelyet PBMC izolálás során gyűjtöttünk) is kiegészítettük. A lemezeket minden esetben 37 °C-on, 5 % CO₂ és 100% relatív páratartalom mellett inkubáltuk, majd a felülúszókat összegyűjtöttük, majd felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

THP-1 stimuláció

A differenciáltatott THP-1 sejtekről eltávolítottuk a PMA tartalmú tápoldatot, majd 500 µl steril THP-1 tápoldatot (kontroll) vagy 500 µl, meghatározott koncentrációjú (1×10^4 – 1×10^7 sejt/ml, ld. az adott ábraalírást) *Candida* szuszpenziót (THP-1 tápoldatban) adtunk a sejt kultúrákhoz. Inhibitorok alkalmazása esetén először 400 µl inhibítort (illetve hordozót)

tartalmazó tápoldatot, majd egy óra inkubációt követően 100 µl, 2×10^5 vagy $2,5 \times 10^8$ sejt/ml koncentrációjú *Candida* szuszpenziót adtunk a sejtekhez (ld. az adott ábraalírást). A sejt kultúrákat 37 °C-on, 5 % CO₂ és 100% relatív páratartalom mellett 1, 4, 6 vagy 24 óráig inkubáltuk, majd a felülúszókat összegyűjtöttük és felhasználásig -20 °C-on tároltuk. Az intracelluláris pro-IL-1β koncentrációjának meghatározásához a felülúszó eltávolítását követően 500 µl steril THP-1 tápoldatot adtunk a sejtekhez, majd a lemezek kétszeri fagyasztása (-70 °C) és kiolvasztása után a lizátumokat összegyűjtöttük, centrifugáltuk (10000 rpm, 5 p, 25 °C), és a felülúszókat felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

PBMC-DM stimuláció

A differenciáltatott primer makrofágokról eltávolítottuk a tápoldatot, majd 500 µl steril, GM-CSF mentes PBMC-DM tápoldatot (kontroll), vagy 500 µl ugyanezen tápoldatba felvett *Candida* szuszpenziót adtunk a sejt kultúrákhoz. A lemezeket 37 °C-on, 5 % CO₂ és 100% relatív páratartalom mellett inkubáltuk, majd 4 vagy 24 óra elteltével a felülúszókat összegyűjtöttük és felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

5.5.2. Áramlási citometriás vizsgálatok

Candida sejtek fluoreszcens jelölése

A *Candida* sejtek festéséhez 100 µl 10^9 sejt/ml koncentrációjú szuszpenzióhoz 11 µl Na₂CO₃ oldatot (1 M, pH 10 törzsoldatból), majd 2 µl, 1 mg/ml koncentrációjú Alexa Fluor® 488 szukcinimidil észter festéket (Life Technologies) adtunk. 30 perc, szobahőmérsékleten történő inkubáció után a sejteket centrifugálással (3000 rpm, 5 p, 25 °C) összegyűjtöttük, majd négyszer PBS pufferrel mostuk. Ezt követően meghatároztuk a szuszpenziók sejtszámát Bürker kamra segítségével, majd beállítottuk a megfelelő sejtszámot (5×10^6 sejt/ml, THP-1 tápoldatban). A sejtek homogén festődését áramlási citometria segítségével ellenőriztük.

Fagocitózis vizsgálata

A fagocitózis kvantitatív vizsgálatához a THP-1 sejteket 5x-ös mennyiségű, fluoreszcensen jelölt gombával fertőztük (negatív kontrollként a csak THP-1 sejteket tartalmazó minta

szolgált). Az inkubációs idő letelte után a lemezekről eltávolítottuk a tápoldatot, majd a sejteket kétszer PBS pufferrel (500 µl/mintahely) mostuk a nem fagocitált gomba eltávolítása érdekében. Ezután a lemezeken ismét PBS puffert osztottunk szét (500 µl/mintahely), majd biopipetta segítségével szuszpenzióba vittük a sejteket. Centrifugálást (2000 rpm, 5 p, 25 °C) követően a mintákat 300 µl FC pufferbe vettük fel, majd BD FACSCalibur (BD Biosciences) készülék segítségével analizáltuk. Az eredményeket FlowJo v10 szoftver segítségével elemeztük, a fagocitáló populáció nagyságát a zöld fluoreszcenciát mutató sejtek aránya alapján határoztuk meg.

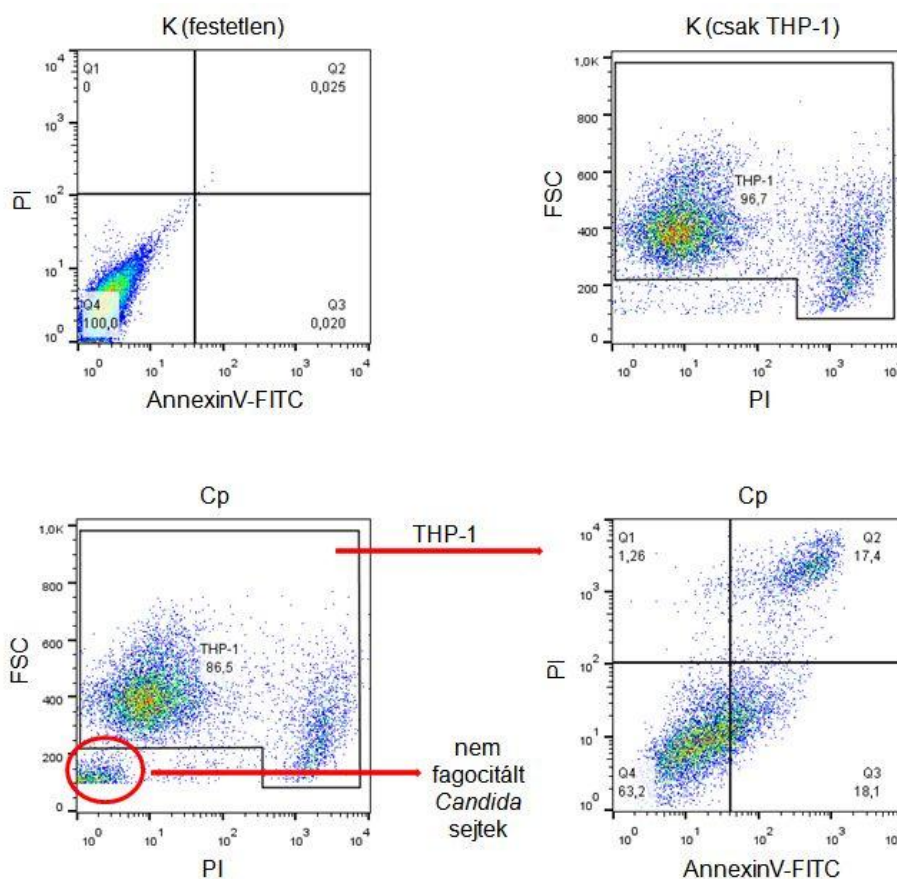
Intracelluláris citokin festés

6 napos PBMC stimulációt követően a sejteket centrifugálással (1400 rpm, 8 p) összegyűjtöttük, majd 50 ng/ml PMA-val, 1 mg/ml ionomycinnel (Sigma-Aldrich) és 0,1 V/V% BD GolgiPlug protein transzport inhibitorral (BD Biosciences) kiegészített RPMI 1640 tápoldatba vettük fel. 4 órás inkubációt követően (37 °C, 5 % CO₂, 100 % relatív páratartalom) a lemezeket 10 percre jégre helyeztük, majd a sejtsuszpenziókat mikrocentrifugacsövekbe mértük át. A sejteket kétszer PBA pufferrel mostuk, majd centrifugálás (1500 rpm, 5 p, 4 °C) után 50 µl PECy7-CD4 antitestet (BD Biosciences) tartalmazó PBA puffert adtunk a mintákhoz. 60 perc (sötétben, 4 °C-on) inkubációt követően a sejteket ismét PBA pufferrel mostuk (centrifugálás 1500 rpm, 5 p, 4 °C), majd 300 µl fixáló-permeabilizáló oldatot (BD Biosciences) mértünk hozzájuk. 60 perc jégen történő inkubációt követően permeabilizáló pufferrel (BD Biosciences) mostuk a sejteket, majd 50 µl FITC-IFN γ és AL647-IL-17 antitesteket tartalmazó permeabilizáló puffert adtunk a mintákhoz. 30 perc (sötétben, 4 °C-on) inkubációt követően a sejteket permeabilizáló pufferrel mostuk (centrifugálás 1500 rpm, 5 p, 4 °C), majd 300 µl PBA pufferbe vettük fel és BD FACSCalibur készülékkel analizáltuk. Az eredményeket CellQuest Pro szoftver segítségével értékeltük ki.

Apoptózis/nekrózis detektálása (Annexin-V-FITC/PI festés)

Az apoptózis és nekrosis áramlási citometriás vizsgálatához Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit-et (Abcam) használtunk. Stimuláció után a 24 lyukú lemezekben tenyésztett THP-1 sejteket PBS pufferrel mostuk, biopipetta segítségével szuszpenzióba vittük, majd

100 µl „Binding Buffer”-t adtunk a mintákhoz. A szuszpenziókból 25 µl-t ($2,5 \times 10^5$ sejtet) tiszta mikrocentrifugacsövekbe vittünk át, majd a mintákhoz 275 µl „Binding Buffer”-t, 3 µl Annexin-V FITC antitestet és 3 µl propidium jodid (PI) oldatot adtunk. 5 perc sötétben, 4 °C-on történő inkubációt követően a mintákat BD FACSCalibur készülék segítségével analizáltuk. Az eredményeket FlowJo v10 szoftver segítségével elemeztük. Mivel ebben az esetben az összes, kis mérettartományba eső adatpont kizárása a nekrotikus sejtek kizárását is jelentené, a THP-1 populációt az FSC/PI paraméterek alapján különítettük el. Így csak a PI negatív sejtörmelék, illetve nem fagocitált *Candida* sejteket zártuk ki az analízisből, a kisméretű, PI⁺ nekrotikus sejteket azonban nem. Ezt követően határoztuk meg az AnnexinV-FITC/PI pozitív sejtek arányát a THP-1 populációban (6. ábra.).



6. ábra. Az apoptózis/nekrózis áramlási citometriás vizsgálata során alkalmazott elemzési stratégia. A felső sorban *Candida* sejteket nem tartalmazó (kontroll) minták, az alsó sorban *C. parapsilosis*-szal stimulált THP-1 makrofágok analízise látható. A magyarázatot ld. a szövegben. K, kontroll; PI, propidium iodide; Cp, *C. parapsilosis*.

5.5.3. Laktát-dehidrogenáz (LDH) aktivitás mérése

A sejtekből felszabadult laktát laktát-dehidrogenáz (LDH) enzim relatív mennyiségét LDH Cytotoxicity Detection Kit (Clontech) segítségével határoztuk meg. A tízszeresére hígított sejtmentes felülszókat (90 µl PBS + 10 µl felülszó) 96 lyukú lemezeken osztottuk szét, majd a gyártó előírásainak megfelelően 100 µl reakcióelegyet adtunk a mintákhoz. Negatív kontrollként steril tápoldat, pozitív kontrollként (100 % LDH felszabadulás) 2 % Triton X-100 detergenssel kezelt sejtek felülszója szolgált. A lemezeket szobahőmérsékleten, fénytől védve 20 percig inkubáltuk, majd SPECTROstar Nano Microplate Reader készülék (BMG Labtech) segítségével meghatároztuk a minták optikai denzitását (OD) 492 nm-en. Az LDH aktivitás relatív mértékét x mintában az alábbi képlet segítségével határoztuk meg: $(OD_x - OD_{\text{negatív kontroll}}) / (OD_{\text{pozitív kontroll}} - OD_{\text{negatív kontroll}}) \times 100$.

5.5.4. Enzimkötött immunoszorbens próba (ELISA)

A szekretált citokinek koncentrációját a sejt kultúrák felülszóiban enzim-kötött immunoszorbens próba (ELISA) segítségével határoztuk meg. A következő kit-eket használtuk: Human IL-1β/IL-1F2 DuoSet (R&D Systems), Human TNFα DuoSet (R&D Systems), Human IL-17 DuoSet (R&D Systems), Human IL-22 DuoSet (R&D Systems), Human IL-6 DuoSet (R&D Systems), PeliPair Human IL-6 ELISA (Sanquin), PeliPair Human IL-10 ELISA (Sanquin), PeliPair Human IFNγ ELISA (Sanquin). A méréseket minden esetben a gyártói utasításoknak megfelelően végeztük. Az elsődleges antitest felvitele után a lemezeket (NUNC MaxiSorp 96 lyukú lemez) 18 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd ELISA mosópufferrel ötször mostuk, és 1 órán át PBA pufferrel blokkoltuk (200 µl/mintahely). Újabb ötszöri mosást követően a felülszókat megfelelő mértékben (legalább háromszorosára) hígítottuk PBA pufferrel, majd 100-100 µl-t mértünk a lemezek mintahelyeibe. A citokin standard-okból 7 lépcsős hígítási sort készítettünk (PBA pufferrel), majd szintén 100-100 µl-t vittünk fel a lemezekre. Negatív kontrollként PBA puffer szolgált. A mintákat a gyártói utasításoknak megfelelően 1 vagy 2 óráig inkubáltuk, majd ötszöri mosást követően felvittük a másodlagos antitestet a lemezekre. 1 vagy 2 óra elteltével a lemezeket ismét ötször mostuk, majd a mintahelyekbe PBA pufferben hígított sztreptavidin-HRP oldatot mértünk. 20 vagy 30 perc inkubációt követően ötször mostuk a lemezeket, majd 100-100 µl frissen elkészített ELISA szubsztrát oldatot mértünk a mintahelyekbe. A megfelelő színintenzitás

elérése után 1,8 M-os kénsavval (100 µl/mintahely) állítottuk le a reakciót, majd meghatároztuk a minták fényelnyelését 450 nm-en, SPECTROstar Nano Microplate Reader készülék (BMG Labtech) segítségével. Az adatokat MARS Data Analysis szoftverrel analizáltuk.

5.5.5. RNS izolálás, cDNS szintézis és qRT-PCR

Totál RNS izolálás

RNS izolálást megelőzően a THP-1 sejtekről eltávolítottuk a tápoldatot, majd azokat kétszer PBS pufferrel mostuk. RNS izoláláshoz Quick-RNA MiniPrep Kit-et (Zymo Research) használtunk, a mellékelt gyártói utasításoknak megfelelően. Az izolált RNS integritását és koncentrációját Agilent 2100 BioAnalyzer készülék (Agilent Technologies) segítségével határoztuk meg. A cDNS-szintézishez használt RNS minták RIN (RNA Integrity Number) értéke minden esetben ≥ 9 volt.

cDNS szintézis

A reverz-transzkripcióhoz a RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit-et (Thermo Scientific) használtuk, a gyártó utasításainak megfelelően. Az RNS mintákat a koncentrációjuktól függően nukleáz mentes vízzel hígítottuk, majd minden reakcióhoz 0,5 µg RNS-t használtunk a cDNS szintézishez. A PCR során alkalmazott reakciókörülmények az alábbiak voltak:

cDNS szintézis 1. lépése: (1) 65 °C, 5 p (2) 4 °C, 5 p

cDNS szintézis 2. lépése: (1) 25 °C, 5 p (2) 42 °C, 60 p (3) 70 °C, 5 p

Kvantitatív valós-idejű PCR (qRT-PCR)

A qRT-PCR során Maxima SYBR Green qPCR Master Mix-et (Thermo Scientific) használtunk a gyártói utasításoknak megfelelően. A qRT-PCR-hez 10x hígított cDNS mintákat és 300 nM koncentrációjú primereket használtunk. Belső kontrollként a glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz (*gapdh*) gén szolgált. A reakció során felhasznált primereket a 3. táblázat tartalmazza.

3. táblázat. Kvantitatív valós-idejű PCR során felhasznált primerek.

Primer	Írány	Szekvencia 5'-3'	Amplifikált szakasz mérete (bp)
<i>gapdh</i>	forward	TGTTTCGTCATGGGTGTGAACC	65
	reverse	GGAGGCATTGCTGATGATCTTG	
<i>il1b</i>	forward	TTCCAGGAGAATGACCTGAG	86
	reverse	TAAGCCTCGTTATCCCATGT	
<i>tlr2</i>	forward	GTGTCGGAATGTCACAGGAC	65
	reverse	AGGATCAGCAGGAACAGAGC	
<i>tlr4</i>	forward	TACCTGGAGTGGGAGGACAG	66
	reverse	CAGGGCTTTTCTGAGTCGTC	
<i>dectin1</i>	forward	GCCCACATGATTTGACTCAG	67
	reverse	TTTTCTTTCTGCTCCTGAGATG	
<i>dectin2</i>	forward	CCAGCTTCTTGAAGTCATTTG	65
	reverse	GACCAAACCTTCTCTTCACTGG	

A méréseket CFX96™ Real-Time System detektorral felszerelt C1000™ Thermal Cycler készülék (BIO-RAD) segítségével végeztük az alábbi program szerint:

1. elődenaturáció: 95 °C, 3 p
2. denaturáció: 95 °C, 10 mp
3. annealing-elongáció: 60 °C, 30 mp
4. melting analízis: 65 °C-ról 95 °C-ra, 0,5 °C / 5 mp

A program a 2-3. lépéseket 40-szer ismételte.

A eredményeket a $\Delta\Delta C_t$ módszer (Livak és Schmittgen, 2001) segítségével analizáltuk.

5.5.6. Lizoszóma-károsodás meghatározása katepszin B aktivitás-mérés alapján

A lizoszóma-károsodás mértékét Cathepsin B Activity Assay Kit (Abcam) segítségével határoztuk meg. Stimulációt követően (4 óra, 1:1 *Candida*:THP-1 arány) a THP-1 sejtekről eltávolítottuk a tápoldatot, majd kétszer PBS pufferrel mostuk a sejteket. Ezután szuszpenzióba vittük a makrofágokat, majd tripánkék festés segítségével meghatároztuk a mintákban az élő sejtek számát. A sejszám normalizálása után (minden mintába azonos számú sejtet mértünk) lízis puffert adtunk a mintákhoz, a gyártói utasításoknak

megfelelően. 10 perc 4 °C-on történő inkubációt követően a mintákat centrifugáltuk (13000 rpm, 5 p, 25 °C), majd a felülúszókból 50-50 µl-t fektetünk, 96 lyukú sejtenyésző lemez mintahelyeibe mértünk. Ezután 50 µl, CB reakciópufferben hígított CB Ac-RR-AFC szubsztrátot adtunk a mintákhoz, majd a lemezt 2 órán keresztül 37 °C-on fénytől védve inkubáltuk. A katepszin B aktivitása következtében felszabaduló AFC (amino-4-trifluoromethyl coumarin) fluoreszcenciáját FLUOstar OPTIMA Microplate Reader készülék (BMG Labtech) segítségével határoztuk meg (gerjesztési hullámhossz: 400 nm, emissziós hullámhossz: 505 nm).

5.5.7. Reaktív oxigéngyök (ROS) termelés mérése

A reaktív oxigéngyök-termelés méréséhez a DCFDA (2',7' –dichlorofluorescein diacetate) - Cellular Reactive Oxygen Species Detection Assay Kit-et (Abcam) használtuk. A mérés előtt a THP-1 sejteket fektetünk, 96 lyukú sejtenyésző lemezekben (10^5 sejt/mintahely) differenciáltattuk (24 óra, 10 nM PMA-val történő kezelés). Másnap a sejteket PBS pufferrel mostuk, 25 µM DCFDA szubsztrátot adtunk a mintákhoz (100 µl/mintahely) és 37 °C-on 45 percig inkubáltuk a lemezeket. Ezt követően ismét PBS pufferrel mostuk a sejteket, majd 100-100 µl steril PBS puffert (negatív kontroll) vagy *Candida* szuszpenziót (PBS pufferbe szuszpendált) adtunk a mintákhoz. Ezután FLUOstar OPTIMA Microplate Reader készülék segítségével 4 órán át 20 percenként mértük a minták fluoreszcenciáját (gerjesztési hullámhossz: 485 nm, emissziós hullámhossz: 520 nm).

5.6. Statisztikai analízis

A statisztikai számításokat a GraphPad PRISM 5 szoftverrel végeztük. A statisztikai szignifikanciát páros t-próba vagy Wilcoxon próba segítségével állapítottuk meg (ld. az adott ábraalírást). Statisztikailag akkor tekintettük szignifikánsnak a különbséget, ha $p < 0,05$ volt.

6. Eredmények és értékelésük

6.1. Humán perifériás vérből izolált mononukleáris sejtek *C. parapsilosis* és *C. albicans* fertőzésre adott válaszreakciójának összehasonlítása

6.1.1. A *C. parapsilosis* és a *C. albicans* által indukált T helper sejt polarizáció összehasonlítása

6.1.1.1. PBMC stimuláció mint *in vitro* modell

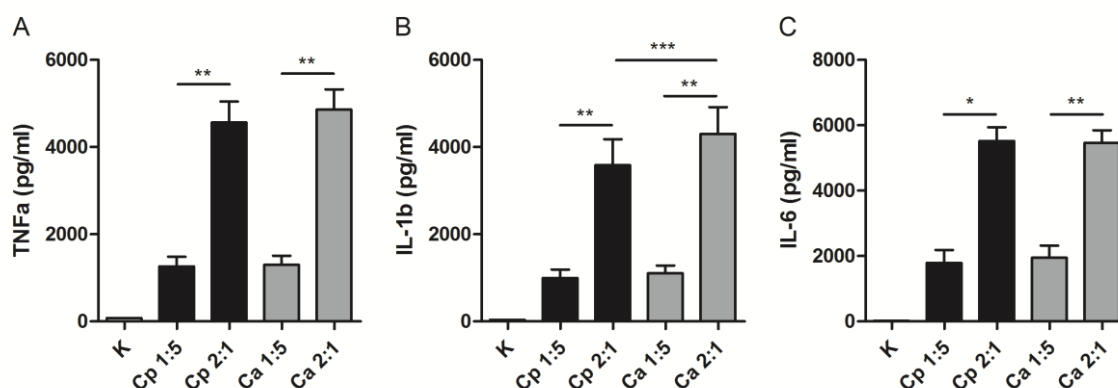
Kísérleteink során *C. parapsilosis* típus törzsként a laboratóriumunkban gyakran használt GA1 jelű klinikai izolátumot választottuk. Ez a törzs már több tanulmány alapjául szolgált (Gacser és mtsi., 2007b; Nemeth és mtsi., 2014; Toth és mtsi., 2014a); elérhető a teljes genomszekvenciája (Pryszcz és mtsi., 2013) és genetikai manipulációjához kidolgozott transzformációs rendszer áll rendelkezésünkre (Gacser és mtsi., 2007b). *C. albicans* típus törzsként az SC5314 jelű törzset használtuk, amely az egyik leggyakrabban alkalmazott laboratóriumi törzs (Gillum és mtsi., 1984).

Kísérleteink során először megvizsgáltuk a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* által indukált citokin termelést perifériás vérből izolált mononukleáris sejtekben. Ez a kevert sejtpopuláció túlnyomórészt limfocitákat (kb. 80-85 %) és monocitákat (kb. 10-15 %), valamint alacsony számban dendritikus sejteket tartalmaz (Fradin és mtsi., 2005). A PBMC frakciót gyakran használják immunológiai tanulmányokban különböző patogének által indukált citokin termelés, illetve a T-sejtes immunválasz vizsgálatára (Netea és mtsi., 2006; Eyerich és mtsi., 2008; van de Veerdonk és mtsi., 2009; Smeekens és mtsi., 2010). Annak érdekében, hogy a *C. parapsilosis* és a *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* ugyanis RPMI tápoldatban intenzíven hifázik és több napos inkubáció során erőteljes 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), valamint a *Candida*:PBMC fertőzési arányokat szakirodalmi adatok alapján

állapítottuk meg (van der Graaf és mtsi., 2005; Netea és mtsi., 2006; van de Veerdonk és mtsi., 2009; Smeekens és mtsi., 2010).

6.1.1.2. Gyulladásos citokinek indukciója mononukleáris sejtekben *C. parapsilosis* és *C. albicans* fertőzés hatására

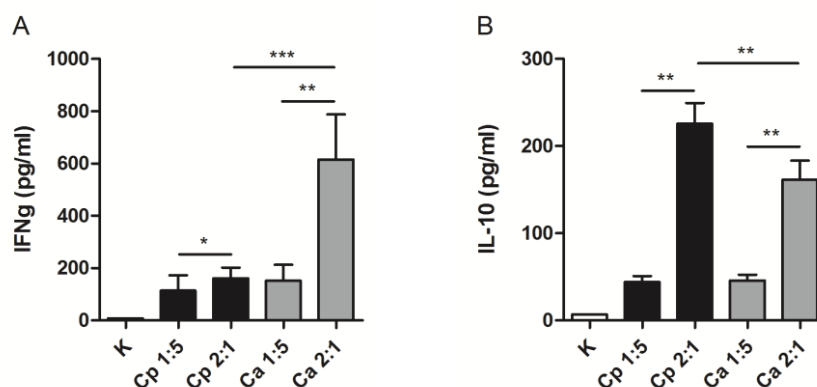
A gyulladásos citokinek indukciójának vizsgálatához a frissen izolált mononukleáris sejteket hővel előlt *C. parapsilosis*-szal és *C. albicans*-szal stimuláltuk 1:5 vagy 2:1 *Candida*:PBMC arányban, majd 24 óra elteltével a felülúszókat összegyűjtöttük és meghatároztuk a szekretált TNF α , IL-1 β és 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 (7. 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 (7B ábra.).



7. ábra. Gyulladásos citokinek indukciója mononukleáris sejtekben *C. parapsilosis* és *C. albicans* fertőzés hatására. PBMC (5×10^5) stimulációt (hővel előlt *C. parapsilosis* vagy *C. albicans*) követően 24 órával a szekretált TNF α (A), IL-1 β (B) és IL-6 (C) koncentrációját a sejt kultúrák felülúszóiban ELISA segítségével határoztuk meg. Az 1:5 és 2:1 számok a *Candida*:PBMC arányt mutatják. Feltüntetett adatok: átlag \pm standard hiba. K, kontroll (nem stimulált sejtek); Cp, *C. parapsilosis*; Ca, *C. albicans*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (Wilcoxon próba); $n = 14$.

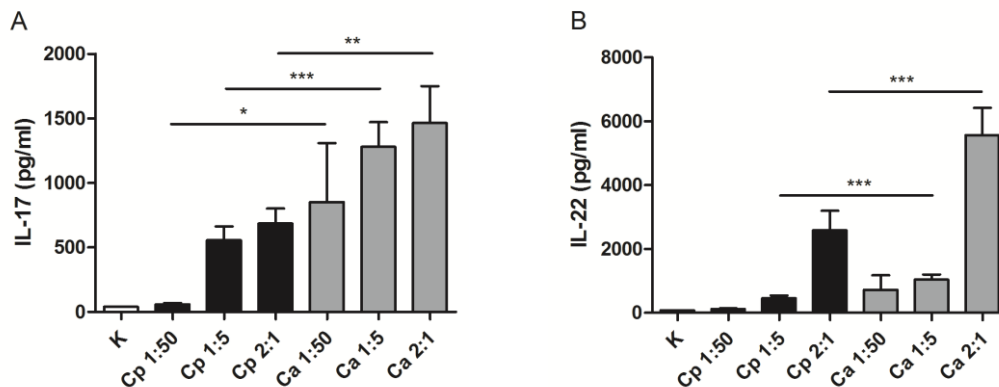
6.1.1.3. IFN γ , IL-10, IL-17 és IL-22 citokinek indukciója mononukleáris sejtekben *C. parapsilosis* és *C. albicans* fertőzés hatására

A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a *C. parapsilosis* és a *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* (8. ábra). Mivel az IFN γ termelés elsősorban a Th1-típusú válasszal hozható kapcsolatba, míg az IL-10 főként a Th2 és Treg sejtek terméke (Wang és mtsi., 2005; Romani, 2011), ezek az eredmények arra utalnak, hogy a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* fertőzés esetén eltérően szabályozott a Th polarizáció.



8. ábra. IFN γ és IL-10 indukciója mononukleáris sejtekben *C. parapsilosis* és *C. albicans* fertőzés hatására. PBMC (5×10^5) stimulációt (hővel elölt *C. parapsilosis* vagy *C. albicans*) követően 48 órával a szekretált IFN γ (A) és IL-10 (B) koncentrációját a sejtkultúrák felülúszóiban ELISA segítségével határoztuk meg. Az 1:5 és 2:1 számok a *Candida*:PBMC arányt mutatják. Feltüntetett adatok: átlag \pm standard hiba. K, kontroll (nem stimulált sejtek); Cp, *C. parapsilosis*; Ca, *C. albicans*. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 (Wilcoxon próba); n=14.

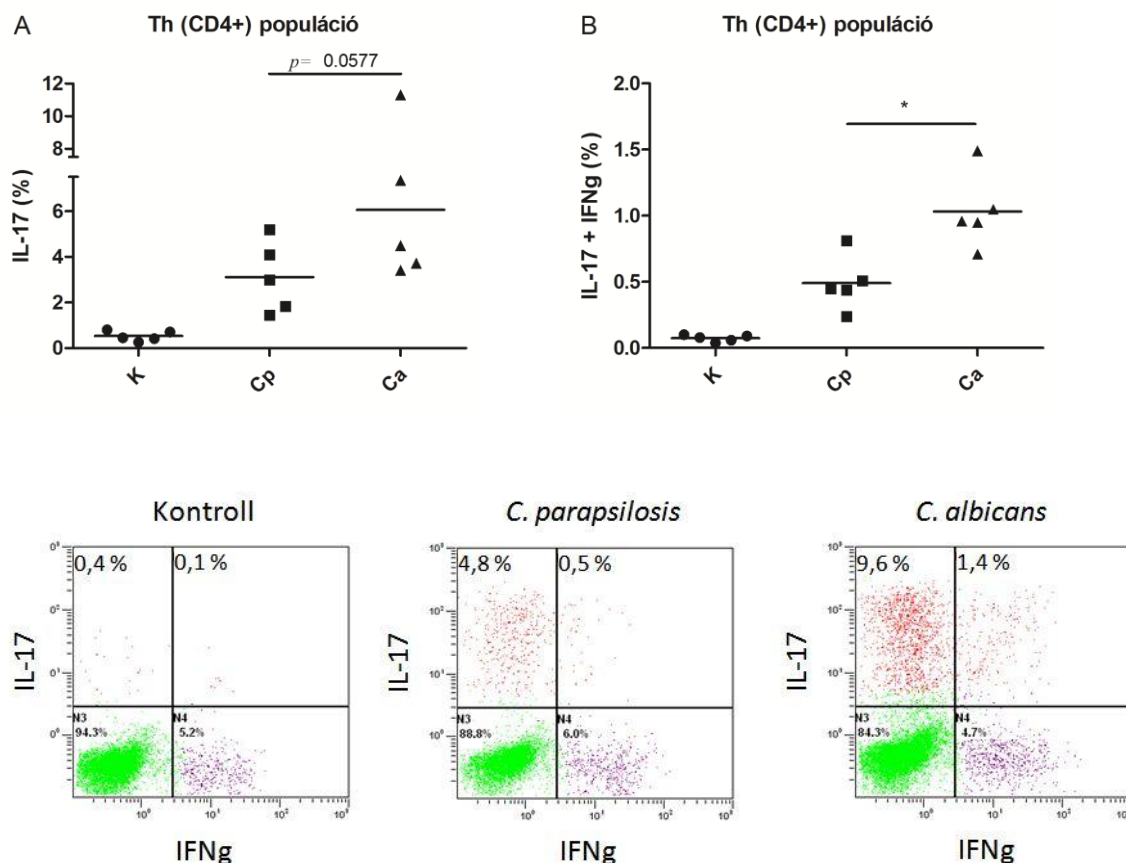
A Th17 sejtes citokinek vizsgálatához a mononukleáris sejteket 7 napig stimuláltuk hővel elölt *C. parapsilosis*-szal és *C. albicans*-szal. Azt tapasztaltuk, hogy míg mindkét faj dózisfüggő módon indukálta az IL-17 és IL-22 termelést, a *C. parapsilosis*-szal stimulált mononukleáris sejtek szignifikánsan kevesebb IL-17-et és IL-22-t szekretáltak a *C. albicans*-szal fertőzött sejtekhez képest (9. ábra).



9. ábra. IL-17 és IL-22 indukciója mononukleáris sejtekben *C. parapsilosis* és *C. albicans* fertőzés hatására. PBMC (5×10^5) stimulációt (hővel elölt *C. parapsilosis* vagy *C. albicans*) követően 7 nappal a szekretált IL-17 (A) és IL-22 (B) koncentrációját a sejt kultúrák felülúszóiban ELISA segítségével határoztuk meg. Az 1:5 és 2:1 számok a *Candida*:PBMC arányt mutatják. Feltüntetett adatok: átlag \pm standard hiba. K, kontroll (nem stimulált sejtek); Cp, *C. parapsilosis*; Ca, *C. albicans*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (Wilcoxon próba); 1:5 és 2:1 arány, $n=14$; 1:50 arány, $n=6$.

6.1.1.4. Th polarizáció vizsgálata áramlási citometriával intracelluláris citokin festést követően

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 elölt *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 (10. ábra).



10. ábra. Th17 polarizáció vizsgálata *C. parapsilosis*-szal és *C. albicans*-szal stimulált mononukleáris sejtekben. PBMC (5×10^5) stimulációt (hővel előlt *C. parapsilosis* vagy *C. albicans*) követően 6 nappal az IL-17⁺ (A) és IL-17⁺IFN γ ⁺ kettős pozitív (B) sejtek számát a CD4⁺ populációban áramlási citometria segítségével határoztuk meg intracelluláris citokin jelölést követően. K, kontroll (nem stimulált sejtek); Cp, *C. parapsilosis*; Ca, *C. albicans*. * $p < 0,05$ (páros t-próba); fertőzési arány 1:5 *Candida*:PBMC; $n=5$. Az alsó sorban az áramlási citometriás analízis reprezentatív diagramjai láthatók egy donor esetén.

6.1.1.5. A *C. parapsilosis* és a *C. albicans* által indukált T helper sejt polarizáció összehasonlítása – összefoglalás/értékelés

A monociták, makrofágok és dendritikus sejtek mintázatfelismerő receptorainak aktivációja a patogének felismerését követően gyors citokin szintézist és szekréciót indukál (Netea és mtsi., 2008). Kísérleteink során először összehasonlítottuk a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* által indukált gyulladásos 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 (Smeekens és mtsi., 2010). 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 előlt *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 a *C. albicans* elleni immunválasz alapvető hasonlóságairól és különbségeiről.

A Th sejt immunválasznak kritikus szerepe van a gombafertőzések 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) (Luckheeram és mtsi., 2012). Számos tanulmányban kimutatták, hogy a *C. albicans* immunkompetens egyénekben Th1/Th17 irányú Th-polarizációt indukál (van de Veerdonk és Netea, 2010) és candidiasis esetén a Th17 sejtek vagy az általuk termelt citokinek hiánya negatívan befolyásolja a fertőzés kimenetelét (Hernandez-Santos és Gaffen, 2012). 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 (Romani, 2011). 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 gyulladáskeltő funkcióit (De Luca és mtsi., 2007). A klinikumban a magas IL-10 szintet általában kockázati tényezőnek tekintik a gombafertőzésekre való fogékonyság szempontjából, ugyanis gyakran figyelhető meg emelkedett IL-10 szint krónikus candidiasis-ban vagy aspergillosis-ban szenvedő betegeknél (Romani és Puccetti, 2006). 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 (Eyerich

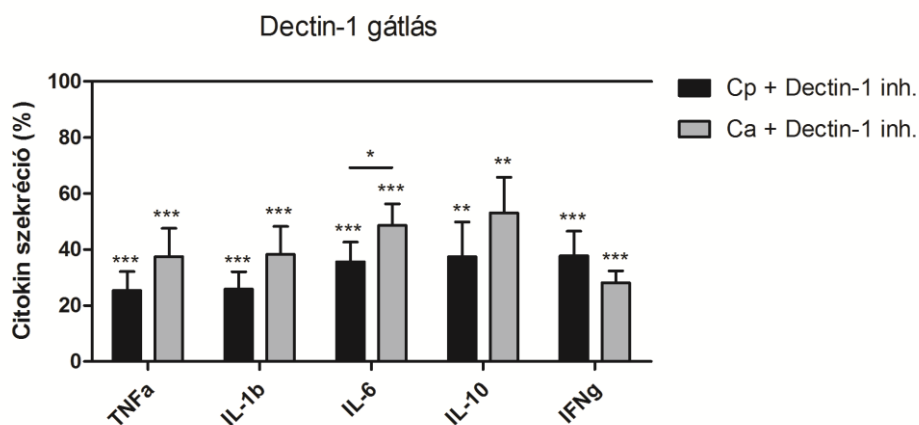
és mtsi., 2008; van de Veerdonk és mtsi., 2009)), a *C. parapsilosis*-szal stimulált sejtek jelentősen alacsonyabb IL-17 és IL-22 termelést mutattak. Intracelluláris citokin festés segítségével azt is kimutattuk, hogy a *C. parapsilosis*-szal stimulált PBMC kultúrákban alacsonyabb volt az IL-17, illetve 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 fertőzésekre. Az újszülöttek különösen fogékonyak *C. parapsilosis* fertőzésre (Pammi és mtsi., 2013), 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 (Chirico és mtsi., 1985; Chirico és mtsi., 1990), ami főleg az IFN γ hiányának tulajdonítható. Ennek hátterében a Th1 polarizáció defektje áll, az újszülöttek immunrendszerére ugyanis Th2/Th17 dominancia jellemző (Black és mtsi., 2012). 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 feltételezéssel 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 (Linden és mtsi., 2013b). 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 (Gamaletsou és mtsi., 2014). 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 (Destin és mtsi., 2009). Az említett tanulmányban nem vizsgálták azonban a neutrofilek *Candida* fajokkal szembeni ölési képességét, amelyhez a reaktív oxigéngyökök termelésén kívül egyéb mechanizmusok is hozzájárulhatnak (Cheng és

mtsi., 2012). A jövőben mindenképpen további vizsgálatok lesznek szükségesek a neutrofil granulociták különböző *Candida* fajokkal szembeni védekezésben betöltött pontos szerepének tisztázásához. Fontos megjegyezni, hogy kísérleti rendszerünknek több hiányossága is van. Egyrészt, amint az fentebb már említésre került, hővel előlt *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 (Sathaliyawala és mtsi., 2013). Kimutatták, hogy IL-17 és IL-22 termelő, *C. albicans*-specifikus memóriasejtek egészséges egyének vérében is jelen vannak (Acosta-Rodriguez és mtsi., 2007; Liu és mtsi., 2009). 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 (van de Veerdonk és mtsi., 2009). 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 (Eyerich és mtsi., 2008). 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 nagyszámú (n=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 mutatnak az egészséges donorokból származó sejtekhez képest, annak ellenére, hogy a betegekben a *Candida* antigének folyamatosan és nagy koncentrációban jelen vannak a szervezetben (Eyerich és mtsi., 2008). 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 (Wuthrich és mtsi., 2011) lesz megvalósítható, bár egyelőre nem állnak rendelkezésünkre *C. parapsilosis*-specifikus antigének és ebből adódóan erre a fajra specifikus TCR-al rendelkező transzgenikus egér modellek sem.

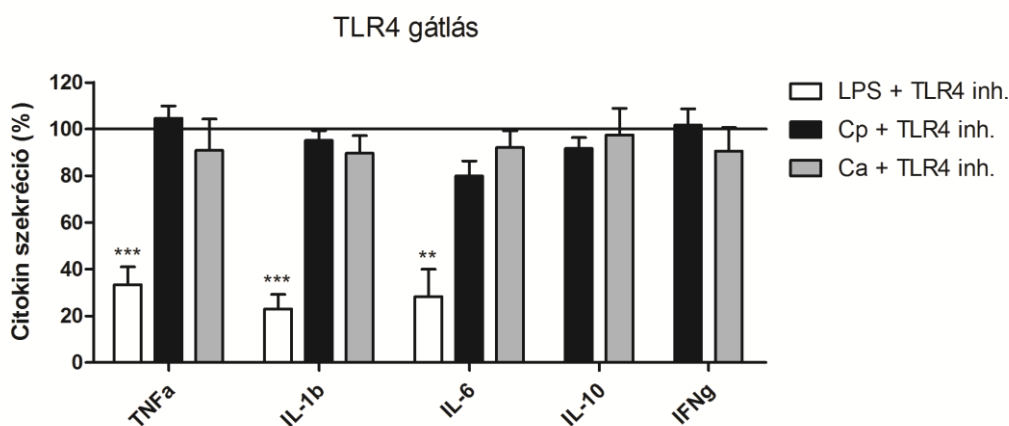
6.1.2. A *C. parapsilosis* immunológiai felismerésében szerepet játszó receptorok azonosítása

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 (11. 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 (ez a különbség csak az IL-6 esetén volt szignifikáns).



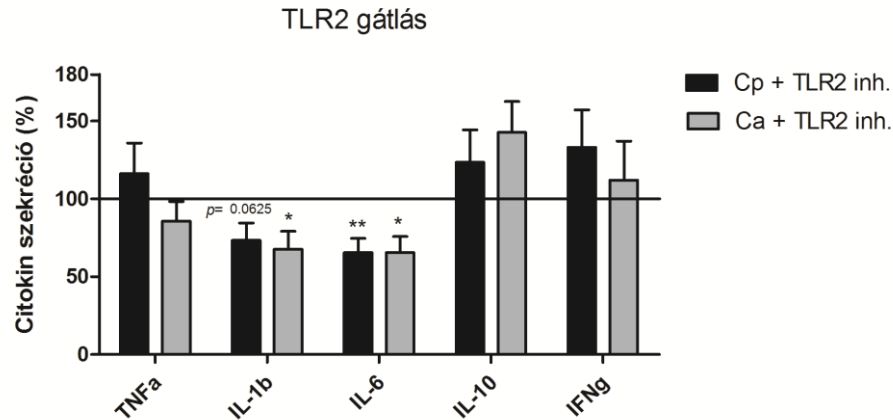
11. ábra. A Dectin-1 szerepe a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* által indukált citokin termelésben. Az ábrán hővel előlt *C. parapsilosis*-szal vagy *C. albicans*-szal stimulált mononukleáris sejtek (5×10^5 PBMC) citokin termelése látható Dectin-1 inhibitor (laminarin) jelenlétében. 24 (TNF α , IL-1 β , IL-6) vagy 48 óra (IL-10, IFN γ) elteltével a citokinek koncentrációját a sejt kultúrák felülúszóiban ELISA segítségével határoztuk meg. A grafikonon az inhibitorok jelenlétében és a kontroll (inhibitor nélküli) mintákban mért citokin koncentrációk százalékos arányát (átlag \pm standard hiba) tüntettük fel. Fertőzési arány 2:1 *Candida*:PBMC. Cp, *C. parapsilosis*; Ca, *C. albicans*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (páros t-próba); $n \geq 6$.

A TLR4 blokkolását *Bartonella quintana* LPS-sel végeztük, amely a receptor természetes antagonistája (Popa és mtsi., 2007). 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 a *C. albicans* által indukált citokin termelésre (12. ábra).



12. ábra. TLR4 szerepe a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* által indukált citokin termelésben. Az ábrán hővel előlt *C. parapsilosis*-szal vagy *C. albicans*-szal stimulált mononukleáris sejtek (5×10^5 PBMC) citokin termelése látható TLR4 inhibitor (*B. quintana* LPS) jelenlétében. 24 (TNF α , IL-1 β , IL-6) vagy 48 óra (IL-10, IFN γ) elteltével a citokinek koncentrációját a sejtkultúrák felülúszóiban ELISA segítségével határoztuk meg. A grafikonon az inhibitorok jelenlétében és a kontroll (inhibitor nélküli) mintákban mért citokin koncentrációk százalékos arányát (átlag \pm standard hiba) tüntettük fel. Fertőzési arány 2:1 *Candida*:PBMC. LPS, *E. coli* LPS; Cp, *C. parapsilosis*; Ca, *C. albicans*. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (páros t-próba); $n \geq 6$.

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 a *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 (13. ábra).

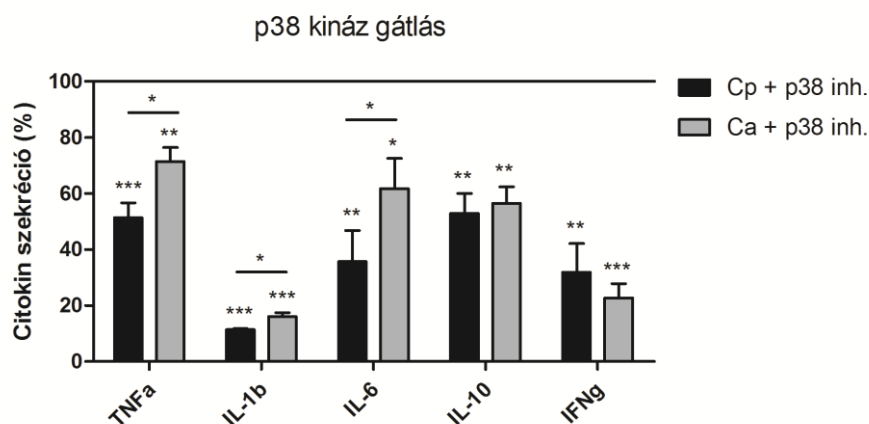


13. ábra. TLR2 szerepe a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* által indukált citokin termelésben. Az ábrán hővel előlt *C. parapsilosis*-szal vagy *C. albicans*-szal stimulált mononukleáris sejtek (5×10^5 PBMC) citokin termelése látható TLR2 inhibitor (blokkoló antitest) jelenlétében. 24 (TNF α , IL-1 β , IL-6) vagy 48 óra (IL-10, IFN γ) elteltével a citokinek koncentrációját a sejt kultúrák felülúszóiban ELISA segítségével határoztuk meg. A grafikonon az inhibitorok jelenlétében és a kontroll (izotípus kontrollt tartalmazó) mintákban mért citokin koncentrációk százalékos arányát (átlag \pm standard hiba) tüntettük fel. Fertőzési arány 2:1 *Candida*:PBMC. Cp, *C. parapsilosis*; Ca, *C. albicans*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (páros t-próba); $n \geq 6$.

6.1.3. 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 (Hess és mtsi., 2004). Ismert, hogy mind a TLR-ek, mind a Syk-asszociált CLR-ek képesek aktiválni a p38, ERK és JNK klasszikus MAP kinázokat (Kawai és Akira, 2006; Xu és mtsi., 2009); 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 TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-10 és IFN γ termelését (14-16. ábra). A csökkenés mértéke azonban különböző volt az egyes citokinek

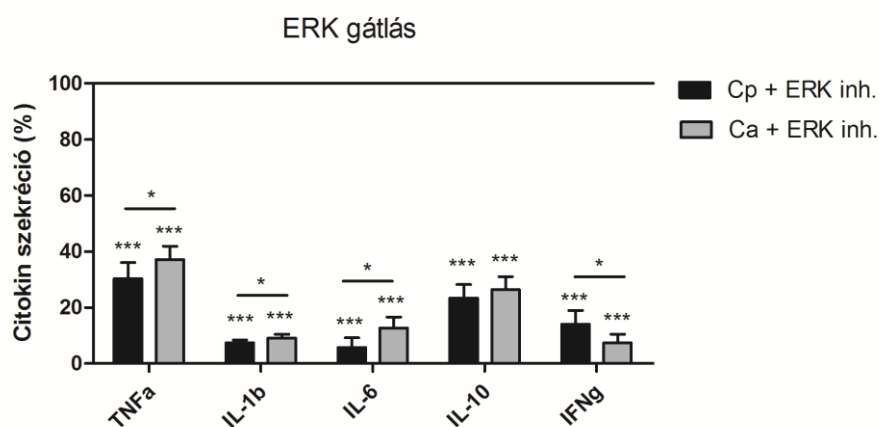
esetén. A p38 kináz gátlása legnagyobb mértékben az IL-1 β szintjét csökkentette, mind *C. parapsilosis*-szal, mind *C. albicans*-szal stimulált mononukleáris sejtekben (14. ábra). Ugyanakkor a p38 kináz gátlása szignifikánsan nagyobb mértékben csökkentette a *C. parapsilosis*, mint a *C. albicans* által indukált TNF α , IL-1 β és IL-6 szekréciót.



14. ábra. p38 kináz szerepe a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* által indukált citokin termelésben. Az ábrán hővel elölt *C. parapsilosis*-szal vagy *C. albicans*-szal stimulált mononukleáris sejtek (5×10^5 PBMC) citokin termelése látható p38 kináz inhibitor jelenlétében. 24 (TNF α , IL-1 β , IL-6) vagy 48 óra (IL-10, IFN γ) elteltével a citokinek koncentrációját a sejt kultúrák felülúszóiban ELISA segítségével határoztuk meg. A grafikonon az inhibitorok jelenlétében és a kontroll (inhibitor nélküli) mintákban mért citokin koncentrációk százalékos arányát (átlag \pm standard hiba) tüntettük fel. Fertőzési arány 1:5 *Candida*:PBMC. Cp, *C. parapsilosis*; Ca, *C. albicans*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (páros t-próba); $n \geq 5$.

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 (15. 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 TNF α , IL-1 β és IL-6 szekréciót, a JNK inhibíció a *C. albicans* által indukált TNF α , IL-1 β és IFN γ termelésre volt nagyobb hatással (16. 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 indukciójához vezetnek; másrészt, az egyes MAP kinázok citokin indukcióban betöltött szerepe különbözik *C. parapsilosis* és *C. albicans* stimuláció esetén.

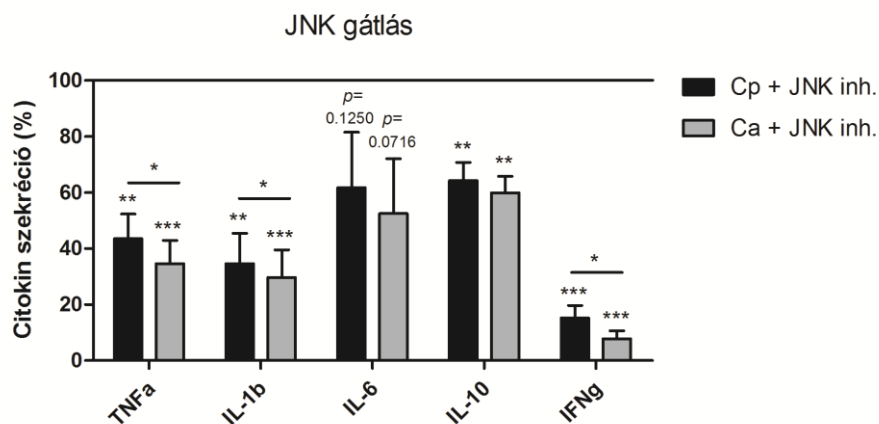


15. ábra. ERK kináz szerepe a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* által indukált citokin termelésben. Az ábrán hővel elölt *C. parapsilosis*-szal vagy *C. albicans*-szal stimulált mononukleáris sejtek (5×10^5 PBMC) citokin termelése látható ERK inhibitor jelenlétében. 24 (TNFα, IL-1β, IL-6) vagy 48 óra (IL-10, IFNγ) elteltével a citokinek koncentrációját a sejt kultúrák felülúszóiban ELISA segítségével határoztuk meg. A grafikonon az inhibitorok jelenlétében és a kontroll (inhibitor nélküli) mintákban mért citokin koncentrációk százalékos arányát (átlag ± standard hiba) tüntettük fel. Fertőzési arány 1:5 *Candida*:PBMC. Cp, *C. parapsilosis*; Ca, *C. albicans*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (páros t-próba); $n \geq 5$.

6.1.4. A *C. parapsilosis* immunológiai felismerésében szerepet játszó receptorok azonosítása és az intracelluláris jelátvitel vizsgálata – összefoglalás/értékelés

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 (Brown, 2011), 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 (Netea és mtsi., 2006), bizonyították, hogy ez a receptor nem minden *C. albicans* törzs felismerésében játszik szerepet (Netea és mtsi., 2010a). Továbbá, hőkezelés hatására megváltozik a *Candida* sejtek sejtfalszerkezete, és a belső réteget alkotó β-glükán jobban

hozzáférhetővé válik (Gantner és mtsi., 2005). Ezt az is bizonyítja, hogy a laminarin sokkal jobban gátolja a hővel elölt, mint az élő *C. albicans* sejtek által indukált citokin termelést (Netea és mtsi., 2006).



16. ábra. JNK kináz szerepe a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* által indukált citokin termelésben. Az ábrán hővel elölt *C. parapsilosis*-szal vagy *C. albicans*-szal stimulált mononukleáris sejtek (5×10^5 PBMC) citokin termelése látható JNK inhibitor jelenlétében. 24 (TNFα, IL-1β, IL-6) vagy 48 óra (IL-10, IFNγ) elteltével a citokinek koncentrációját a sejt kultúrák felülúszóiban ELISA segítségével határoztuk meg. A grafikonon az inhibitorok jelenlétében és a kontroll (inhibitor nélküli) mintákban mért citokin koncentrációk százalékos arányát (átlag ± standard hiba) tüntettük fel. Fertőzési arány 1:5 *Candida*:PBMC. Cp, *C. parapsilosis*; Ca, *C. albicans*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (páros t-próba); $n \geq 5$.

A TLR2 szintén szerepet játszik a *C. albicans* elleni immunválaszban (Netea és mtsi., 2008) és ismert az is, hogy ez a receptor együttműködik a Dectin-1-gyel a zimosán (*S. cerevisiae* β-1,3-glükán) által indukált citokin termelésben (Brown és mtsi., 2003; Gantner és mtsi., 2003). 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 (Netea és mtsi., 2008). Továbbá, a *tlr2*^{-/-} egerek rezisztensebbek az invazív *C. albicans* fertőzéssel szemben (Netea és mtsi., 2004). Ennek ellenére mi azt tapasztaltuk, hogy bár a TLR2 blokkolása kis mértékben csökkentette a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* által indukált IL-1β 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 elölt sejtek esetén a β-glükán a sejtfalban könnyen hozzáférhetővé válik. Gyulladásos citokineken kívül a Dectin-1 receptor az IL-10 termelését is indukálja (Netea és mtsi., 2008) és ezzel összhangban a Dectin-1 receptor gátlása esetén csökkent

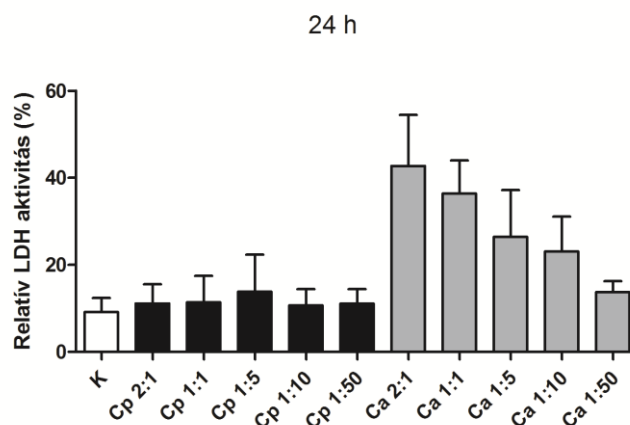
IL-10 szintet tapasztaltunk. A Dectin-1, TLR4 és TLR2 blokkolása során sem tapasztaltunk azonban különbséget a *C. parapsilosis*-szal stimulált mononukleáris sejtek citokin termelésében és *C. albicans*-szal stimulált sejtek citokin szekréciójához képest, ami arra utal, hogy a két faj által indukált 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.

6.2. *C. parapsilosis* és *C. albicans* által indukált inflammaszóma aktiváció összehasonlítása

6.2.1. Gyulladásos citokinek indukciója mononukleáris sejtekben élő *C. parapsilosis* és *C. albicans* stimuláció hatására

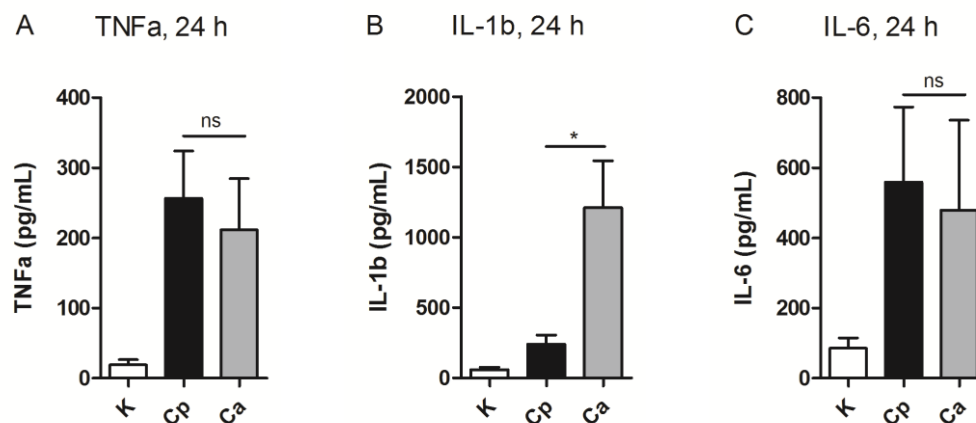
A szakirodalomban elfogadott megközelítési mód a hővel elölt *Candida* sejtek alkalmazása a gazda immunválaszának tanulmányozása során (van de Veerdonk és mtsi., 2009). Ugyan a hőkezelt sejtek alkalmazása során kétségtelenül és bizonyítottan számos hasznos információhoz juthatunk, a hőkezelés során a gomba sejtfalában irreverzibilis változások következnek be, amelyek alapvetően befolyásolhatják a gazda immunválaszt (Netea és mtsi., 2006). Ezen okok miatt a továbbiakban megvizsgáltuk, hogy az élő *Candida* sejtek hogyan indukálják a gyulladásos citokinek termelését mononukleáris sejtekben. Először ellenőriztük, hogy milyen fertőzési aránynál elfogadható az élő sejtek által okozott sejtkárosodás mértéke. Ehhez a mononukleáris sejteket különböző számú élő *C. parapsilosis* és *C. albicans* sejtrel fertőztük, majd 24 óra elteltével megmértük a mintákban az LDH (laktát dehidrogenáz) aktivitását (17. ábra).



17. ábra. *C. parapsilosis* és *C. albicans* által okozott sejtkárosodás mononukleáris sejtekben. PBMC (5×10^5) stimulációt követően 24 órával a sejtkárosodás mértékét a felülúszóban mérhető LDH aktivitás alapján határoztuk meg. A grafikonon az LDH aktivitást a pozitív kontrollhoz (100 % sejt lízis) képest %-ban (átlag \pm standard hiba) tüntettük fel. A számok a *Candida*:PBMC arányt jelölik. K, kontroll (nem stimulált sejtek); Cp, *C. parapsilosis*; Ca, *C. albicans*; n=3.

Mivel membrán károsodás következtében az LDH felszabadul a gazdasejtekből, a felülúszóban mérhető LDH aktivitás egyenesen arányos a patogén által indukált gazdasejtkárosodással. Azt tapasztaltuk, hogy míg a *C. parapsilosis* a legnagyobb alkalmazott sejtszám (2:1 arány) esetén sem indukált jelentős LDH felszabadulást, a *C. albicans* ebben a koncentrációban jelentős sejtkárosodást okozott. *C. albicans* esetén az 1:50 *Candida*:PBMC arány esetén mértünk a kontroll mintákhoz hasonlóan alacsony LDH szintet, ezért a későbbiekben a citokin indukció vizsgálatához ezt a fertőzési arányt választottuk mind a két *Candida* faj esetében.

A gyulladásos citokinek vizsgálata esetén azt tapasztaltuk, hogy míg a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* hasonló mértékben indukálta a TNF α és IL-6 termelést, a szekretált IL-1 β szintje *C. parapsilosis* stimuláció esetén szignifikánsan alacsonyabb volt (18. ábra).



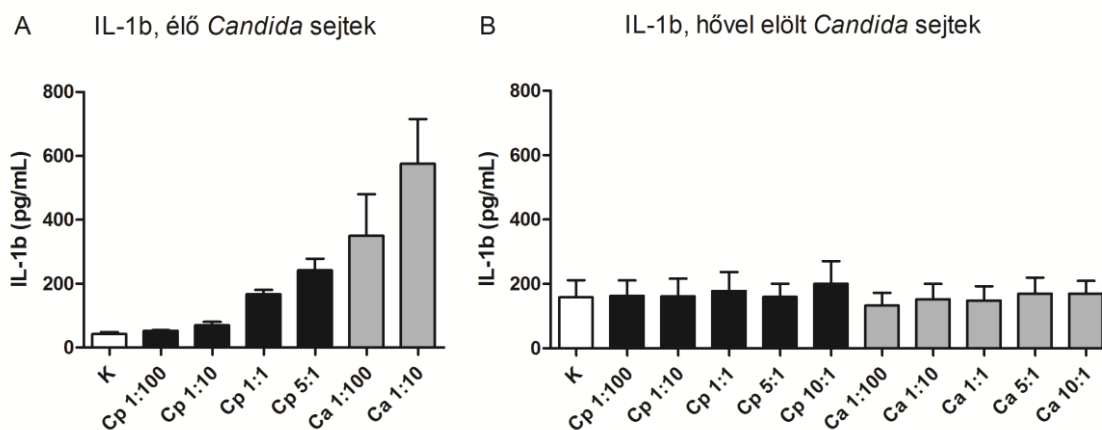
18. ábra. Gyulladásos citokinek indukciója mononukleáris sejtekben élő *C. parapsilosis* és *C. albicans* fertőzés hatására. PBMC (5×10^5) stimulációt (élő *C. parapsilosis* vagy *C. albicans*) követően 24 órával a szekretált TNF α (A), IL-1 β (B) és IL-6 (C) koncentrációját a sejtkultúrák felülúszóiban ELISA segítségével határoztuk meg. Fertőzési arány 1:50 *Candida*:PBMC. Feltüntetett adatok: átlag \pm standard hiba. K, kontroll (nem stimulált sejtek); Cp, *C. parapsilosis*; Ca, *C. albicans*; ns, nem szignifikáns. * $p < 0,05$ (páros t-próba); $n=8$.

Az IL-1 β -t a vérben legnagyobb részben monociták, a szövetek között pedig makrofágok és dendritikus sejtek termelik (Netea és mtsi., 2014). Amint az korábban említésre került, a citokin inaktív formában termelődik és a kaszpáz-1 általi hasítása szükséges az érett forma kialakításához. Kimutatták továbbá, hogy míg monocitákban a kaszpáz-1 folyamatosan aktív, így a PRR-ek stimulációja közvetlenül IL-1 β szekrécióhoz vezet, makrofágokban és

dendritikus sejtekben két szignál szükséges az IL-1 β termelés indukciójához (Netea és mtsi., 2010b). Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, van-e különbség a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* által indukált inflammaszóma aktivációban, a továbbiakban makrofágokban vizsgáltuk a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* által kiváltott IL-1 β termelést.

6.2.2. *C. parapsilosis* és *C. albicans* által indukált IL-1 β termelés vizsgálata THP-1 makrofágokban

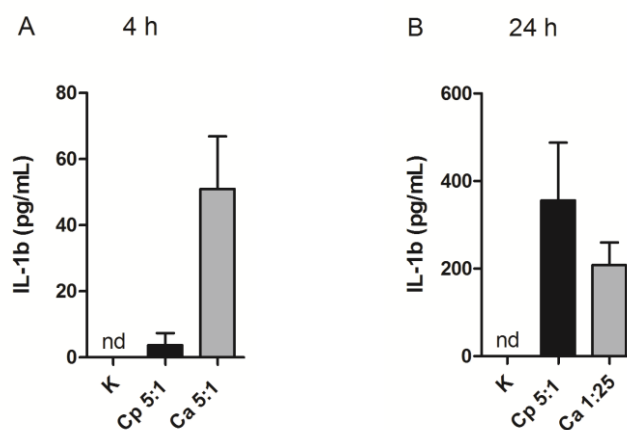
A THP-1 egy humán monocita-szerű sejtvonal, amelyet gyakran használnak az inflammaszóma aktiváció vizsgálata során (Dostert és mtsi., 2008; Bryan és mtsi., 2009; Rossol és mtsi., 2012). A THP-1 sejtek forbol-mirisztol-acetát (PMA) kezelés hatására makrofággá differenciálódnak, ami megváltozott morfológiával és adhézis kapacitással, valamint a PRR-ek upregulációjával jár (Jouault és mtsi., 2006; Park és mtsi., 2007). Kísérleteink során először megvizsgáltuk, hogy a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* milyen mértékben indukálja az IL-1 β szekrécióját PMA-kezelt THP-1 sejtekben. A különböző mennyiségű *Candida* sejttel fertőzött THP-1 makrofágok IL-1 β termelését a 19. ábra mutatja.



19. ábra. Élő (A) és hővel előlt (B) *C. parapsilosis* és *C. albicans* által indukált IL-1 β termelés THP-1 makrofágokban. THP-1 (5×10^5) stimulációt követően 24 órával a szekretált IL-1 β mennyiségét a sejtkultúrák felülúszóiban ELISA segítségével határoztuk meg. Feltüntetett adatok: átlag \pm standard hiba (3 független kísérlet). A számok a *Candida*:THP-1 arányt mutatják. K, kontroll (nem stimulált sejtek); Cp, *C. parapsilosis*; Ca, *C. albicans*.

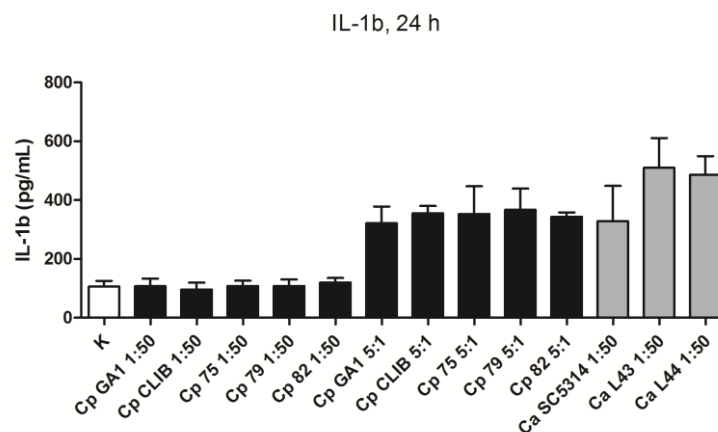
Azt tapasztaltuk, hogy míg 24 óra elteltével a *C. albicans* már igen alacsony (1:100 *Candida*:THP-1) kiindulási sejtszám esetén indukálta az IL-1 β szekrécióját, *C. parapsilosis* esetén százszor nagyobb mennyiségű élesztősejtre volt szükség a citokin termelés indukciójához. Megvizsgáltuk azt is, hogy a hővel előlt élesztősejtek indukálnak-e IL-1 β termelést THP-1 sejtekben. Azt tapasztaltuk, hogy sem a hővel előlt *C. parapsilosis*, sem az ilyen módon kezelt *C. albicans* nem indukálta a citokin szekrécióját 24 óra elteltével, még 10:1 fertőzési arány esetén sem (19B ábra). Ez az eredmény összhangban van más tanulmányokkal, amelyekben kimutatták, hogy csak az élő *C. albicans* sejtek indukálnak IL-1 β termelést makrofágokban és dendritikus sejtekben (Gross és mtsi., 2009; Joly és mtsi., 2009).

Annak érdekében, hogy megbizonyosodjunk róla, hogy a *C. parapsilosis* által indukált alacsony szintű IL-1 β nem a THP-1 sejtek specifikus fenotípusának köszönhető, kísérleteinket primer humán makrofágokkal is elvégeztük. Hasonlóképpen a THP-1 sejteknél tapasztaltakhoz, primer humán makrofágokban a *C. parapsilosis* csak 24 órás inkubációt követően, 5:1 fertőzési arány esetén indukálta az IL-1 β szekrécióját, míg a *C. albicans* már néhány óra elteltével IL-1 β termelést váltott ki (20. ábra).



20. ábra. *C. parapsilosis* és *C. albicans* által indukált IL-1 β szekréció primer humán makrofágokban. PBMC-DM stimulációt (4 óra, A; 24 óra, B) követően a szekretált IL-1 β mennyiségét a sejtkultúrák felülúszóiban ELISA segítségével határoztuk meg. Feltüntetett értékek: átlag \pm standard hiba. A számok a *Candida*:THP-1 arányt mutatják. K, kontroll; Cp, *C. parapsilosis*; Ca, *C. albicans*; nd, nem detektálható; n=2.

Annak érdekében, hogy csökkentsük a kísérleti rendszer variabilitását, a továbbiakban minden kísérletünkben a PMA-indukált THP-1 makrofágokat használtuk az IL-1 β termelés különbségének vizsgálatához. A továbbiakban arra kerestük a választ, hogy a *C. parapsilosis* által kiváltott alacsony szintű IL-1 β szekréció fajspecifikus jelenség-e vagy függ az adott *Candida* törzstől. Ennek vizsgálata érdekében a THP-1 makrofágokat 5 különböző *C. parapsilosis*, és 3 különböző *C. albicans* törzzsel fertőztük, és 24 óra elteltével mértük a szekretált IL-1 β koncentrációját. Eredményeink arra utalnak, hogy a *C. parapsilosis* esetében mért alacsony IL-1 β indukció fajspecifikus, ugyanis egyik *C. parapsilosis* sem indukálta az IL-1 β termelést alacsony sejtszám esetén (1:50), míg 5:1 fertőzési aránynál mindegyik törzs hasonló mértékű IL-1 β termelést váltott ki. Ugyanakkor mindhárom *C. albicans* törzs indukálta az IL-1 β szekréciót már 1:50 fertőzési arány esetén (21. ábra).

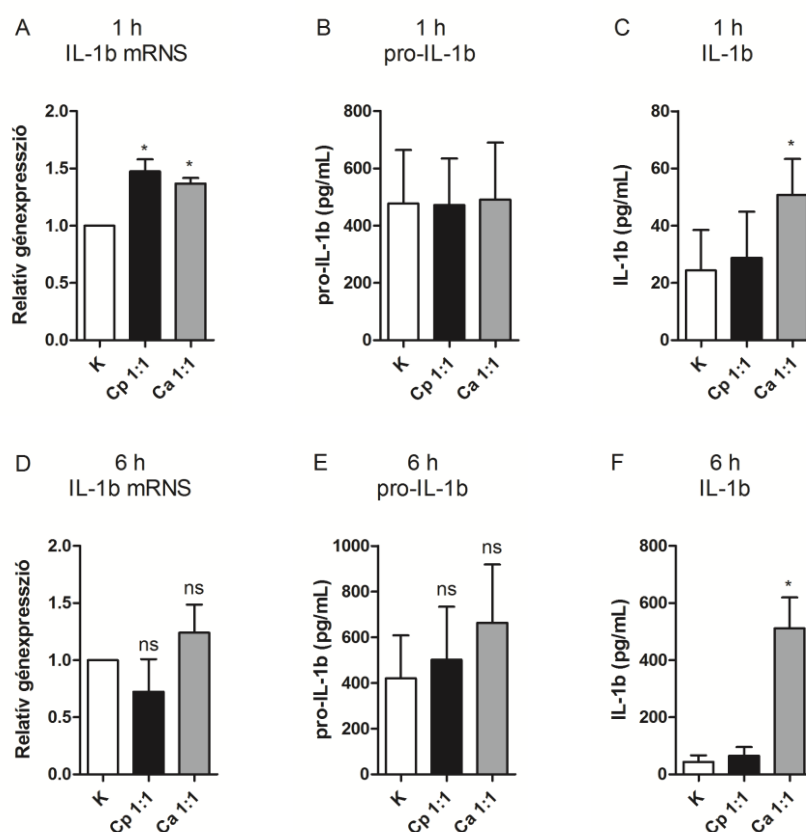


21. ábra. Különböző *C. parapsilosis* és *C. albicans* törzsek által indukált IL-1 β termelés THP-1 makrofágokban. THP-1 (5×10^5) stimulációt követően 24 órával a szekretált IL-1 β mennyiségét a sejtkultúrák felülúszóiban ELISA segítségével határoztuk meg. Feltüntetett adatok: átlag \pm standard hiba (3 független kísérlet). A számok a *Candida*:THP-1 arányt mutatják. K, kontroll (nem stimulált sejtek); Cp, *C. parapsilosis*; Ca, *C. albicans*.

6.2.3. Pro-IL-1 β transzkripció és transzláció vizsgálata *C. parapsilosis* és a *C. albicans* fertőzést követően

Az érett IL-1 β kialakulása makrofágokban kétlépcsős folyamat: először az IL-1 β mRNS és fehérje szintézisére van szükség, majd a pro-IL-1 β aktivált kaszpáz-1 általi hasítására (Netea és mtsi., 2010b). Annak érdekében, hogy megvizsgálhassuk, van-e különbség

transzkripció, illetve transláció szinten is az IL-1 β szintézisében *C. parapsilosis*-szal és *C. albicans*-szal stimulált sejtekben, meghatároztuk a két faj által indukált IL-1 β mRNS, illetve a pro-IL-1 β expressziót THP-1 makrofágokban. Azt tapasztaltuk, hogy míg az IL-1 β szekréció már 1 óra elteltével szignifikánsan nagyobb mértékű volt *C. albicans* stimuláció esetén, az IL-1 β mRNS és intracelluláris pro-IL-1 β szintje nem különbözött a *C. parapsilosis*-szal és *C. albicans*-szal stimulált sejtekben sem 1 óra, sem 6 óra elteltével (22. ábra).



22. ábra. *C. parapsilosis* és *C. albicans* által indukált IL-1 β mRNS expresszió (A, D), intracelluláris pro-IL-1 β (B, E) és szekretált IL-1 β (C, F) THP-1 makrofágokban. 1 órás (A-C) vagy 6 órás (D-F) THP-1 stimulációt követően az IL-1 β mRNS szintjét qRT-PCR, a pro-IL-1 β és szekretált IL-1 β mennyiségét ELISA segítségével határoztuk meg. A pro-IL-1 β szintjét a sejtek fagyasztásos feltárását követően határoztuk meg. Feltüntetett adatok: átlag \pm standard hiba (3 független kísérlet). K, kontroll (nem stimulált sejtek); Cp, *C. parapsilosis*; Ca, *C. albicans*; ns, nem szignifikáns; * p<0,05, (páros t-próba).

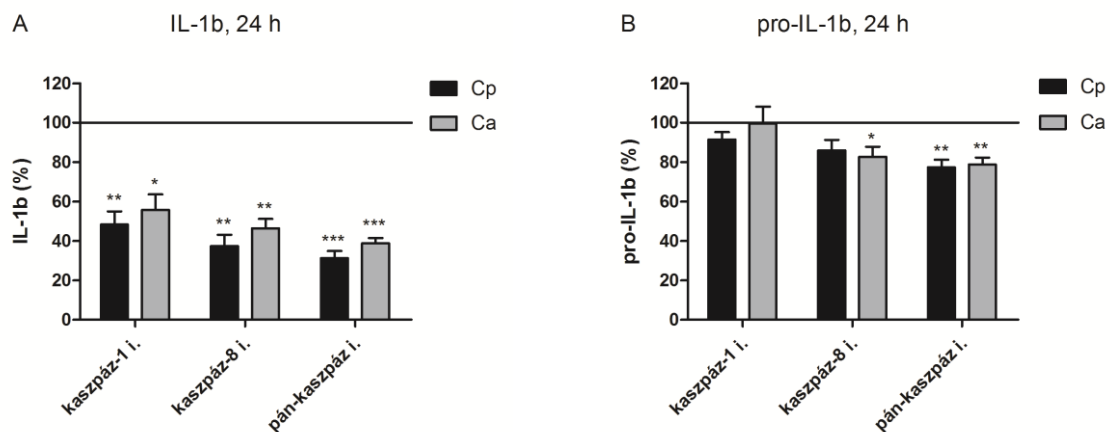
Megjegyzendő, hogy sem az IL-1 β mRNS, sem a pro-IL-1 β szintjében nem tapasztaltunk nagymértékű emelkedést. Ez valószínűleg azzal magyarázható, hogy a PMA-kezelt THP-1

sejtekben eleve emelkedett az IL-1 β mRNS szintje; ismert ugyanis, hogy a PMA indukálja az IL-1 β mRNS szintézisét (Park és mtsi., 2007). Összességében ezek az eredmények arra utalnak, hogy a *C. parapsilosis*-szal stimulált sejtek alacsony mértékű IL-1 β szekréciója a *C. albicans*-szal fertőzött makrofágokhoz képest nem transzkripciós vagy translációs különbségekre, hanem a pro-IL-1 β éréseinek kisebb mértékére vezethető vissza.

6.2.4. Kaszpázok szerepe a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* által indukált IL-1 β termelésben

Miután bizonyítottuk, hogy a *C. parapsilosis* fertőzés esetén megfigyelt alacsony IL-1 β szekréció a pro-IL-1 β hasítás hiányának a következménye, meg kívántuk vizsgálni a kaszpázok szerepét az IL-1 β indukció során. A pro-IL-1 β hasításában az inflammaszóma részét képező kaszpáz-1 játssza a legfontosabb szerepet (Dinarello, 2004). Ismert, hogy a *C. albicans* makrofágokban kaszpáz-1 függő IL-1 β termelést indukál, és a kaszpáz-1 deficiens egerek megnövekedett érzékenységet mutatnak *C. albicans* fertőzéssel szemben (Hise és mtsi., 2009). Ugyan a kaszpáz-8 főként az apoptózisban betöltött szerepéről ismert, újabb kutatások kimutatták, hogy az IL-1 β termelésben is fontos szerepe lehet (Gurung és Kanneganti, 2015). A kaszpáz-8 egyrészt képes közvetlenül a CARD9-Bcl10-MALT1 komplexhez kapcsolódni az ASC adapterrel együtt, ami NLR-független pro-IL-1 β hasítást eredményez (Gringhuis és mtsi., 2012). Másrészt kimutatták, hogy a kaszpáz-8 szükséges az NLRP3 inflammaszóma összeszerelődéséhez és a kaszpáz-1 aktivációjához is (Gurung és Kanneganti, 2015). Annak érdekében, hogy információt nyerjünk a kaszpázok szerepéről a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* által indukált IL-1 β termelésben, a THP-1 makrofágokat kaszpáz-1, kaszpáz-8, illetve pán-kaspáz inhibitor jelenlétében stimuláltuk a gombákkal. Mivel a *C. parapsilosis* csak 24 óra elteltével és viszonylag magas fertőzési arány esetén volt képes IL-1 β szekréciót indukálni, a *C. albicans* azonban hasonló körülmények között intenzív sejtkárosodást okoz, ezekben a kísérletekben különböző kiindulási sejtszámmal dolgoztunk a két faj esetén. Úgy tapasztaltuk, hogy *C. parapsilosis* esetén az 5:1, *C. albicans* esetén az 1:25 *Candida*:THP-1 fertőzési arány volt optimális az IL-1 β szekréció vizsgálatához. Ilyen körülmények között a két faj 24 óra inkubációt követően hasonló mértékű IL-1 β szekréciót indukált, és a sejtpusztulás mértéke még nem volt túlságosan magas (~20-30 %). Eredményeink szerint a kaszpáz-1, kaszpáz-8 és a pán-kaspáz inhibitor is jelentősen csökkentette mind a *C. parapsilosis*, mind a *C. albicans*

által indukált IL-1 β szekréciót (23A ábra). Továbbá, míg a várakozásoknak megfelelően a kaszpáz-1 inhibitor nem volt hatással az intracelluláris pro-IL-1 β szintjére, a kaszpáz-8 és a pán-kaspáz inhibitor kismértékben csökkentette a pro-IL-1 β koncentrációt is, jelezve, hogy ezek az enzimek a pro-IL-1 β szintézisében is szerepet játszanak (23B ábra). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* stimuláció következtében hasonló módon képződik az IL-1 β érett formája, és a folyamatban mind a kaszpáz-1, mind a kaszpáz-8 fontos szerepet játszik.

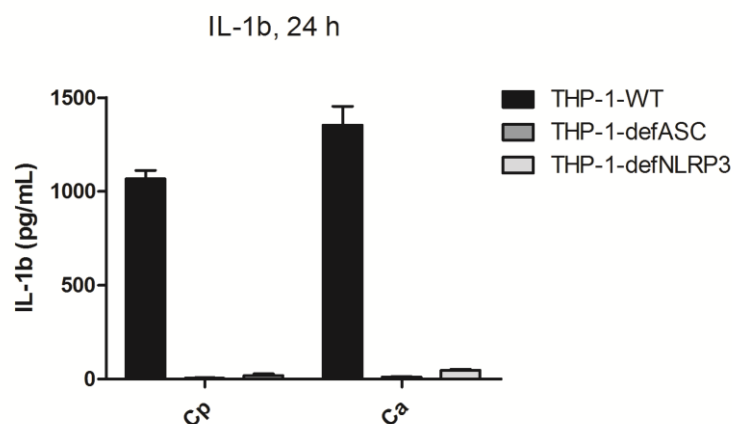


23. ábra. Kaspázok szerepe a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* által indukált IL-1 β termelésben. A THP-1 makrofágokat 24 órán át stimuláltuk *C. parapsilosis*-szal vagy *C. albicans*-szal kaszpáz-1, kaszpáz-8, vagy pán-kaspáz inhibitor jelenlétében. A szekretált IL-1 β (A) vagy intracelluláris pro-IL-1 β (B) mennyiségét ELISA segítségével határoztuk meg. A grafikonon az inhibitorok jelenlétében és a kontroll (inhibitor nélküli) mintákban mért citokin koncentrációk százalékos arányát (átlag \pm standard hiba, 4 független kísérlet) tüntettük fel. Fertőzési arány (*Candida*:THP-1): Cp, 5:1; Ca, 1:25. Cp, *C. parapsilosis*; Ca, *C. albicans*; i, inhibitor. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (páros t-próba).

6.2.5. Az NLRP3 inflammaszóma szerepe a *C. albicans* és *C. parapsilosis* által indukált IL-1 β termelésben

Makrofágokban és dendritikus sejtekben a *C. albicans* által kiváltott IL-1 β szekréció NLRP3-függő, és független az NLRP1, NLRC4, NLRP6 és NLRP12 inflammaszómáktól (Gross és mtsi., 2009; Joly és mtsi., 2009). Annak érdekében, hogy megbizonyosodjunk róla, hogy a *C. parapsilosis* is képes aktiválni az NLRP3 inflammaszómát, ASC és NLRP3 deficiens THP-1 makrofágokat stimuláltunk *C. albicans*-szal és *C. parapsilosis*-szal, majd megvizsgáltuk az IL-1 β szekréciót. Azt tapasztaltuk, hogy az ASC és NLRP3 deficiens

sejtek elenyésző mennyiségű IL-1 β -t szekretáltak *C. parapsilosis* és *C. albicans* stimulációt követően, ami azt bizonyítja, hogy az IL-1 β termelés mindkét *Candida* faj esetén NLRP3 inflammaszóma-függő (24. ábra).

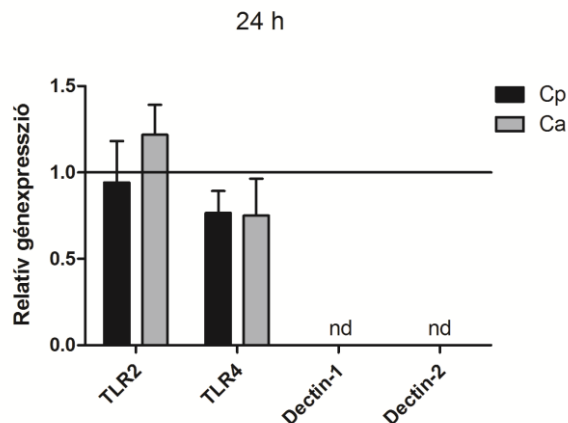


24. ábra. Az ASC és NLRP3 szerepe a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* által kiváltott IL-1 β termelésben.

A vad típusú, illetve ASC vagy NLRP3 deficiens THP-1 sejteket 24 óráig stimuláltuk *C. parapsilosis*-szal vagy *C. albicans*-szal, majd meghatároztuk a szekretált IL-1 β mennyiségét ELISA segítségével. Az ábrán egy reprezentatív kísérlet eredménye látható. Fertőzési arány (*Candida*:THP-1): Cp, 5:1; Ca, 1:25. Cp, *C. parapsilosis*; Ca, *C. albicans*; THP-1-WT, vad típusú THP-1 sejtek; THP-1-defASC, ASC deficiens THP-1 sejtek; THP-1-defNLRP3, NLRP3 deficiens THP-1 sejtek.

6.2.6. Syk, TLR2, TLR4 és IRAK szerepe a *C. albicans* és *C. parapsilosis* által indukált IL-1 β termelésben

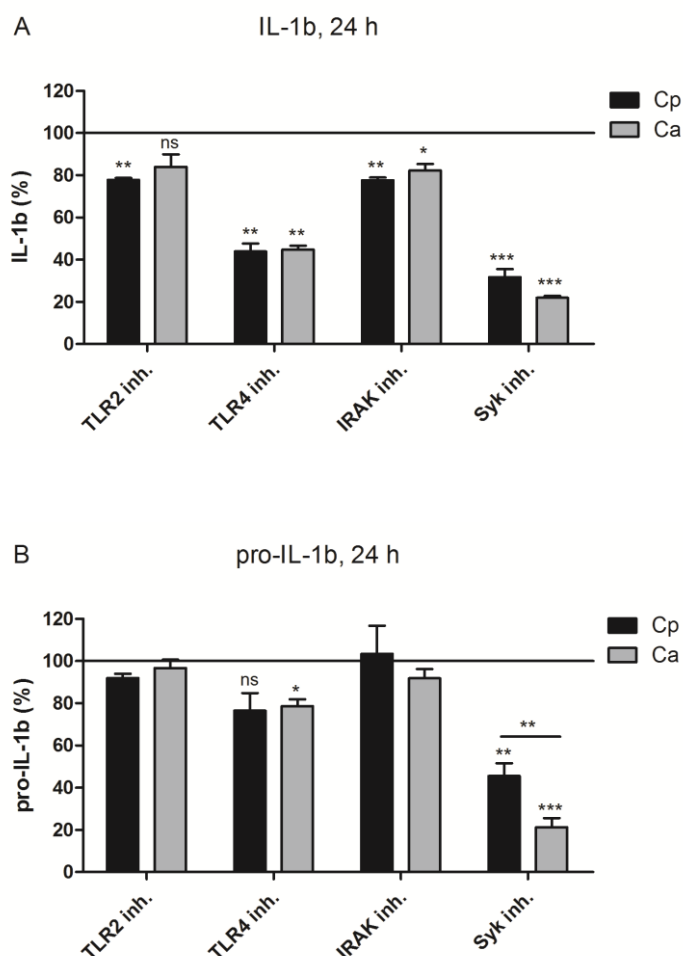
A továbbiakban megvizsgáltuk néhány, az inflammaszóma aktivációban fontos szerepet játszó receptor és kináz szerepét a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* által indukált IL-1 β termelésben. Az inflammaszóma aktivációval leggyakrabban kapcsolatba hozott mintázatfelismerő receptor a Dectin-1, THP-1 sejtekben azonban ennek a receptornak nagyon alacsony az expressziója (Bi és mtsi., 2010). Ezt a mi eredményeink is megerősítették, sem a Dectin-1, sem a Dectin-2 mRNS nem volt ugyanis kimutatható PMA-aktivált THP-1 sejtekben qRT-PCR segítségével (25. ábra). A THP-1 makrofágok normál szinten expresszálnak azonban TLR2-t és TLR4-et (Wang és mtsi., 2013).



25. ábra. TLR2, TLR4, Dectin-1 és Dectin-2 receptorok expressziója *C. parapsilosis*-szal és *C. albicans*-szal stimulált THP-1 makrofágokban. 6 órás THP-1 stimulációt követően a receptorok relatív mRNS szintjét qRT-PCR segítségével határoztuk meg. A grafikonon a stimulált és a kontroll mintákban mért mRNS expresszió relatív arányát (átlag \pm standard hiba) tüntettük fel. Fertőzési arány: 1:1 *Candida*:THP-1. Cp, *C. parapsilosis*; Ca, *C. albicans*; nd, nem detektálható.

Kimutatták továbbá, hogy THP-1 sejtekben a TLR4 konstitutívan asszociál a Syk kinázzal (Chaudhary és mtsi., 2007). A Syk kináznak igen fontos szerepe van a patogén gombák felismerése során, és *C. albicans* fertőzés során mind a pro-IL-1 β szintézis, mind az inflammaszóma aktiváció indukciójában szerepet játszik (Gross és mtsi., 2009). Az IRAK kináz fontos része a TLR-ek által indított szignalizációs kaszkádnak (Kawai és Akira, 2006), és TLR aktivációt követően az IRAK-1 közvetlenül is képes aktiválni az inflammaszómát, a pro-IL-1 β szintézis előzetes upregulációja nélkül (Lin és mtsi., 2014). Annak érdekében, hogy információt nyerjünk a TLR4, TLR2, Syk és IRAK szerepéről a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* által kiváltott inflammaszóma aktiváció során, különböző inhibitorokat alkalmaztunk a THP-1 makrofágok stimulációja során. Azt tapasztaltuk, hogy mind a TLR4 inhibitor (ebben az esetben nem *B. quintana* LPS-t, hanem CLI-095 inhibitort használtunk), mind a Syk inhibitor jelentősen csökkentette a THP-1 makrofágok által szekretált IL-1 β mennyiségét mindkét *Candida* fajjal történő fertőzés esetén (26A ábra). A Syk gátlása esetén a pro-IL-1 β szintjében is jelentős csökkenést tapasztaltunk, amely *C. albicans* stimuláció esetén szignifikánsan nagyobb mértékű volt, mint *C. parapsilosis* fertőzés esetén (26B ábra). A TLR2 és az IRAK gátlása esetén a szekretált IL-1 β szint kismértékű (mintegy 20 %-os) csökkenését tapasztaltuk, az inhibitorok nem voltak azonban hatással a pro-IL-1 β szintjére. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy THP-1

makrofágokban mind a *C. parapsilosis*, mind a *C. albicans* főként TLR4- és Syk-függő útvonalon indukálja az IL-1 β szekréciót.

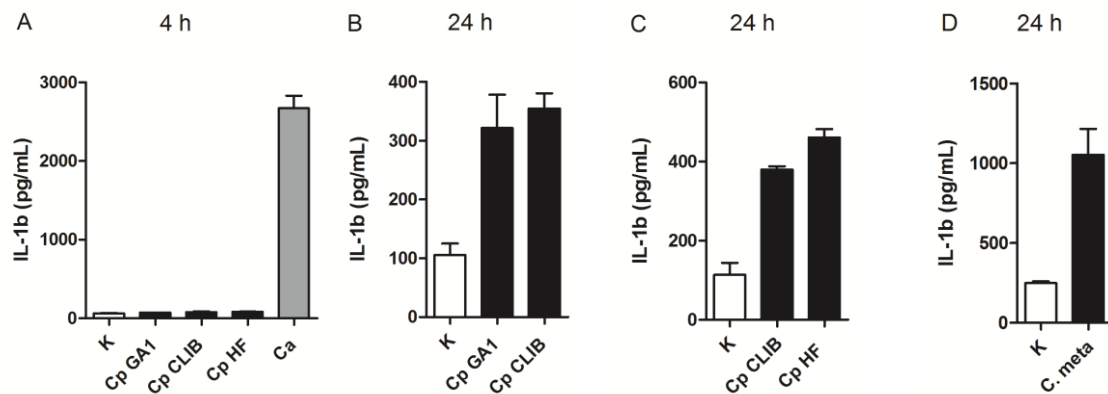


26. ábra. TLR2, TLR4, IRAK és Syk szerepe a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* által indukált IL-1 β szekrécióban. A THP-1 makrofágokat 24 órán át stimuláltuk *C. parapsilosis*-szal vagy *C. albicans*-szal TLR2, TLR4, IRAK vagy Syk inhibitor jelenlétében. A szekretált IL-1 β (A) vagy intracelluláris pro-IL-1 β (B) mennyiségét ELISA segítségével határoztuk meg. A grafikonon az inhibitorok jelenlétében és a kontroll (inhibitor nélküli) mintákban mért citokin koncentrációk százalékos arányát (átlag \pm standard hiba, 3-4 független kísérlet) tüntettük fel. Fertőzési arány (*Candida*:THP-1): Cp, 5:1; Ca, 1:25. Cp, *C. parapsilosis*; Ca, *C. albicans*; inh, inhibitor. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns, nem szignifikáns (páros t-próba).

6.2.7. Pszeudohifa képzés hatása az IL-1 β szekrécióra

C. albicans esetében az élesztő-hifa tranzíciónak fontos szerepet tulajdonítanak az inflammaszóma aktivációja során (Joly és mtsi., 2009; Cheng és mtsi., 2011). A

továbbiakban meg kívántuk vizsgálni, hogy a *C. parapsilosis* pszeudohifa képzése hogyan befolyásolja az IL-1 β szekréciót. A THP-1 makrofágokat különböző *C. parapsilosis* törzsekkel stimuláltuk: típustörzsünkkel (vad típusú GA1), amely viszonylag lassú pszeudohifa-képző; CLIB vad típusú törzzsel, amely már néhány óra alatt pszeudomicéliumos növekedést mutat; CLIB HF mutáns törzzsel, amelynek hiperfilamentáló fenotípusa van; valamint *C. metapsilosis*-szal, amely kizárólag élesztőszerű növekedést mutat. Érdekes módon azt tapasztaltuk, hogy az IL-1 β szekréció független a pszeudohifa képzéstől. 4 óra elteltével egyik *C. parapsilosis* törzs sem indukált IL-1 β termelést, ellentétben a *C. albicans*-szal (27A ábra), míg 24 óra inkubációt követően a GA1, CLIB és CLIB HF törzsek hasonló mértékű IL-1 β szekréciót indukáltak (27B-C ábra). Ugyanakkor 24 óra elteltével a *C. metapsilosis* szintén indukálta az IL-1 β szekrécióját (27D ábra).



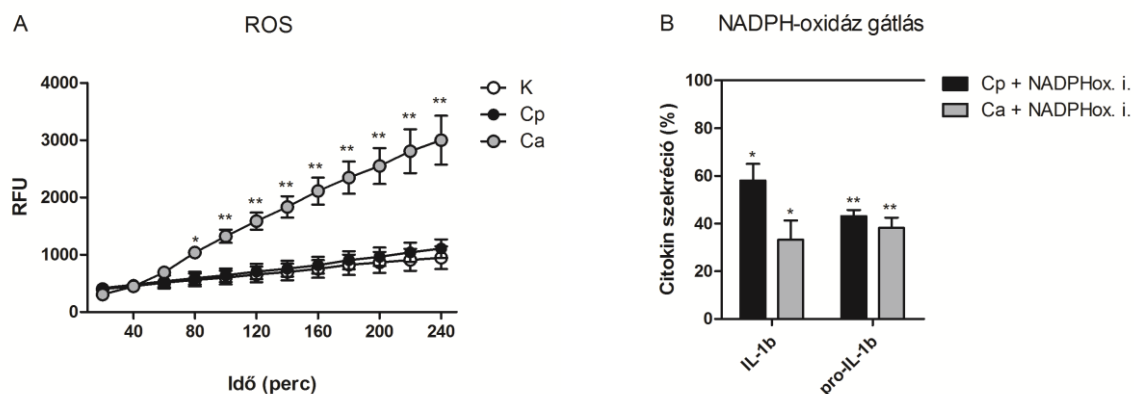
27. ábra. Pszeudohifa képzés szerepe a *C. parapsilosis* által indukált IL-1 β termelésben. A THP-1 makrofágokat 4 (A) vagy 24 (B-D) óráig stimuláltuk a feltüntetett *C. parapsilosis* törzsekkel vagy *C. albicans*-szal, majd ELISA segítségével meghatároztuk a szekretált IL-1 β mennyiségét. Fertőzési arány (*Candida*:THP-1): 5:1. K, kontroll (nem stimulált sejtek); Cp GA1, *C. parapsilosis* GA1 vad típusú törzs; Cp CLIB, *C. parapsilosis* CLIB vad típusú törzs; Cp HF, *C. parapsilosis* CLIB hiperfilamentáló törzs; C. meta, *C. metapsilosis*.

6.2.8. *C. parapsilosis* és *C. albicans* által indukált reaktív oxigéngyök termelés vizsgálata

Immunsejtekben a reaktív oxigéngyökök termelése kulcsszerepet játszik a fagocitált mikrobák elpusztításában (Cheng és mtsi., 2012). Ugyanakkor a ROS koncentrációjának megemelkedését a sejten belül az NLRP3 inflammaszóma egyik lehetséges aktivátoraként tartják számon (Tschopp és Schroder, 2010). Több tanulmányban is kimutatták, hogy a *C.*

albicans által kiváltott kaszpáz-1 aktiváció is ROS termelés-függő (Gross és mtsi., 2009; Pietrella és mtsi., 2013), bár meg kell jegyezni, hogy a ROS pontos szerepe az inflammaszóma aktivációban nem tisztázott és jelenleg is intenzív vita tárgyát képezi. Kísérleteink során fluoreszcens DCFDA próba segítségével megvizsgáltuk, hogy a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* indukálja-e a ROS termelést THP-1 makrofágokban. Azt tapasztaltuk, hogy míg a *C. albicans* hatékonyan indukálta a ROS termelést THP-1 sejtekben, a *C. parapsilosis* 4 óra alatt egyáltalán nem indukált ROS képződést (28A ábra). Fagocitákban a NADPH-oxidáz fontos szerepet játszik a ROS termelésben (Brown, 2011). Több tanulmányban is kimutatták, hogy a NADPH-oxidáz aktivitásának kémiai inhibitorokkal történő gátlása vagy az egyes enzim alegységek expressziójának a csendesítése esetén nem megfelelő a kaszpáz-1 aktiváció és drasztikusan csökken az IL-1 β szekréció (Rubartelli és mtsi., 2011). Mások azonban rámutattak, hogy a ROS inhibitorok nem az inflammaszóma aktivációt, hanem a pro-IL-1 β és NLRP3 mRNS expresszióját gátolják (Bauernfeind és mtsi., 2011). Kísérleteink során megvizsgáltuk, hogy a NADPH-oxidáz gátlása hogyan befolyásolja a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* által indukált IL-1 β szekréciót. Azt tapasztaltuk, hogy NADPH-oxidáz inhibitor jelenlétében jelentősen csökkent mind a *C. parapsilosis*-szal, mind a *C. albicans*-szal stimulált THP-1 makrofágok IL-1 β termelése (28B ábra). Továbbá, az inhibitor az intracelluláris pro-IL-1 β szintjét is jelentősen csökkentette, megerősítve a korábbi szakirodalmi adatokat (Bauernfeind és mtsi., 2011). Tassi és munkatársai kimutatták, hogy humán monocitákban az IL-1 β szekréció egy kétlépcsős redox válasz függvénye: először a PRR-ok által indukált ROS termelésre van szükség, ami ezután antioxidáns választ indukál (Tassi és mtsi., 2009). Kimutatták továbbá, hogy a THP-1 sejtekre, valamint az egér és humán primer makrofágokra is az antioxidáns rendszerek magas szintű expressziója jellemző, ami azt jelenti, hogy a termelődött ROS gyorsan semlegesítődik, ezért erős oxidatív stimulusra van szükség az antioxidáns válasz és az IL-1 β szekréció indukációjához (Carta és mtsi., 2011). Carta és munkatársai azt tapasztalták, hogy amikor hidrogén-peroxidot adtak a THP-1 sejtekhez, jelentősen megnőtt az IL-1 β szekréció (Carta és mtsi., 2011). Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a *C. parapsilosis* által indukált alacsony IL-1 β termelés oka lehet-e az, hogy ez a faj nem indukál elég intenzív ROS termelést, megvizsgáltuk a *C. albicans* és *C. parapsilosis* által indukált IL-1 β szekréciót 1, 2, 25 és 50 mM hidrogén-peroxid jelenlétében. Ugyan a 25 és 50 mM hidrogén-peroxid kezelés minden esetben megnövelte a THP-1 sejtek IL-1 β szekrécióját, a *C. parapsilosis*-szal stimulált sejtek továbbra is

alacsonyabb IL-1 β termelést mutattak a *C. albicans*-szal stimulált sejtekhez képest (az adatokat nem tüntettük fel). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy ugyan a ROS termelés szerepet játszhat az IL-1 β szekréció indukciójában, nem kizárólag ez felelős a *C. parapsilosis* által indukált alacsony szintű IL-1 β termelésért.

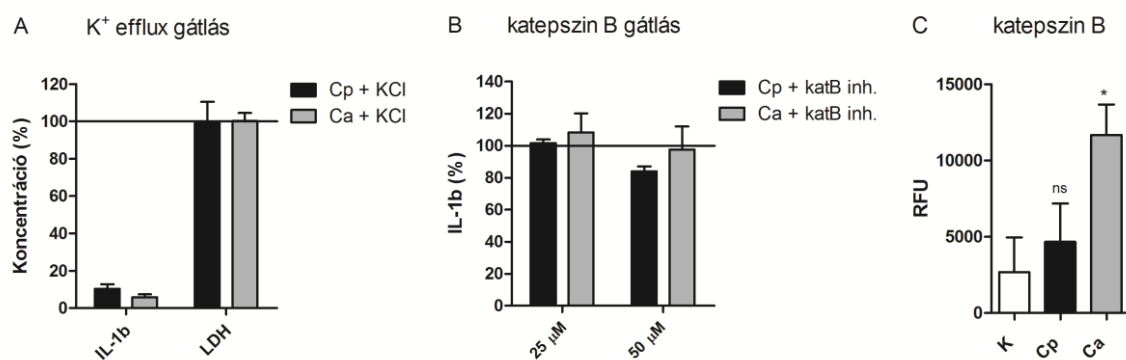


28. ábra. *C. parapsilosis* és *C. albicans* által indukált ROS termelés szerepe az IL-1 β szekréció indukciójában. (A) A *C. parapsilosis*-szal és *C. albicans*-szal stimulált THP-1 makrofágok ROS termelését DCFDA fluoreszcens próba segítségével határoztuk meg. Fertőzési arány 1:1 *Candida*:THP-1. RFU, relative fluorescence units (relatív fluoreszcencia). (B) A THP-1 makrofágokat 24 órán át stimuláltuk *C. parapsilosis*-szal vagy *C. albicans*-szal NADPH-oxidáz inhibitor jelenlétében. A szekretált IL-1 β és intracelluláris pro-IL-1 β mennyiségét ELISA segítségével határoztuk meg. A grafikonon az inhibitorok jelenlétében és a kontroll (inhibitor nélküli) mintákban mért citokin koncentrációk százalékos arányát (átlag \pm standard hiba, 3 független kísérlet) tüntettük fel. Fertőzési arány (*Candida*:THP-1): Cp, 5:1; Ca, 1:25. K, kontroll (nem stimulált sejtek); Cp, *C. parapsilosis*; Ca, *C. albicans*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (páros t-próba).

6.2.9. K⁺ efflux és katepszin B felszabadulás szerepének vizsgálata az inflammaszóma aktivációban

Az intracelluláris ROS koncentráció megemelkedésén kívül a másik két általános mechanizmus, amely bizonyítottan kapcsolatba hozható az NLRP3 inflammaszóma aktivációjával, a sejten belüli K⁺ koncentráció hirtelen csökkenése, valamint a katepszin B felszabadulása a lizoszómákból (Vanaja és mtsi., 2015). További munkánk során arra kerestük a választ, hogy ezek a folyamatok szerepet játszanak-e a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* által indukált IL-1 β termelésben. A K⁺ efflux könnyen gátolható az extracelluláris K⁺ koncentráció megemelésével (Petrilli és mtsi., 2007). Azt tapasztaltuk, hogy 50 mM KCl jelenlétében mind a *C. parapsilosis*, mind a *C. albicans* által indukált IL-1 β szekréció

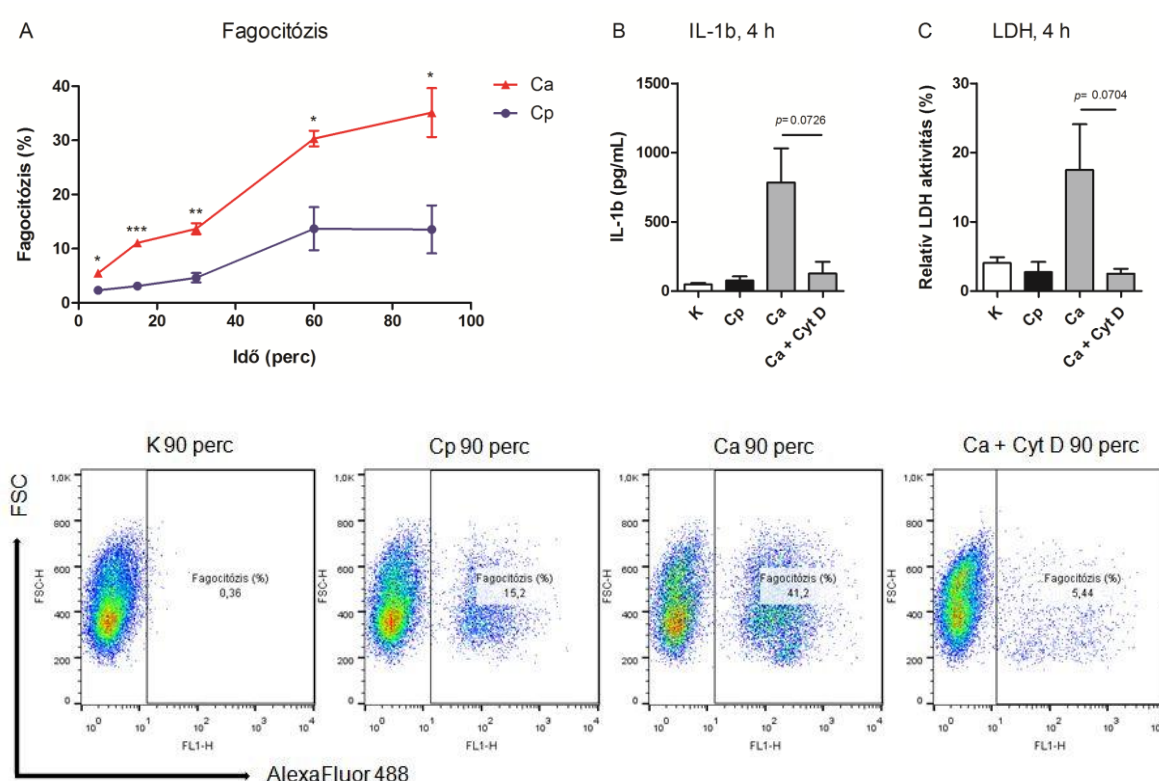
drasztikusan lecsökkent, noha a KCl nem volt hatással a sejtek károsodására (29A ábra). A katepszin B szerepének vizsgálata során egy fluoreszcencia mérésen alapuló, katepszin B aktivitás detektáló kit segítségével először megvizsgáltuk, hogy a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* okoz-e lizoszóma károsodást, illetve lizoszómális katepszin B felszabadulást. Azt tapasztaltuk, hogy míg 4 óra inkubációt követően a *C. albicans* jelentős katepszin B felszabadulást indukált THP-1 sejtekben, a *C. parapsilosis*-szal stimulált sejtek nem mutattak a kontroll sejtektől szignifikánsan különböző katepszin B aktivitást (29C ábra). Amikor azonban katepszin B inhibitor jelenlétében stimuláltuk a THP-1 sejteket, azt tapasztaltuk, hogy az inhibitor nem volt hatással sem a *C. parapsilosis*-szal, sem a *C. albicans*-szal stimulált sejtek IL-1 β termelésére (29B ábra). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy kísérleti rendszerünkben az IL-1 β szekréció független a katepszin B aktivitásától.



29. ábra. K⁺ efflux és katepszin B szerepe a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* által kiváltott IL-1 β szekrécióban. A THP-1 makrofágokat 24 óráig stimuláltuk *C. parapsilosis*-szal és *C. albicans*-szal 50 mM KCl (A) vagy 25, illetve 50 μ M CA-074-Me katepszin B inhibitor (B) jelenlétében, majd meghatároztuk az IL-1 β szekréció és sejtkárosodás mértékét ELISA, illetve LDH mérés segítségével. A grafikonon az inhibitorok jelenlétében és a kontroll (inhibitor nélküli) mintákban mért citokin koncentrációk százalékos arányát (átlag \pm standard hiba, 2 független kísérlet) tüntettük fel. (C) A THP-1 makrofágokat 4 órán át stimuláltuk *C. parapsilosis*-szal és *C. albicans*-szal, majd fluoreszcens mérés alapján meghatároztuk a katepszin B felszabadulás mértékét. Feltüntetett értékek: átlag \pm standard hiba (3 független kísérlet). Fertőzési arány: 1:1 *Candida*:THP-1. K, kontroll (nem stimulált sejtek); Cp, *C. parapsilosis*; Ca, *C. albicans*. * $p < 0,05$ (páros t-próba).

6.2.10. *C. parapsilosis* és *C. albicans* fagocitózisának vizsgálata

Makrofágokban a *C. albicans* által indukált inflammaszóma aktiváció fagocitózis-függő (Joly és mtsi., 2009), ezért a továbbiakban össze kívántuk hasonlítani, hogy a THP-1 sejtek milyen mértékben fagocitálják a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* sejtjeit. Az élesztősejtek fluoreszcens jelölése (AlexaFluor 488 festékkel) után a fagocitáló makrofág populáció nagyságát a fertőzést követő 5., 15., 30., 60. és 90. percben áramlási citometria segítségével határoztuk meg. Azt tapasztaltuk, hogy a THP-1 makrofágok szignifikánsan nagyobb mértékben fagocitálták a *C. albicans*, mint a *C. parapsilosis* sejtjeit (30A ábra).



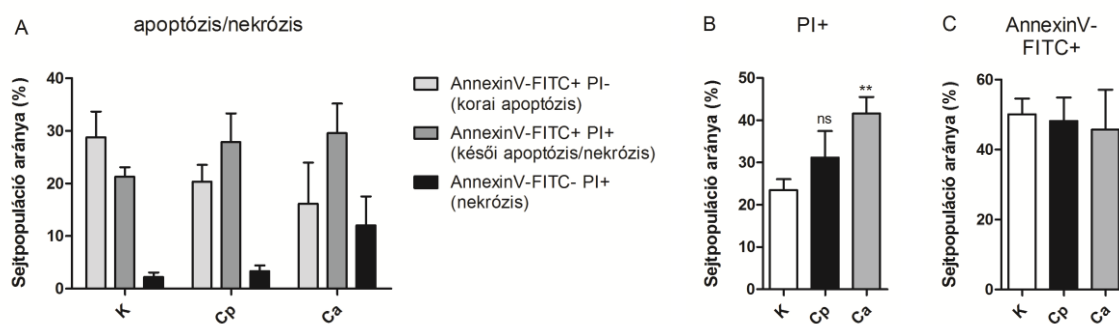
30. ábra. Fagocitózis szerepe az inflammaszóma aktivációban. (A) *C. parapsilosis* és *C. albicans* fagocitózisának kinetikája. A THP-1 makrofágokat AlexaFluor 488 fluoreszcens festékkel jelölt *Candida* sejtekkel fertőztük, majd az AlexaFluor 488 pozitív makrofágok arányát (fagocitózis %) áramlási citometria segítségével határoztuk meg. Feltüntetett adatok: átlag \pm standard hiba (3 független kísérlet). Az alsó sorban egy mérési sorozat reprezentatív diagramjai láthatóak. (B-C) *C. parapsilosis*-szal és *C. albicans*-szal stimulált THP-1 sejtek (4 óra, 5:1 arány) IL-1 β (B) és LDH (C) szekréciója cytochalasin D (Cyt D) hiányában vagy jelenlétében. K, kontroll (nem stimulált sejtek); Cp, *C. parapsilosis*; Ca, *C. albicans*; Cyt D, cytochalasin D. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (páros t-próba).

Meg kell jegyezni, hogy a fagocitózis ilyen módon történő vizsgálata során nem lehetséges a ténylegesen bekebelezett és a csak makrofágok felszínére tapadt *Candida* sejtek elkülönítése, ezért kontrollként fagocitózis inhibitorral (cytochalasin D) kezelt mintákban is meghatároztuk az AlexaFluor 488 pozitív makrofágok arányát. Azt tapasztaltuk, hogy ilyen körülmények között a pozitív sejtek aránya 90 perc elteltével elhanyagolhatóan alacsony volt (30. ábra), ami azt bizonyítja, hogy az AlexaFluor 488 pozitív sejtek aránya a ténylegesen fagocitáló makrofág populációt jelzi. Annak érdekében, hogy megvizsgálhassuk, a fagocitózis gátlása hogyan befolyásolja az IL-1 β szekréción és a sejtkárosodás mértékét, a THP-1 sejteket cytochalasin D jelenlétében stimuláltuk *C. parapsilosis*-szal és *C. albicans*-szal. Azt tapasztaltuk, hogy 4 órás stimuláció esetén a cytochalasin D kezelés drasztikusan lecsökkentette a *C. albicans*-szal stimulált sejtek IL-1 β , valamint LDH szekréciónját (30B-C ábra). Amint azt korábban is kimutattuk, 4 óra inkubáció alatt a *C. parapsilosis* egyáltalán nem indukálta az IL-1 β szekréciónját. 24 óra elteltével azonban a mérés problémásnak bizonyult: ebben az esetben a sejtkárosodás mértéke a cytochalasin D-t tartalmazó mintákban jelentősen magasabb volt az inhibitort nem tartalmazó mintákhoz képest, ami valószínűleg annak tulajdonítható, hogy a fagocitózis gátlása miatt ebben az esetben a gombák szabadon szaporodhatnak, így nagyobb mértékben károsítják a makrofágokat. Míg 24 óra elteltével a szekretált IL-1 β szintjében nem tapasztaltunk különbséget a fagocitózis gátlása esetén, a pro-IL-1 β szintje szignifikánsan alacsonyabb volt (az adatokat nem tüntettük fel). A fenti indokok miatt azonban nem zárható ki, hogy az intracelluláris pro-IL-1 β szint csökkenése a sejtek károsodásának tulajdonítható.

6.2.11. *C. parapsilosis* és *C. albicans* által indukált apoptózis és nekrozis vizsgálata

Makrofágokban az IL-1 β szekréción szorosan összefügg a programozott sejthalállal, ezért a továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* milyen mértékű apoptózist indukál THP-1 sejtekben. A THP-1 makrofágokat 4 órán át stimuláltuk (5:1 arányban) *C. parapsilosis*-szal és *C. albicans*-szal, majd AnnexinV-FITC/PI festést követően áramlási citometria segítségével meghatároztuk a mintákban az apoptotikus és nekrotikus sejtek százalékos arányát. Apoptózis során a foszfatidil-szerin a plazmamembrán belső oldaláról átkerül a membrán külső oldalára, ami AnnexinV-FITC jelöléssel detektálható (az AnnexinV fehérje specifikusan a foszfatidil-szerinhez kötődik)

(Vermes és mtsi., 1995). Ugyanakkor a nekrotikus sejtek propidium jodid (PI) festéssel azonosíthatóak, a PI ugyanis az ép membránnal rendelkező sejtekbe nem tud bejutni. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy sem a *C. parapsilosis*-szal, sem a *C. albicans*-szal stimulált THP-1 sejtekben nem volt magasabb az apoptotikus sejtek száma a kontroll mintákhoz képest (31. ábra, az elemzési stratégiát ld. az Anyagok és módszerek c. részben). Ugyanakkor a *C. albicans*-szal fertőzött mintákban szignifikánsan magasabb volt a nekrotikus sejtek száma a kontroll mintákhoz képest, a *C. parapsilosis* azonban nem okozott szignifikáns mértékű nekrozist (31B ábra). Ez az eredmény összhangban van az LDH mérésen alapuló adatokkal, miszerint 4 óra után a *C. parapsilosis* nem indukál jelentős mértékű LDH felszabadulást, ellentétben a *C. albicans*-szal (30C ábra).



31. ábra. *C. parapsilosis* és *C. albicans* által kiváltott apoptózis és nekrozis THP-1 sejtekben. (A-C) THP-1 stimulációt (4 h, 5:1 fertőzési arány) követően az apoptotikus és nekrotikus sejtek számát AnnexinV-FITC/PI festést követően áramlási citometria segítségével határoztuk meg. A grafikonokon az egyes populációk százalékos arányát (átlag ± standard hiba, 4 független kísérlet) tüntettük fel. (A) AnnexinV-FITC⁺ PI⁻, AnnexinV-FITC⁺ PI⁺ és AnnexinV-FITC⁻ PI⁺ sejtek megoszlási aránya, (B) PI⁺ sejtek aránya, (C) AnnexinV-FITC⁺ sejtek aránya a teljes THP-1 populáción belül. K, kontroll (nem stimulált sejtek); Cp, *C. parapsilosis*; Ca, *C. albicans*. ** p<0,01 (páros t-próba).

6.2.12. *C. parapsilosis* és *C. albicans* által indukált inflammaszóma aktiváció összehasonlítása – összefoglalás/értékelés

Kísérleteink során először összehasonlítottuk az élő *C. parapsilosis*-szal és *C. albicans*-szal stimulált mononukleáris sejtek gyulladásos citokin termelését. Azt tapasztaltuk, hogy míg a két faj hasonló TNFα és IL-6 szekréción indukált, a *C. parapsilosis*-szal stimulált sejtek jelentősen alacsonyabb mértékű IL-1β termelést mutattak a *C. albicans*-szal fertőzött sejtekhez képest. Netea és munkatársai kimutatták, hogy monocitákban a kaszpáz-1

folyamatosan aktív, ezért már egyetlen stimulus (pl. TLR ligand) is képes IL-1 β szekréciót indukálni, ellentétben a makrofágokkal, ahol két szignál szükséges az inflammaszóma aktivációjához (Netea és mtsi., 2009). Hogy pontosabb képet kapjunk a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* által indukált IL-1 β termelésről, további kísérleteinket PMA-indukált THP-1 makrofágokkal végeztük. Ezekben a sejtekben nincs konstitutívan aktív kaszpáz-1 (Netea és mtsi., 2009), megfelelő stimulus (2 szignál) esetén azonban intenzív kaszpáz-1 aktiváció és IL-1 β szekréció figyelhető meg, ezért ez a sejtípus ideális modell az inflammaszóma aktiváció vizsgálatához. Amikor megvizsgáltuk a *C. parapsilosis*-szal és *C. albicans*-szal stimulált THP-1 makrofágok IL-1 β termelését, azt tapasztaltuk, hogy a *C. parapsilosis* csak nagy sejtszámban és viszonylag hosszú inkubáció (12-24 óra) esetén indukálta az IL-1 β szekrécióját, szemben a *C. albicans*-szal, amely már néhány óra alatt intenzív IL-1 β termelést váltott ki. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a két faj eltérő mértékben képes aktiválni az inflammaszómát, ezért a továbbiakban részletesen megvizsgáltuk az e mögött álló lehetséges mechanizmusokat. Először megvizsgáltuk, hogy van-e különbség a pro-IL-1 β mRNS, illetve fehérje szintjében *C. parapsilosis*-szal és *C. albicans*-szal stimulált sejtekben. Azt tapasztaltuk, hogy mindkét gombával stimulált mintákban hasonló volt az IL-1 β mRNS és pro-IL-1 β szintje, azonban a *C. albicans* már egy óra inkubációt követően szignifikánsan magasabb IL-1 β szekréciót indukált. Ez az eredmény arra utal, hogy az IL-1 β termelés nem az 1. szignál hiányának a következménye, és összhangban van korábbi eredményeinkkel, miszerint a *C. parapsilosis* egér és humán makrofágokban is indukálja az IL-1 β mRNS expresszióját (Nemeth és mtsi., 2014; Toth és mtsi., 2014a). Továbbá, Cheng és munkatársai kimutatták, hogy noha a $\Delta efg1/\Delta cph1$ *C. albicans* mutáns törzs (amely nem képes fonalas növekedésre) primer humán makrofágokban jelentősen alacsonyabb szintű IL-1 β szekréciót vált ki, a vad típusú törzshöz hasonló mértékben indukálja az IL-1 β mRNS és pro-IL-1 β expresszióját (Cheng és mtsi., 2011). A fenti példa is mutatja, hogy a morfológiai változásoknak fontos szerepe van az inflammaszóma aktivációja során. Más szerzők is beszámoltak róla, hogy a csak élesztőszerűen növő *C. albicans* mutánsok makrofágokban nem indukáltak IL-1 β szekréciót (Joly és mtsi., 2009). Kimutatták továbbá azt is, hogy míg a pseudohifa képző *C. krusei* és *C. tropicalis* képes IL-1 β termelést kiváltani makrofágokban, a csak élesztőszerű növekedést mutató *C. glabrata* egyáltalán nem indukálja a citokin szekrécióját (Joly és mtsi., 2009). Mások azonban bizonyították, hogy az élesztő-hifa átmenet nem minden esetben szükséges vagy elégséges az IL-1 β szekréció indukációjához (Wellington és mtsi., 2012). Érdekes módon

mi azt tapasztaltuk, hogy az IL-1 β szekréció THP-1 makrofágokban független volt a pszeudohifák jelenlététől, ugyanis 24 órás inkubációt követően a csak élesztő formában szaporodó *C. metapsilosis* is indukálta a citokin szekrécióját; továbbá, egy hiperfilamentáló *C. parapsilosis* mutáns törzs a vad típushoz hasonló mértékben indukálta az IL-1 β szekrécióját. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy nem a micéliumok fizikai jelenléte fontos az IL-1 β termelés indukciója szempontjából. A pszeudohifa képzéssel járó változások, például az egyes sejtalkomponensek megváltozott expressziója *C. parapsilosis*-ban kevéssé ismertek; a közelmúltban publikált eredményeink szerint azonban *C. parapsilosis* makrofágok általi fagocitózisának sebessége független a pszeudohifák hosszától, ami arra utal, hogy az immunrendszer nem különbözteti meg az élesztősejteket és a pseudomicéliumokat (Toth és mtsi., 2014b).

Miután kimutattuk, hogy - bár jóval kisebb mértékben, mint a *C. albicans* - a *C. parapsilosis* is indukálja az IL-1 β szekrécióját, kíváncsiak voltunk a két fajjal történő stimuláció esetén hasonló módon képződik-e az érett IL-1 β fehérje. A *C. albicans* által indukált IL-1 β termelésért makrofágokban és dendritikus sejtekben NLRP3 inflammaszóma aktivációja felelős (Gross és mtsi., 2009; Joly és mtsi., 2009). Eredményeink szerint THP-1 sejtekben az IL-1 β szekréció mind a *C. parapsilosis*, mind a *C. albicans* esetében kaszpáz-1-, kaszpáz-8-, ASC- és NLRP3-függő. Ugyan a kaszpáz-8 képes a pro-IL-1 β hasítására az inflammaszómától független útvonalon is (Gurung és Kanneganti, 2015), eredményeink azt bizonyítják, hogy THP-1 sejtekben ez az útvonal nem játszik szerepet az IL-1 β képződésében sem *C. parapsilosis*, sem *C. albicans* stimuláció esetén; az ASC és NLRP3 deficiens sejtekben ugyanis elenyésző mennyiségű IL-1 β szekréciót tapasztaltunk. Ez ugyanakkor azt is bizonyítja, hogy egyéb, alternatív pro-IL-1 β aktivációs útvonalak sem játszanak szerepet a *Candida* fajok által indukált IL-1 β szekrécióban THP-1 makrofágokban. A továbbiakban megvizsgáltuk a mintázatfelismerő receptorok szerepét a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* által indukált IL-1 β termelésben. Makrofágokban a *C. albicans* által kiváltott IL-1 β szekréció Dectin-1- és TLR2-függő (Hise és mtsi., 2009), THP-1 sejtekben azonban a Dectin-1 szerepét nem tudtuk vizsgálni a receptor alacsony szintű expressziója miatt. A TLR2 és TLR4 blokkolása esetén azonban azt tapasztaltuk, hogy ezek a receptorok szerepet játszanak a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* által indukált IL-1 β termelésben. Továbbá, eredményeink megerősítik a Syk kináz központi szerepét az inflammaszóma aktiváció során (Gross és mtsi., 2009). Érdekes módon, míg a TLR4 és TLR2 blokkolása esetén ugyanolyan mértékű csökkenést

tapasztaltunk a *C. parapsilosis*-szal és *C. albicans*-szal stimulált sejtek által szekretált IL-1 β szintjében, a Syk specifikus gátlása esetén a *C. albicans* által indukált pro-IL-1 β és IL-1 β termelés nagyobb mértékben csökkent a *C. parapsilosis* által kiváltott IL-1 β termeléshez viszonyítva. Noha a Syk kináz elsősorban ITAM-ot tartalmazó receptorokkal asszociál (Mocsai és mtsi., 2010), több tanulmány is beszámol a Syk TLR-okhoz kapcsolt aktivációjáról. Kimutatták, hogy egér makrofágokban bizonyos TLR ligandok Syk foszforilációt indukálnak (Lin és mtsi., 2010), míg neutrofilekben az LPS kezelés TLR4-Syk komplex kialakulását eredményezi (Lu és mtsi., 2012), THP-1 sejtekben pedig a TLR4 és Syk konstitutívan asszociált (Chaudhary és mtsi., 2007). Továbbá, egér makrofágokban a Syk blokkolása gátolja a TLR-indukált JNK aktivációt, nincs hatással azonban a p38 és ERK aktivációjára (Lin és mtsi., 2010). Ugyan THP-1 sejtekben nem vizsgáltuk a MAP kinázok szerepét a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* által kiváltott jeltovábbításban, mononukleáris sejtekkel végzett kísérleteink alapján a JNK fontosabb szerepet játszik a *C. albicans*, mint a *C. parapsilosis* által indukált citokin termelésben. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy ugyan a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* is aktiválja a Syk kinázt a gazdasejtekben, az aktiváció mértéke és a további szignalizációs útvonalak eltérőek lehetnek. A Syk aktivációért felelős PRR-ok azonosítása azonban még tisztázásra vár; a továbbiakban primer humán makrofágok felhasználásával tervezzük a további PRR-ok (mannóz receptor, Dectin-1, Dectin-2, TLR-ok stb.) szerepének pontosabb vizsgálatát a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* felismerése, illetve az inflammaszóma aktiváció során.

Az NLRP3 inflammaszóma aktivációjának pontos mechanizmusa jelenleg még nem tisztázott. Kimutatták azonban, hogy a ROS intracelluláris felhalmozódása, a sejten belüli K⁺ koncentráció csökkenése, valamint a lizoszomális katepszin B citoplazmába való kiszabadulása szorosan összekapcsolódik a *C. albicans* által indukált kaszpáz-1 aktivációval (Joly és Sutterwala, 2010). A ROS termelés és az inflammaszóma aktiváció kapcsolatát számos tanulmány vizsgálta, és noha bizonyított, hogy a ROS termelés gátlása a legtöbb esetben gátolja a kaszpáz-1 aktivációt, az e mögött meghúzódó mechanizmus intenzív vita tárgyát képezi (Rubartelli és mtsi., 2011). Kimutatták például, hogy NADPH oxidáz deficiens egér makrofágokban, illetve CGD-ben szenvedő betegeknél (akiknél fagocitákban NADPH-oxidáz mutáció miatt defektív ROS termelés figyelhető meg) nem károsodott az inflammaszóma aktiváció (Hornung és mtsi., 2008; Meissner és mtsi., 2010). A képet tovább komplikálja, hogy ugyan fagocitákban a ROS fő forrása a NADPH-oxidáz, a mitokondriumból felszabaduló oxigéngyökök is szerepet játszhatnak az inflammaszóma

aktivációjában (Zhou és mtsi., 2011). Újabb tanulmányok pedig arra utalnak, hogy nem maga a ROS jelenléte, hanem az emelkedett ROS koncentráció által indukált antioxidáns válasz szükséges az inflammaszóma aktivációjához (Rubartelli és mtsi., 2011). Eredményeink szerint a *C. albicans* néhány óra alatt intenzív ROS termelést indukált THP-1 makrofágokban, ellentétben a *C. parapsilosis*-szal. Érdekes módon azonban ezt a különbséget csak 1:1 *Candida*:THP-1 fertőzési arány esetén figyeltük meg, míg 10:1 arány esetén sem a *C. albicans*, sem a *C. parapsilosis* nem indukált ROS termelést. Ezek az adatok megerősíti Wellington és munkatársai eredményeit, akik kimutatták, hogy a *C. albicans* gátolja a ROS termelést fagocitákban (Wellington és mtsi., 2009). Ennek ellenére a 10:1 arányú *C. albicans* fertőzésnél is intenzív IL-1 β szekréciót tapasztaltunk THP-1 sejtekben, ami megkérdőjelezi a ROS termelés szerepét az inflammaszóma aktiváció során. Nem vizsgáltuk azonban az antioxidáns válaszban szerepet játszó molekulák (pl. glutation, szuperoxid-diszmutáz) expresszióját, így lehetséges, hogy a 10:1 fertőzési arány esetén az antioxidáns válasz indukciója megtörténik a ROS szuppressziót megelőzően, ami megmagyarázná a normál IL-1 β szekréciót. További kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a NADPH-oxidáz gátlása jelentősen csökkenti mind az intracelluláris pro-IL-1 β , mind a szekretált IL-1 β szintjét *C. parapsilosis* és *C. albicans* stimulációt követően. A jövőben azonban részletesebb vizsgálatokra lesz szükség a NADPH-oxidáz és a ROS termelés inflammaszóma aktivációban betöltött szerepének tisztázása érdekében.

A katepszin B szerepe a *C. albicans* által indukált inflammaszóma aktivációban szintén kissé ellentmondásos: míg Gross és munkatársai azt tapasztalták, hogy dendritikus sejtekben a *C. albicans* által indukált IL-1 β termelés független a katepszin B-től (Gross és mtsi., 2009), a Joly és kollégái által készített tanulmány szerint makrofágokban a katepszin B gátlása csökkenti a *C. albicans* által indukált IL-1 β szekréciót (Joly és mtsi., 2009). Kimutatták továbbá, hogy a katepszin B aktivitásának gátlása egér makrofágokban jelentősen csökkenti a szilika kristályok által indukált, THP-1 sejtekben pedig a steril lizoszóma károsodás által kiváltott IL-1 β szekréciót (Hornung és mtsi., 2008). Mi ezzel szemben azt tapasztaltuk, hogy – noha a *C. albicans* szignifikáns mértékű lizoszómális katepszin B felszabadulást indukált THP-1 makrofágokban – a CA-074-Me katepszin B inhibitor nem volt hatással a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* által kiváltott IL-1 β szekrécióra. Ez az eredmény arra utal, hogy nem a *C. albicans* által okozott nagyobb lizoszóma károsodás felelős az intenzívebb inflammaszóma aktivációért, bár a jövőben ezt további kísérletekkel kell megerősíteni.

A fagocitózis gátlása esetén (cytochalasin D kezelés) az IL-1 β szint drasztikus csökkenését tapasztaltuk *C. albicans* stimulációt követően. Mások is kimutatták, hogy a *C. albicans* által indukált inflammaszóma aktiváció fagocitózis-függő (Joly és mtsi., 2009). Azt tapasztaltuk továbbá, hogy a THP-1 makrofágok szignifikánsan nagyobb mértékben fagocitálják a *C. albicans*, mint a *C. parapsilosis* sejtjeit, ami részben magyarázhatja a *C. parapsilosis* által indukált alacsonyabb szintű IL-1 β szekréciót. Egy, a közelmúltban publikált tanulmányban beszámoltunk róla, hogy a J774.1 egér makrofágok gyorsabban fagocitálják a *C. albicans*, mint a *C. parapsilosis* sejtjeit (Toth és mtsi., 2014b). Ezek az eredmények is arra utalnak, hogy a *C. albicans* és *C. parapsilosis* kölcsönhatása a fagociták felszínén expresszált receptorokkal különbözik egymástól. A fagocitózisban számos receptor szerepet játszik, melyek között találunk opszonizáció-függő (pl. Fc γ R, komplement receptor 3), és attól függetlenül funkcionáló (pl. Dectin-1, DC-SIGN) receptorokat is (Kerrigan és Brown, 2009). A *C. parapsilosis* és a *C. albicans* fagocitózist mediáló receptorok azonosítására – hasonlóan a felismerésben szerepet játszó molekulákkal – a jövőben kerülhet sor.

Az inflammaszóma aktiváció szorosan összefügg a különböző sejthalál útvonalakkal (a kaspáz-8 például mind az apoptózisban, mind az inflammaszóma aktivációban szerepet játszik (Gurung és Kanneganti, 2015)). Bizonyos patogénekről kimutatták, hogy makrofágokban apoptózist indukálnak, elkerülve az inflammaszóma aktivációt és gyulladásos választ (LaRock és Cookson, 2013). Az apoptózis/nekrózis vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy nem volt különbség az apoptotikus THP-1 sejtek számában *C. parapsilosis* és *C. albicans* stimulációt követően, azonban a *C. albicans* intenzívebb nekrózist indukált. Ennek azért is lehet fontos szerepe, mert a nekrózis során számos ún. DAMP (damage-associated molecular pattern, sérült sejtekből felszabaduló „veszély” molekula) is a környezetbe kerül, amelyek szerepet játszhatnak az inflammaszóma aktivációban (Romani, 2011). Így lehetséges, hogy a *C. albicans* által kiváltott intenzív inflammaszóma aktiváció pozitív visszacsatolás eredménye, amely azonban nem áll fenn *C. parapsilosis* fertőzés esetén. Továbbá, a kaspáz-1 aktiváció piroptózishoz is vezethet (programozott gyulladásos sejthalál), amelyről bizonyították, hogy fontos szerepe van *C. albicans* fertőzés során (Wellington és mtsi., 2014). Azt, hogy a *C. parapsilosis* indukál-e piroptózist makrofágokban, jelenleg vizsgáljuk laboratóriumunkban.

Összességében tehát elmondhatjuk, hogy ugyan a *C. parapsilosis* is képes inflammaszóma aktivációt kiváltani makrofágokban, ennek mértéke eltölp a *C. albicans* által indukált IL-

1 β szekréció mellett. Bár az IL-1 β termelés különbségének pontos okát még nem sikerült azonosítanunk, eredményeink alapján valószínű, hogy számos tényező hozzájárul a *C. parapsilosis* által indukált alacsony szintű IL-1 β szekrécióhoz. Ugyan az IL-1 β mRNS és a pro-IL-1 β szintjében nem találtunk különbséget THP-1 sejtekben *C. parapsilosis*-szal és *C. albicans*-szal történő stimulációt követően, a mononukleáris sejtekben megfigyelt eltérő IL-1 β termelés arra utal, hogy a két faj által indukált 1. szignál (vagyis az organizmusok felismerése) is különböző lehet. Továbbá, a fagocitózis és ROS termelés esetén látott különbségek azt valószínűsítik, hogy az inflammaszóma aktivációs szignál (2. szignál) is gyengébb *C. parapsilosis* fertőzés esetén. Nagyon érdekes kérdés, hogy a *C. parapsilosis* képes lehet-e az inflammaszóma aktivációt aktívan gátolni a gazdasejtekben. Bakteriális patogénekről számos esetben kimutatták, hogy képesek az inflammaszóma aktiváció gátlására különböző mechanizmusokon keresztül (Ulland és mtsi., 2015); gombák esetén azonban egyelőre még nem írtak le ilyen túlélési stratégiát.

Akár az inflammaszóma aktív gátlása, akár az aktivációs szignálok hiánya okozza azonban az alacsony szintű IL-1 β szekréciót *C. parapsilosis* fertőzés esetén, ez mindenképpen nagy jelentőséggel bír immunológiai szempontból. Az IL-1 β többek között fontos szerepet játszik a Th17 sejtek differenciációjában is, így hiánya a T-sejtes immunválaszt nagymértékben befolyásolja. Korábbi eredményeink szerint a *C. parapsilosis* a *C. albicans*-nál kisebb mértékű IL-17 termelést indukál, amiért feltehetően a gyengébb inflammaszóma aktiváció felelős - a jövőben különböző *in vivo* vizsgálatok igazolhatják ezt a hipotézist. Továbbá, az inflammaszóma aktiváció hiánya *C. parapsilosis* fertőzés esetén részben magyarázhatja az újszülöttek fokozott fogékonyságát is a fertőzéssel szemben. Immunkompetens egyénekben valószínűleg nem okoz problémát az IL-1 β alacsony szintje, mivel egyéb effektor mechanizmusok elegendőek lehetnek a *C. parapsilosis* fertőzés kontrolljához. Csecsemőkben azonban, amint az már fentebb is említésre került, a természetes immunitás effektor mechanizmusai még fejletlenek, így nem tudják eliminálni a fertőzést. Azonban, ha a *C. parapsilosis* nem indukál elég intenzív „veszély” szignálokat a szervezetben, az végső soron oda vezethet, hogy szabadon szaporodhat erős gyulladás kiváltása nélkül. Ebben az esetben lehetséges, hogy mire a gyulladásos válasz indukciója megtörténik, az organizmus már túl nagy számban van jelen a szervezetben, ami megnehezíti a fertőzés leküzdését.

7. Összefoglalás

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 (Pfaller és mtsi., 2011). Továbbá, míg a *C. albicans* által okozott fertőzések száma hasonló gyermekek és felnőttek esetében, a *C. parapsilosis* fiatakorúakban, különösen újszülöttekben, sokkal gyakrabban fordul elő (Pammi és mtsi., 2013). Noha az utóbbi években intenzíven vizsgálják az invazív candidiasis patogenezisét, a tanulmányok túlnyomó többsége a *C. albicans* által kiváltott immunválasz kutatására irányul, míg a *C. parapsilosis* által okozott fertőzések immunológiai hátteréről jelenleg kevés ismeretünk van.

Munkánk során célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a *C. parapsilosis* által indukált Th sejt polarizációt, továbbá a patogén immunológiai felismerését és az azt követő jeltovábbítást humán perifériás vérből izolált mononukleáris sejtekben. Illetve, miután azt tapasztaltuk, hogy jelentős különbség van a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* által indukált IL-1 β szekrécióban, részletesen vizsgáltuk a két faj által kiváltott inflammaszóma aktivációt. Ezen célkitűzések alapján elvégzett vizsgálataink főbb eredményei a következők:

1. Humán perifériás vérből izolált mononukleáris sejtek *C. parapsilosis* és *C. albicans* fertőzésre adott válaszreakciójának összehasonlítása

1.1. A *C. parapsilosis* és a *C. albicans* által indukált T helper sejt polarizáció összehasonlítása

Először megvizsgáltuk a hővel előlt *C. parapsilosis* és *C. albicans* által indukált gyulladásos citokin termelést humán perifériás vérből izolált mononukleáris sejtekben. Azt tapasztaltuk, hogy a *C. parapsilosis*-szal stimulált sejtek hasonló mértékű TNF α és IL-6, valamint mintegy 20 %-kal alacsonyabb szintű IL-1 β termelést mutattak a *C. albicans*-szal fertőzött sejtekhez képest. A Th 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.

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

A továbbiakban megvizsgáltuk a Dectin-1, TLR4 és TLR2 receptorok szerepét a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* által indukált citokin termelésben. A Dectin-1 receptor gátlása esetén mind a *C. parapsilosis*-szal, mind a *C. albicans*-szal stimulált mononukleáris sejtek jelentősen csökkent citokin (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN γ) termelést mutattak, jelezve, hogy ez a receptor mindkét faj felismerésében fontos szerepet játszik. Ugyanakkor, míg a TLR4 blokkolása nem volt hatással a mononukleáris sejtek citokin termelésére, eredményeink alapján a TLR2 szerepet játszik az IL-1 β és IL-6 indukációjában. Nem tapasztaltunk azonban jelentős különbséget a *C. parapsilosis*-szal és *C. albicans*-szal stimulált mononukleáris sejtek citokin termelésében a receptor 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 különbségéért. A potenciális további receptorok szerepének vizsgálata a *C. parapsilosis* felismerésében jelenleg folyik laboratóriumunkban.

1.3. A *C. parapsilosis* felismerését követő intracelluláris jelátvitel 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-1 β , IL-6, IL-10, IFN γ) termelését, jelezve, hogy mindhárom enzim szerepet játszik a két *Candida* faj felismerését követő jelátvitelben. Továbbá, míg a p38 és ERK inhibíció a *C. parapsilosis*-szal stimulált minták citokin (TNF α , IL-1 β , IL-6) termelését csökkentette nagyobb mértékben, a JNK gátlása a *C. albicans*-szal stimulált minták citokin szekréciójára volt nagyobb hatással. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az egyes MAP kinázok citokin indukcióban betöltött szerepe különbözik *C. parapsilosis* és *C. albicans* stimuláció esetén.

2. A *C. parapsilosis* és a *C. albicans* által indukált inflammaszóma aktiváció összehasonlítása

A mononukleáris sejtek élő *C. parapsilosis*-szal és *C. albicans*-szal történő stimulációja során azt tapasztaltuk, hogy míg mindkét faj azonos mértékben indukálta a TNF α és IL-6 termelést, a *C. parapsilosis* jelentősen alacsonyabb IL-1 β szekréciót váltott ki, mint a *C. albicans*. A továbbiakban ennek a különbségnek a hátterében meghúzódó lehetséges mechanizmusokat vizsgáltuk részletesen. Az IL-1 β érett formájának kialakulása monocitákban és makrofágokban kaszpáz-1-, illetve inflammaszóma-aktiváció-függő. Míg monocitákban a kaszpáz-1 folyamatosan aktív, makrofágokban először a pro-kaspáz-1 hasítása szükséges az enzim aktivációjához. Kísérleteink során PMA-kezelt THP-1 makrofágokban vizsgáltuk a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* által indukált inflammaszóma aktivációt. Azt tapasztaltuk, hogy a *C. parapsilosis* csak hosszú inkubáció után és viszonylag nagy sejtszám esetén indukálta az IL-1 β szekréciót, ellentétben a *C. albicans*-szal, amely már néhány óra elteltével jelentős IL-1 β termelést váltott ki. Noha *C. albicans* esetén a hifaképzésnek fontos szerepet tulajdonítanak az inflammaszóma aktiváció során, érdekes módon eredményeink szerint az IL-1 β szekréció mértéke független volt a *C. parapsilosis* pszeudohifák jelenlététől. Továbbá, nem tapasztaltunk különbséget a THP-1 makrofágokban az IL-1 β mRNS és pro-IL-1 β szintjében *C. parapsilosis* és *C. albicans* stimulációt követően, ami arra utal, hogy a csökkent IL-1 β szekréció nem transzkripciós vagy translációs különbségek eredménye, hanem a pro-IL-1 β alacsony hatékonyságú aktivációjából adódik. Különböző inhibitorok alkalmazása segítségével kimutattuk, hogy mind a *C. parapsilosis*-szal, mind a *C. albicans*-szal stimulált THP-1 sejtekben hasonló

módon képződik az érett IL-1 β , és a folyamat kaszpáz-1-, kaszpáz-8-, Syk- és TLR4-függő. Az NLRP3 és ASC deficiens THP-1 sejtekkel folytatott kísérletek megerősítették, hogy az IL-1 β szekréció mindkét faj esetén NLRP3 inflammaszóma aktiváció-függő. Az NLRP3 inflammaszóma aktivációjában szerepet játszó három legfontosabb mechanizmus a reaktív oxigéngyökök képződése, a katepszin B lizoszómából történő felszabadulása, illetve az intracelluláris K⁺ koncentráció csökkenése. Eredményeink szerint az IL-1 β szekréció mind *C. parapsilosis*, mind *C. albicans* stimulációt követően K⁺-efflux függőnek bizonyult, a katepszin B gátlása azonban nem volt hatással a THP-1 sejtek IL-1 β termelésére, noha a *C. albicans* intenzívebb katepszin B felszabadulást indukált, mint a *C. parapsilosis*. Továbbá, a NADPH-oxidáz gátlása jelentősen csökkentette mind az intracelluláris pro-IL-1 β , mind a szekretált IL-1 β szintjét, jelezve a ROS lehetséges szerepét az inflammaszóma aktivációban. Ezt erősíti az az eredményünk is, miszerint a *C. albicans* intenzív ROS termelést indukált THP-1 makrofágokban, míg a *C. parapsilosis* a fertőzés első négy órájában egyáltalán nem indukálta a reaktív oxigéngyökök képződését. Ezen túlmenően kimutattuk, hogy az inflammaszóma aktiváció *C. albicans* fertőzés esetén fagocitózis-függő, és a THP-1 sejtek szignifikánsan nagyobb mértékben fagocitálják a *C. albicans*, mint a *C. parapsilosis* sejtjeit. Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy számos mechanizmus közrejátszik abban, hogy a *C. parapsilosis* alacsonyabb szintű IL-1 β szekréciót indukál, mint a *C. albicans*. Az inflammaszóma aktiváció vizsgálata laboratóriumunkban jelenleg is folyik, így reméljük, hogy a jövőben még pontosabb képet kaphatunk a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* által indukált gyulladásos válaszról.

Összességében elmondhatjuk, hogy jelentős különbségeket mutattunk ki a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* ellen kialakuló immunválaszban. Míg *C. albicans* intenzív inflammaszóma aktivációt és 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. Ugyan számos további vizsgálatra van szükség az ezen különbségek mögött meghúzódó molekuláris mechanizmusok tisztázása érdekében, eredményeink felhívják a figyelmet a különböző *Candida* fajok által indukált védekezési mechanizmusok tanulmányozásának a fontosságára a *Candida* fertőzések immunológiai hátterének kutatása során.

8. Summary

Invasive *Candida* infections pose a serious health problem worldwide, especially among immunocompromised patients. Although, the most common cause of invasive candidiasis is *C. albicans*, the prevalence of infections due to non-*albicans* species has been increasing during the last decades. One of the most clinically relevant species is *C. parapsilosis*, causing 17 % of invasive candidiasis cases worldwide (Pfaller és mtsi., 2011). Furthermore, while the prevalence of *C. albicans* infection is similar among adults and children, *C. parapsilosis* is much more commonly found in young individuals, especially in neonates (Pammi és mtsi., 2013). Although, the pathogenesis of invasive candidiasis has been intensively studied during the last years, the majority of studies focuses on the immune response induced by *C. albicans*, while we have little information about the immunological background of *C. parapsilosis* infections.

During this study, our aim was to examine the T-cell polarization induced by *C. parapsilosis*, along with the immunological recognition of the species and the intracellular signaling following the recognition of *C. parapsilosis* in human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Furthermore, after the finding that there is a significant difference in the induction of IL-1 β following *C. albicans* and *C. parapsilosis* stimulation, we investigated the details of inflammasome activation induced by the two species. The main results of our study are the following:

1. Comparison of immune responses in human PBMCs following stimulation with *C. parapsilosis* and *C. albicans*

1.1. Comparison of T-cell polarization induced by *C. parapsilosis* and *C. albicans*

First, we compared the pro-inflammatory cytokine production in PBMCs following stimulation with heat-killed *C. parapsilosis* and *C. albicans*. We found that PBMCs stimulated with *C. parapsilosis* produced similar quantities of TNF α and IL-6, and approximately 20 % less IL-1 β compared to *C. albicans*-stimulated cells. In case of Th-derived cytokines, we found that *C. parapsilosis* induced significantly lower IFN γ , and higher IL-10 secretion after 48 h compared to *C. albicans*. Furthermore, *C. parapsilosis* stimulated significantly lower IL-17 and IL-22 production after 7 days. Flow cytometric

analysis following intracellular cytokine staining confirmed that there was a lower number of IL-17-producing cells in the CD4⁺ Th population. These results suggest that while *C. albicans* induces a Th1/Th17-dominant Th polarization, *C. parapsilosis* skews the Th balance to the Th2/Treg direction.

1.2. Identification of receptors involved in the immune recognition of *C. parapsilosis*

We next examined the role of Dectin-1, TLR4 and TLR2 in the cytokine production induced by *C. parapsilosis* and *C. albicans*. Following the blocking of Dectin-1, both *C. parapsilosis*- and *C. albicans*-stimulated PBMCs showed significantly lower cytokine (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN γ) production, indicating that the receptor plays an important role in the recognition of both species. On the other hand, while inhibition of TLR4 did not affect the cytokine production of PBMCs, our results show that TLR2 is involved in the induction of IL-1 β and IL-6. However, there was no difference in the cytokine production of *C. parapsilosis*- and *C. albicans*-stimulated PBMCs during receptor blocking (although we detected a greater decrease in the levels of TNF α , IL-1 β , IL-6 and IL-10 following the inhibition of Dectin-1 in *C. parapsilosis*-stimulated cells), indicating that other receptors may be responsible for the different cytokine patterns induced by the two species. Our group is currently working on the identification of other receptors that might participate in the recognition of *C. parapsilosis*.

1.3. Examination of intracellular signaling following the recognition of *C. parapsilosis*

The MAPK cascade plays a role in signal transduction following the activation of both TLRs and CLRs, but the role of individual MAP kinases in signaling is less clear. We found that inhibition of the three classical MAP kinases (p38, ERK, JNK) resulted in decreased TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN γ production in both *C. parapsilosis*- and *C. albicans*-stimulated PBMCs, indicating that all three enzymes are involved in the signal transduction following the recognition of *C. parapsilosis* and *C. albicans*. Furthermore, while the inhibition of p38 and ERK resulted in a greater decrease in the levels of cytokines (TNF α , IL-1 β , IL-6) in *C. parapsilosis*-stimulated cells, blocking the activity of JNK caused a more pronounced decrease in the cytokine secretion of *C. albicans*-stimulated cells. These results suggest that there is a difference in the relative contribution

of p38, ERK and JNK to the resulting cytokine responses in *C. parapsilosis*- and *C. albicans*-stimulated PBMCs.

2. Comparison of inflammasome activation induced by *C. parapsilosis* and *C. albicans*

We next examined the production of cytokines in PBMCs stimulated with live *C. parapsilosis* and *C. albicans*. We found that while both species induced similar TNF α and IL-6 production, PBMCs infected with *C. parapsilosis* produced significantly less IL-1 β compared to *C. albicans*-stimulated cells. Next we examined the potential mechanisms underlying this difference. The production of mature IL-1 β in monocytes and macrophages is dependent on caspase-1 and the activation of the inflammasome; however, while caspase-1 is constitutively active in monocytes, in macrophages it is activated by the cleavage of pro-caspase-1 during inflammasome activation. During our study, we examined the activation of the inflammasome in PMA-treated THP-1 macrophages. We found that *C. parapsilosis* induced the secretion of IL-1 β only after a relatively long incubation and when added in a high dose, while *C. albicans* induced high levels of IL-1 β already after a few hours. Although, hyphae formation has been shown to play an important role in inflammasome activation by *C. albicans*, our results show that secretion of IL-1 β is independent of the presence of pseudohyphae following stimulation with *C. parapsilosis*. Furthermore, we found that the level of IL-1 β mRNA and pro-IL-1 β in THP-1 cells was similar following stimulation with *C. albicans* or *C. parapsilosis*, indicating that the difference in secreted IL-1 β levels originates from the differential processing of IL-1 β protein. Using different chemical inhibitors, we showed that mature IL-1 β is produced by a similar mechanism in *C. parapsilosis*- and *C. albicans*-stimulated THP-1 cells, and the process is dependent on caspase-1, caspase-8, Syk and TLR4. Using NLRP3- and ASC-deficient THP-1 macrophages, we confirmed that IL-1 β secretion in response to *C. parapsilosis* and *C. albicans* is NLRP3 inflammasome-dependent. The three most important mechanisms involved in the activation of the NLRP3 inflammasome in macrophages is the production of ROS, release of lysosomal cathepsin B and the decrease of intracellular K⁺ concentration. Our results show that IL-1 β secretion following *C. parapsilosis* and *C. albicans* stimulation is K⁺-efflux-dependent. However, inhibition of cathepsin B did not affect the production of IL-1 β , although *C. albicans* induced higher cathepsin B release in THP-1 cells compared to *C. parapsilosis*. Furthermore, inhibition of

NADPH-oxidase significantly decreased the levels of both intracellular pro-IL-1 β and secreted IL-1 β in THP-1 cells, indicating the possible role of ROS in inflammasome activation. Furthermore, *C. albicans* induced significant ROS production in THP-1 cells, while *C. parapsilosis* did not induce the generation of ROS during the first four hours of infection. We also showed that the secretion of IL-1 β is dependent on phagocytosis, and that *C. albicans* cells are phagocytosed more rapidly by THP-1 macrophages than *C. parapsilosis* cells. Taken together, our results suggest that multiple mechanisms play a role in the relatively low IL-1 β production during *C. parapsilosis* infection. We are currently working on further details of inflammasome activation induced by *C. parapsilosis* and *C. albicans*, and we are hoping that future experiments will improve our understanding of the inflammatory response induced by the two *Candida* species.

In conclusion, we have shown that there are significant differences in the immune response induced by *C. parapsilosis* and *C. albicans*. While *C. albicans* induces rapid inflammasome activation and a Th1/Th17-type T-cell polarization, the immune response against *C. parapsilosis* is characterized by lower IL-1 β secretion and a more tolerogenic Th2/Treg-dominant Th response. Although, further experiments are needed to explain the molecular background of these differences, our findings highlight the importance of studies focusing on different *Candida* species rather than *C. albicans* alone when investigating the immunity against these pathogens.

9. Irodalomjegyzék

- Acosta-Rodriguez, E V, Rivino, L, Geginat, J, Jarrossay, D, Gattorno, M, Lanzavecchia, A, . . . Napolitani, G (2007). "Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells." Nat Immunol **8**(6): 639-646.
- Arendrup, M C (2010). "Epidemiology of invasive candidiasis." Curr Opin Crit Care **16**(5): 445-452.
- Arendrup, M C, Bruun, B, Christensen, J J, Fuursted, K, Johansen, H K, Kjaeldgaard, P, . . . Truberg, K (2011). "National surveillance of fungemia in Denmark (2004 to 2009)." J Clin Microbiol **49**(1): 325-334.
- Asmundsdottir, L R, Erlendsdottir, H, Gottfredsson, M (2013). "Nationwide study of candidemia, antifungal use, and antifungal drug resistance in Iceland, 2000 to 2011." J Clin Microbiol **51**(3): 841-848.
- Asmundsdottir, L R, Erlendsdottir, H, Haraldsson, G, Guo, H, Xu, J, Gottfredsson, M (2008). "Molecular epidemiology of candidemia: evidence of clusters of smoldering nosocomial infections." Clin Infect Dis **47**(2): e17-24.
- Azie, N, Neofytos, D, Pfaller, M, Meier-Kriesche, H U, Quan, S P, Horn, D (2012). "The PATH (Prospective Antifungal Therapy) Alliance(R) registry and invasive fungal infections: update 2012." Diagn Microbiol Infect Dis **73**(4): 293-300.
- 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.
- Balish, E, Wagner, R D, Vazquez-Torres, A, Pierson, C, Warner, T (1998). "Candidiasis in interferon-gamma knockout (IFN-gamma-/-) mice." J Infect Dis **178**(2): 478-487.
- Bauernfeind, F, Bartok, E, Rieger, A, Franchi, L, Nunez, G, Hornung, V (2011). "Cutting edge: reactive oxygen species inhibitors block priming, but not activation, of the NLRP3 inflammasome." J Immunol **187**(2): 613-617.
- Bellocchio, S, Montagnoli, C, Bozza, S, Gaziano, R, Rossi, G, Mambula, S S, . . . Romani, L (2004). "The contribution of the Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens in vivo." J Immunol **172**(5): 3059-3069.
- Beno, D W, Stover, A G, Mathews, H L (1995). "Growth inhibition of *Candida albicans* hyphae by CD8+ lymphocytes." J Immunol **154**(10): 5273-5281.
- Bertini, A, De Bernardis, F, Hensgens, L A, Sandini, S, Senesi, S, Tavanti, A (2013). "Comparison of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* adhesive properties and pathogenicity." Int J Med Microbiol **303**(2): 98-103.
- Bi, L, Gojestani, S, Wu, W, Hsu, Y M, Zhu, J, Ariizumi, K, Lin, X (2010). "CARD9 mediates dectin-2-induced I κ B kinase ubiquitination leading to activation of NF- κ B in response to stimulation by the hyphal form of *Candida albicans*." J Biol Chem **285**(34): 25969-25977.
- Biondo, C, Malara, A, Costa, A, Signorino, G, Cardile, F, Midiri, A, . . . Beninati, C (2012). "Recognition of fungal RNA by TLR7 has a nonredundant role in host defense against experimental candidiasis." Eur J Immunol **42**(10): 2632-2643.
- Black, A, Bhaumik, S, Kirkman, R L, Weaver, C T, Randolph, D A (2012). "Developmental regulation of Th17-cell capacity in human neonates." Eur J Immunol **42**(2): 311-319.
- Borghi, M, Renga, G, Puccetti, M, Oikonomou, V, Palmieri, M, Galosi, C, . . . Romani, L (2014). "Antifungal Th Immunity: Growing up in Family." Front Immunol **5**: 506.
- Brissaud, O, Guichoux, J, Harambat, J, Tandonnet, O, Zaoutis, T (2012). "Invasive fungal disease in PICU: epidemiology and risk factors." Ann Intensive Care **2**(1): 6.
- Brown, G D (2011). "Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes." Annu Rev Immunol **29**: 1-21.

- Brown, G D, Denning, D W, Gow, N A, Levitz, S M, Netea, M G, White, T C (2012). "Hidden killers: human fungal infections." Sci Transl Med **4**(165): 165rv113.
- Brown, G D, Gordon, S (2001). "Immune recognition. A new receptor for beta-glucans." Nature **413**(6851): 36-37.
- Brown, G D, Herre, J, Williams, D L, Willment, J A, Marshall, A S, Gordon, S (2003). "Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans." J Exp Med **197**(9): 1119-1124.
- Bryan, N B, Dorfleutner, A, Rojanasakul, Y, Stehlik, C (2009). "Activation of inflammasomes requires intracellular redistribution of the apoptotic speck-like protein containing a caspase recruitment domain." J Immunol **182**(5): 3173-3182.
- Bugli, F, Cacaci, M, Martini, C, Torelli, R, Posteraro, B, Sanguinetti, M, Paroni Sterbini, F (2013). "Human monoclonal antibody-based therapy in the treatment of invasive candidiasis." Clin Dev Immunol **2013**: 403121.
- Bustamante, B, Martins, M A, Bonfietti, L X, Szeszs, M W, Jacobs, J, Garcia, C, Melhem, M S (2014). "Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* isolates from bloodstream infections in Lima, Peru." J Med Microbiol **63**(Pt 6): 855-860.
- Butler, G, Rasmussen, M D, Lin, M F, Santos, M A, Sakthikumar, S, Munro, C A, . . . Cuomo, C A (2009). "Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes." Nature **459**(7247): 657-662.
- Carmona, E M, Limper, A H (2011). "Update on the diagnosis and treatment of *Pneumocystis pneumonia*." Ther Adv Respir Dis **5**(1): 41-59.
- Carta, S, Tassi, S, Pettinati, I, Delfino, L, Dinarello, C A, Rubartelli, A (2011). "The rate of interleukin-1beta secretion in different myeloid cells varies with the extent of redox response to Toll-like receptor triggering." J Biol Chem **286**(31): 27069-27080.
- Chaudhary, A, Fresquez, T M, Naranjo, M J (2007). "Tyrosine kinase Syk associates with toll-like receptor 4 and regulates signaling in human monocytic cells." Immunol Cell Biol **85**(3): 249-256.
- Chen, S, Sun, B (2013). "Negative regulation of NLRP3 inflammasome signaling." Protein Cell **4**(4): 251-258.
- Cheng, S C, Joosten, L A, Kullberg, B J, Netea, M G (2012). "Interplay between *Candida albicans* and the mammalian innate host defense." Infect Immun **80**(4): 1304-1313.
- Cheng, S C, van de Veerdonk, F L, Lenardon, M, Stoffels, M, Plantinga, T, Smeekens, S, . . . Netea, M G (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**(2): 357-366.
- Chirico, G, Maccario, R, Montagna, D, Chiara, A, Gasparoni, A, Rondini, G (1990). "Natural killer cell activity in preterm infants: effect of intravenous immune globulin administration." J Pediatr **117**(3): 465-466.
- Chirico, G, Marconi, M, De Amici, M, Gasparoni, A, Mingrat, G, Chiara, A, . . . Ugazio, A G (1985). "Deficiency of neutrophil bactericidal activity in term and preterm infants. A longitudinal study." Biol Neonate **47**(3): 125-129.
- Cole, G T, Halawa, A A, Anaissie, E J (1996). "The role of the gastrointestinal tract in hematogenous candidiasis: from the laboratory to the bedside." Clin Infect Dis **22 Suppl 2**: S73-88.
- Conti, H R, Peterson, A C, Brane, L, Huppler, A R, Hernandez-Santos, N, Whibley, N, . . . Gaffen, S L (2014). "Oral-resident natural Th17 cells and gammadelta T cells control opportunistic *Candida albicans* infections." J Exp Med **211**(10): 2075-2084.
- Conti, H R, Shen, F, Nayyar, N, Stocum, E, Sun, J N, Lindemann, M J, . . . Gaffen, S L (2009). "Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis." J Exp Med **206**(2): 299-311.
- Dagenais, T R, Keller, N P (2009). "Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis." Clin Microbiol Rev **22**(3): 447-465.

- De Luca, A, Montagnoli, C, Zelante, T, Bonifazi, P, Bozza, S, Moretti, S, . . . Romani, L (2007). "Functional yet balanced reactivity to *Candida albicans* requires TRIF, MyD88, and IDO-dependent inhibition of Rorc." J Immunol **179**(9): 5999-6008.
- Dejima, T, Shibata, K, Yamada, H, Hara, H, Iwakura, Y, Naito, S, Yoshikai, Y (2011). "Protective role of naturally occurring interleukin-17A-producing gammadelta T cells in the lung at the early stage of systemic candidiasis in mice." Infect Immun **79**(11): 4503-4510.
- Destin, K G, Linden, J R, Laforce-Nesbitt, S S, Bliss, J M (2009). "Oxidative burst and phagocytosis of neonatal neutrophils confronting *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*." Early Hum Dev **85**(8): 531-535.
- Dinarello, C A (2004). "Unraveling the NALP-3/IL-1beta inflammasome: a big lesson from a small mutation." Immunity **20**(3): 243-244.
- Dinarello, C A (2011). "A clinical perspective of IL-1beta as the gatekeeper of inflammation." Eur J Immunol **41**(5): 1203-1217.
- Dominguez de Maria, P, Sanchez-Montero, J M, Sinisterra, J V, Alcantara, A R (2006). "Understanding *Candida rugosa* lipases: an overview." Biotechnol Adv **24**(2): 180-196.
- Dostert, C, Petrilli, V, Van Bruggen, R, Steele, C, Mossman, B T, Tschopp, J (2008). "Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica." Science **320**(5876): 674-677.
- Dotis, J, Prasad, P A, Zaoutis, T, Roilides, E (2012). "Epidemiology, risk factors and outcome of *Candida parapsilosis* bloodstream infection in children." Pediatr Infect Dis J **31**(6): 557-560.
- Ericsson, J, Chryssanthou, E, Klingspor, L, Johansson, A G, Ljungman, P, Svensson, E, Sjolín, J (2013). "Candidaemia in Sweden: a nationwide prospective observational survey." Clin Microbiol Infect **19**(4): E218-221.
- Eyerich, K, Foerster, S, Rombold, S, Seidl, H P, Behrendt, H, Hofmann, H, . . . Traidl-Hoffmann, C (2008). "Patients with chronic mucocutaneous candidiasis exhibit reduced production of Th17-associated cytokines IL-17 and IL-22." J Invest Dermatol **128**(11): 2640-2645.
- Ferwerda, B, Ferwerda, G, Plantinga, T S, Willment, J A, van Sriel, A B, Venselaar, H, . . . Netea, M G (2009). "Human dectin-1 deficiency and mucocutaneous fungal infections." N Engl J Med **361**(18): 1760-1767.
- Fidel, P L, Jr., Vazquez, J A, Sobel, J D (1999). "*Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*." Clin Microbiol Rev **12**(1): 80-96.
- Fradin, C, De Groot, P, MacCallum, D, Schaller, M, Klis, F, Odds, F C, Hube, B (2005). "Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood." Mol Microbiol **56**(2): 397-415.
- 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**(1): 117-121.
- Gacser, A, Stehr, F, Kroger, C, Kredics, L, Schafer, W, Nosanchuk, J D (2007a). "Lipase 8 affects the pathogenesis of *Candida albicans*." Infect Immun **75**(10): 4710-4718.
- Gacser, A, Trofa, D, Schafer, W, Nosanchuk, J D (2007b). "Targeted gene deletion in *Candida parapsilosis* demonstrates the role of secreted lipase in virulence." J Clin Invest **117**(10): 3049-3058.
- Gamaletsou, M N, Walsh, T J, Zaoutis, T, Pagoni, M, Kotsopoulou, M, Voulgarelis, M, . . . Sipsas, N V (2014). "A prospective, cohort, multicentre study of candidaemia in hospitalized adult patients with haematological malignancies." Clin Microbiol Infect **20**(1): O50-57.
- Gantner, B N, Simmons, R M, Canavera, S J, Akira, S, Underhill, D M (2003). "Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2." J Exp Med **197**(9): 1107-1117.
- Gantner, B N, Simmons, R M, Underhill, D M (2005). "Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments." EMBO J **24**(6): 1277-1286.

- Gillum, A M, Tsay, E Y, Kirsch, D R (1984). "Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations." Mol Gen Genet **198**(1): 179-182.
- Gladiator, A, LeibundGut-Landmann, S (2013). "Innate lymphoid cells: new players in IL-17-mediated antifungal immunity." PLoS Pathog **9**(12): e1003763.
- 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**(2): 521-525.
- Glocker, E O, Hennigs, A, Nabavi, M, Schaffer, A A, Woellner, C, Salzer, U, . . . Grimbacher, B (2009). "A homozygous CARD9 mutation in a family with susceptibility to fungal infections." N Engl J Med **361**(18): 1727-1735.
- Gringhuis, S I, den Dunnen, J, Litjens, M, van der Vlist, M, Wevers, B, Bruijns, S C, Geijtenbeek, T B (2009). "Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF-kappaB activation through Raf-1 and Syk." Nat Immunol **10**(2): 203-213.
- Gringhuis, S I, Kaptein, T M, Wevers, B A, Theelen, B, van der Vlist, M, Boekhout, T, Geijtenbeek, T B (2012). "Dectin-1 is an extracellular pathogen sensor for the induction and processing of IL-1beta via a noncanonical caspase-8 inflammasome." Nat Immunol **13**(3): 246-254.
- Gross, O, Poeck, H, Bscheider, M, Dostert, C, Hanneschlagel, N, Endres, S, . . . Ruland, J (2009). "Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence." Nature **459**(7245): 433-436.
- Guerin, M, Camougrand, N, Caubet, R, Zniher, S, Velours, G, Manon, S, . . . Cheyrou, A (1989). "The second respiratory chain of *Candida parapsilosis*: a comprehensive study." Biochimie **71**(8): 887-902.
- Guinea, J (2014). "Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia." Clin Microbiol Infect **20 Suppl 6**: 5-10.
- Gurung, P, Kanneganti, T D (2015). "Novel Roles for Caspase-8 in IL-1beta and Inflammasome Regulation." Am J Pathol **185**(1): 17-25.
- Hara, H, Saito, T (2009). "CARD9 versus CARMA1 in innate and adaptive immunity." Trends Immunol **30**(5): 234-242.
- Haraguchi, N, Ishii, Y, Morishima, Y, Yoh, K, Matsuno, Y, Kikuchi, N, . . . Hizawa, N (2010). "Impairment of host defense against disseminated candidiasis in mice overexpressing GATA-3." Infect Immun **78**(5): 2302-2311.
- Hardison, S E, Brown, G D (2012). "C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity." Nat Immunol **13**(9): 817-822.
- Hernandez-Santos, N, Gaffen, S L (2012). "Th17 cells in immunity to *Candida albicans*." Cell Host Microbe **11**(5): 425-435.
- Hess, J, Angel, P, Schorpp-Kistner, M (2004). "AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings." J Cell Sci **117**(Pt 25): 5965-5973.
- Hise, A G, Tomalka, J, Ganesan, S, Patel, K, Hall, B A, Brown, G D, Fitzgerald, K A (2009). "An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogen *Candida albicans*." Cell Host Microbe **5**(5): 487-497.
- Hope, W W, Walsh, T J, Denning, D W (2005). "The invasive and saprophytic syndromes due to *Aspergillus* spp." Med Mycol **43 Suppl 1**: S207-238.
- Hornung, V, Bauernfeind, F, Halle, A, Samstad, E O, Kono, H, Rock, K L, . . . Latz, E (2008). "Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization." Nat Immunol **9**(8): 847-856.
- Horvath, P, Nosanchuk, J D, Hamari, Z, Vagvolgyi, C, Gacser, A (2012). "The identification of gene duplication and the role of secreted aspartyl proteinase 1 in virulence." J Infect Dis **205**(6): 923-933.

- Hoving, J C, Wilson, G J, Brown, G D (2014). "Signalling C-type lectin receptors, microbial recognition and immunity." Cell Microbiol **16**(2): 185-194.
- Huang, W, Na, L, Fidel, P L, Schwarzenberger, P (2004). "Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice." J Infect Dis **190**(3): 624-631.
- Ishii, K J, Koyama, S, Nakagawa, A, Coban, C, Akira, S (2008). "Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections." Cell Host Microbe **3**(6): 352-363.
- Jaeger, M, van der Lee, R, Cheng, S C, Johnson, M D, Kumar, V, Ng, A, . . . Netea, M G (2015). "The RIG-I-like helicase receptor MDA5 (IFIH1) is involved in the host defense against *Candida* infections." Eur J Clin Microbiol Infect Dis.
- Janeway, C A, Jr. (1989). "Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **54 Pt 1**: 1-13.
- Jarvis, J N, Percival, A, Bauman, S, Pelfrey, J, Meintjes, G, Williams, G N, . . . Kozel, T R (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**(10): 1019-1023.
- Joly, S, Ma, N, Sadler, J J, Soll, D R, Cassel, S L, Sutterwala, F S (2009). "Cutting edge: *Candida albicans* hyphae formation triggers activation of the Nlrp3 inflammasome." J Immunol **183**(6): 3578-3581.
- Joly, S, Sutterwala, F S (2010). "Fungal pathogen recognition by the NLRP3 inflammasome." Virulence **1**(4): 276-280.
- Jouault, T, El Abed-El Behi, M, Martinez-Esparza, M, Breuilh, L, Trinel, P A, Chamaillard, M, . . . Poulain, D (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**(7): 4679-4687.
- Jouault, T, Ibata-Ombetta, S, Takeuchi, O, Trinel, P A, Sacchetti, P, Lefebvre, P, . . . Poulain, D (2003). "*Candida albicans* phospholipomannan is sensed through toll-like receptors." J Infect Dis **188**(1): 165-172.
- Kaech, S M, Cui, W (2012). "Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation." Nat Rev Immunol **12**(11): 749-761.
- Kawai, T, Akira, S (2006). "TLR signaling." Cell Death Differ **13**(5): 816-825.
- Kerrigan, A M, Brown, G D (2009). "C-type lectins and phagocytosis." Immunobiology **214**(7): 562-575.
- Kim, H S, Choi, E H, Khan, J, Roilides, E, Francesconi, A, Kasai, M, . . . Walsh, T J (2005). "Expression of genes encoding innate host defense molecules in normal human monocytes in response to *Candida albicans*." Infect Immun **73**(6): 3714-3724.
- Kobayashi, H, Tanaka, Y (2015). "gammadelta T Cell Immunotherapy-A Review." Pharmaceuticals (Basel) **8**(1): 40-61.
- Kousha, M, Tadi, R, Soubani, A O (2011). "Pulmonary aspergillosis: a clinical review." Eur Respir Rev **20**(121): 156-174.
- Kroetz, D N, Deepe, G S, Jr. (2010). "CCR5 dictates the equilibrium of proinflammatory IL-17+ and regulatory Foxp3+ T cells in fungal infection." J Immunol **184**(9): 5224-5231.
- Kumar, H, Kawai, T, Akira, S (2011). "Pathogen recognition by the innate immune system." Int Rev Immunol **30**(1): 16-34.
- LaRock, C N, Cookson, B T (2013). "Burning down the house: cellular actions during pyroptosis." PLoS Pathog **9**(12): e1003793.
- Lei, G, Chen, M, Li, H, Niu, J L, Wu, S, Mao, L, . . . Meng, G (2013). "Biofilm from a clinical strain of *Cryptococcus neoformans* activates the NLRP3 inflammasome." Cell Res **23**(7): 965-968.
- LeibundGut-Landmann, S, Gross, O, Robinson, M J, Osorio, F, Slack, E C, Tsoni, S V, . . . Reis e Sousa, C (2007). "Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17." Nat Immunol **8**(6): 630-638.

- Lemaitre, B, Nicolas, E, Michaut, L, Reichhart, J M, Hoffmann, J A (1996). "The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults." Cell **86**(6): 973-983.
- Leung, S, Liu, X, Fang, L, Chen, X, Guo, T, Zhang, J (2010). "The cytokine milieu in the interplay of pathogenic Th1/Th17 cells and regulatory T cells in autoimmune disease." Cell Mol Immunol **7**(3): 182-189.
- Lin, D, Wu, L C, Rinaldi, M G, Lehmann, P F (1995). "Three distinct genotypes within *Candida parapsilosis* from clinical sources." J Clin Microbiol **33**(7): 1815-1821.
- Lin, J S, Yang, C W, Wang, D W, Wu-Hsieh, B A (2005). "Dendritic cells cross-present exogenous fungal antigens to stimulate a protective CD8 T cell response in infection by *Histoplasma capsulatum*." J Immunol **174**(10): 6282-6291.
- Lin, K M, Hu, W, Troutman, T D, Jennings, M, Brewer, T, Li, X, . . . Pasare, C (2014). "IRAK-1 bypasses priming and directly links TLRs to rapid NLRP3 inflammasome activation." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(2): 775-780.
- Lin, Y C, Huang, D Y, Chu, C L, Lin, W W (2010). "Anti-inflammatory actions of Syk inhibitors in macrophages involve non-specific inhibition of toll-like receptors-mediated JNK signaling pathway." Mol Immunol **47**(7-8): 1569-1578.
- Linden, J R, De Paepe, M E, Laforce-Nesbitt, S S, Bliss, J M (2013a). "Galectin-3 plays an important role in protection against disseminated candidiasis." Med Mycol **51**(6): 641-651.
- Linden, J R, Kunkel, D, Laforce-Nesbitt, S S, Bliss, J M (2013b). "The role of galectin-3 in phagocytosis of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* by human neutrophils." Cell Microbiol **15**(7): 1127-1142.
- Liu, Y, Yang, B, Zhou, M, Li, L, Zhou, H, Zhang, J, . . . Wu, C (2009). "Memory IL-22-producing CD4+ T cells specific for *Candida albicans* are present in humans." Eur J Immunol **39**(6): 1472-1479.
- Livak, K J, Schmittgen, T D (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.
- Lo, H J, Kohler, J R, DiDomenico, B, Loebenberg, D, Cacciapuoti, A, Fink, G R (1997). "Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent." Cell **90**(5): 939-949.
- Lockhart, S R, Iqbal, N, Cleveland, A A, Farley, M M, Harrison, L H, Bolden, C B, . . . Chiller, T (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**(11): 3435-3442.
- Logue, M E, Wong, S, Wolfe, K H, Butler, G (2005). "A genome sequence survey shows that the pathogenic yeast *Candida parapsilosis* has a defective MTL_a1 allele at its mating type locus." Eukaryot Cell **4**(6): 1009-1017.
- Lott, T J, Kuykendall, R J, Welbel, S F, Pramanik, A, Lasker, B A (1993). "Genomic heterogeneity in the yeast *Candida parapsilosis*." Curr Genet **23**(5-6): 463-467.
- Low, C Y, Rotstein, C (2011). "Emerging fungal infections in immunocompromised patients." F1000 Med Rep **3**: 14.
- Lu, A, Wu, H (2015). "Structural mechanisms of inflammasome assembly." FEBS J **282**(3): 435-444.
- Lu, R, Pan, H, Shively, J E (2012). "CEACAM1 negatively regulates IL-1 β production in LPS activated neutrophils by recruiting SHP-1 to a SYK-TLR4-CEACAM1 complex." PLoS Pathog **8**(4): e1002597.
- Luckheeram, R V, Zhou, R, Verma, A D, Xia, B (2012). "CD4(+)T cells: differentiation and functions." Clin Dev Immunol **2012**: 925135.
- MacDougall, L, Kidd, S E, Galanis, E, Mak, S, Leslie, M J, Cieslak, P R, . . . Bartlett, K H (2007). "Spread of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and detection in the Pacific Northwest, USA." Emerg Infect Dis **13**(1): 42-50.

- Marakalala, M J, Vautier, S, Potrykus, J, Walker, L A, Shepardson, K M, Hopke, A, . . . Brown, G D (2013). "Differential adaptation of *Candida albicans* in vivo modulates immune recognition by dectin-1." *PLoS Pathog* **9**(4): e1003315.
- Marquis, M, Lewandowski, D, Dugas, V, Aumont, F, Senechal, S, Jolicoeur, P, . . . de Repentigny, L (2006). "CD8+ T cells but not polymorphonuclear leukocytes are required to limit chronic oral carriage of *Candida albicans* in transgenic mice expressing human immunodeficiency virus type 1." *Infect Immun* **74**(4): 2382-2391.
- Marr, K A, Balajee, S A, McLaughlin, L, Tabouret, M, Bentsen, C, Walsh, T J (2004). "Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance." *J Infect Dis* **190**(3): 641-649.
- Martinon, F, Burns, K, Tschopp, J (2002). "The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta." *Mol Cell* **10**(2): 417-426.
- Martinon, F, Mayor, A, Tschopp, J (2009). "The inflammasomes: guardians of the body." *Annu Rev Immunol* **27**: 229-265.
- Massey, S E, Moura, G, Beltrao, P, Almeida, R, Garey, J R, Tuite, M F, Santos, M A (2003). "Comparative evolutionary genomics unveils the molecular mechanism of reassignment of the CTG codon in *Candida* spp." *Genome Res* **13**(4): 544-557.
- Matee, M I, Scheutz, F, Moshly, J (2000). "Occurrence of oral lesions in relation to clinical and immunological status among HIV-infected adult Tanzanians." *Oral Dis* **6**(2): 106-111.
- McKinley, L, Logar, A J, McAllister, F, Zheng, M, Steele, C, Kolls, J K (2006). "Regulatory T cells dampen pulmonary inflammation and lung injury in an animal model of pneumocystis pneumonia." *J Immunol* **177**(9): 6215-6226.
- Meissner, F, Seger, R A, Moshous, D, Fischer, A, Reichenbach, J, Zychlinsky, A (2010). "Inflammasome activation in NADPH oxidase defective mononuclear phagocytes from patients with chronic granulomatous disease." *Blood* **116**(9): 1570-1573.
- Mocsai, A, Ruland, J, Tybulewicz, V L (2010). "The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions." *Nat Rev Immunol* **10**(6): 387-402.
- Monod, M, Borg-von, Z M (2002). "Secreted aspartic proteases as virulence factors of *Candida* species." *Biol Chem* **383**(7-8): 1087-1093.
- Mosmann, T R, Coffman, R L (1989). "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties." *Annu Rev Immunol* **7**: 145-173.
- Moyes, D L, Murciano, C, Rungrall, M, Kohli, A, Islam, A, Naglik, J R (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**(1): 93-101.
- Mukherjee, J, Pirofski, L A, Scharff, M D, Casadevall, A (1993). "Antibody-mediated protection in mice with lethal intracerebral *Cryptococcus neoformans* infection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(8): 3636-3640.
- Murray, C J, Ortblad, K F, Guinovart, C, Lim, S S, Wolock, T M, Roberts, D A, . . . Vos, T (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**(9947): 1005-1070.
- Myers, T A, Leigh, J E, Arribas, A R, Hager, S, Clark, R, Lilly, E, Fidel, P L, Jr. (2003). "Immunohistochemical evaluation of T cells in oral lesions from human immunodeficiency virus-positive persons with oropharyngeal candidiasis." *Infect Immun* **71**(2): 956-963.
- Nemeth, T, Toth, A, Hamari, Z, Falus, A, Eder, K, Vagvolgyi, C, . . . Gacsér, A (2014). "Transcriptome profile of the murine macrophage cell response to *Candida parapsilosis*." *Fungal Genet Biol* **65**: 48-56.
- Nemeth, T, Toth, A, Szenzenstein, J, Horvath, P, Nosanchuk, J D, Grozer, Z, . . . Gacsér, A (2013). "Characterization of virulence properties in the *C. parapsilosis sensu lato* species." *PLoS One* **8**(7): e68704.

- Netea, M G, Brown, G D, Kullberg, B J, Gow, N A (2008). "An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system." Nat Rev Microbiol **6**(1): 67-78.
- Netea, M G, Gow, N A, Joosten, L A, Verschuere, I, van der Meer, J W, Kullberg, B J (2010a). "Variable recognition of *Candida albicans* strains by TLR4 and lectin recognition receptors." Med Mycol **48**(7): 897-903.
- Netea, M G, Gow, N A, Munro, C A, Bates, S, Collins, C, Ferwerda, G, . . . Kullberg, B J (2006). "Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors." J Clin Invest **116**(6): 1642-1650.
- Netea, M G, Nold-Petry, C A, Nold, M F, Joosten, L A, Opitz, B, van der Meer, J H, . . . Dinarello, C A (2009). "Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1 β in monocytes and macrophages." Blood **113**(10): 2324-2335.
- Netea, M G, Simon, A, van de Veerdonk, F, Kullberg, B J, Van der Meer, J W, Joosten, L A (2010b). "IL-1 β processing in host defense: beyond the inflammasomes." PLoS Pathog **6**(2): e1000661.
- Netea, M G, Suttmoller, R, Hermann, C, Van der Graaf, C A, Van der Meer, J W, van Krieken, J H, . . . Kullberg, B J (2004). "Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells." J Immunol **172**(6): 3712-3718.
- Netea, M G, van de Veerdonk, F L, van der Meer, J W, Dinarello, C A, Joosten, L A (2014). "Inflammasome-Independent Regulation of IL-1-Family Cytokines." Annu Rev Immunol.
- Netea, M G, Van Der Graaf, C A, Vonk, A G, Verschuere, I, Van Der Meer, J W, Kullberg, B J (2002). "The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis." J Infect Dis **185**(10): 1483-1489.
- Netea, M G, van Tits, L J, Curfs, J H, Amiot, F, Meis, J F, van der Meer, J W, Kullberg, B J (1999). "Increased susceptibility of TNF- α lymphotoxin- α double knockout mice to systemic candidiasis through impaired recruitment of neutrophils and phagocytosis of *Candida albicans*." J Immunol **163**(3): 1498-1505.
- Noble, S M, Johnson, A D (2007). "Genetics of *Candida albicans*, a diploid human fungal pathogen." Annu Rev Genet **41**: 193-211.
- Nosanchuk, J D, Steenbergen, J N, Shi, L, Deepe, G S, Jr., Casadevall, A (2003). "Antibodies to a cell surface histone-like protein protect against *Histoplasma capsulatum*." J Clin Invest **112**(8): 1164-1175.
- Nosek, J, Holesova, Z, Kosa, P, Gacsar, A, Tomaska, L (2009). "Biology and genetics of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*." Curr Genet **55**(5): 497-509.
- Nucci, M, Queiroz-Telles, F, Alvarado-Matute, T, Tiraboschi, I N, Cortes, J, Zurita, J, . . . Colombo, A L (2013). "Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey." PLoS One **8**(3): e59373.
- Obayashi, T, Negishi, K, Suzuki, T, Funata, N (2008). "Reappraisal of the serum (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections--a study based on autopsy cases from 6 years." Clin Infect Dis **46**(12): 1864-1870.
- Oeser, C, Lamagni, T, Heath, P T, Sharland, M, Ladhani, S (2013). "The epidemiology of neonatal and pediatric candidemia in England and Wales, 2000-2009." Pediatr Infect Dis J **32**(1): 23-26.
- Ouyang, W, Kolls, J K, Zheng, Y (2008). "The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation." Immunity **28**(4): 454-467.
- Pammi, M, Holland, L, Butler, G, Gacsar, A, Bliss, J M (2013). "*Candida parapsilosis* is a significant neonatal pathogen: a systematic review and meta-analysis." Pediatr Infect Dis J **32**(5): e206-216.
- Pappas, P G (2006). "Invasive candidiasis." Infect Dis Clin North Am **20**(3): 485-506.

- Pappas, P G, Rex, J H, Lee, J, Hamill, R J, Larsen, R A, Powderly, W, . . . Dismukes, W E (2003). "A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients." Clin Infect Dis **37**(5): 634-643.
- 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**(1): 1085-1119.
- Park, B J, Wannemuehler, K A, Marston, B J, Govender, N, Pappas, P G, Chiller, T M (2009). "Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS." AIDS **23**(4): 525-530.
- Park, E K, Jung, H S, Yang, H I, Yoo, M C, Kim, C, Kim, K S (2007). "Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli." Inflamm Res **56**(1): 45-50.
- Park, H, Li, Z, Yang, X O, Chang, S H, Nurieva, R, Wang, Y H, . . . Dong, C (2005). "A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17." Nat Immunol **6**(11): 1133-1141.
- Peman, J, Canton, E, Linares-Sicilia, M J, Rosello, E M, Borrell, N, Ruiz-Perez-de-Pipaon, M T, . . . Garcia-Garcia, I (2011). "Epidemiology and antifungal susceptibility of bloodstream fungal isolates in pediatric patients: a Spanish multicenter prospective survey." J Clin Microbiol **49**(12): 4158-4163.
- Peman, J, Canton, E, Quindos, G, Eraso, E, Alcoba, J, Guinea, J, . . . Yague, G (2012). "Epidemiology, species distribution and in vitro antifungal susceptibility of fungaemia in a Spanish multicentre prospective survey." J Antimicrob Chemother **67**(5): 1181-1187.
- Petrilli, V, Papin, S, Dostert, C, Mayor, A, Martinon, F, Tschopp, J (2007). "Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration." Cell Death Differ **14**(9): 1583-1589.
- Pfaller, M A, Castanheira, M, Messer, S A, Moet, G J, Jones, R N (2010a). "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**(3): 278-283.
- Pfaller, M A, Diekema, D J (2007). "Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem." Clin Microbiol Rev **20**(1): 133-163.
- Pfaller, M A, Diekema, D J, Gibbs, D L, Newell, V A, Ellis, D, Tullio, V, . . . and the Global Antifungal Surveillance, G (2010b). "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**(4): 1366-1377.
- Pfaller, M A, Diekema, D J, Jones, R N, Messer, S A, Hollis, R J (2002). "Trends in antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from pediatric and adult patients with bloodstream infections: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997 to 2000." J Clin Microbiol **40**(3): 852-856.
- Pfaller, M A, Moet, G J, Messer, S A, Jones, R N, 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**(2): 561-566.
- Pietrella, D, Pandey, N, Gabrielli, E, Pericolini, E, Perito, S, Kasper, L, . . . Vecchiarelli, A (2013). "Secreted aspartic proteases of *Candida albicans* activate the NLRP3 inflammasome." Eur J Immunol **43**(3): 679-692.
- Plato, A, Hardison, S E, Brown, G D (2015). "Pattern recognition receptors in antifungal immunity." Semin Immunopathol **37**(2): 97-106.
- Plato, A, Willment, J A, Brown, G D (2013). "C-type lectin-like receptors of the dectin-1 cluster: ligands and signaling pathways." Int Rev Immunol **32**(2): 134-156.

- Poikonen, E, Lyytikäinen, O, Anttila, V J, Koivula, I, Lumio, J, Kotilainen, P, . . . Ruutu, P (2010). "Secular trend in candidemia and the use of fluconazole in Finland, 2004-2007." BMC Infect Dis **10**: 312.
- Popa, C, Abdollahi-Roodsaz, S, Joosten, L A, Takahashi, N, Sprong, T, Matera, G, . . . Netea, M G (2007). "*Bartonella quintana* lipopolysaccharide is a natural antagonist of Toll-like receptor 4." Infect Immun **75**(10): 4831-4837.
- Pryszcz, L P, 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**(12): 2382-2392.
- Puel, A, Cypowyj, S, Bustamante, J, Wright, J F, Liu, L, Lim, H K, . . . Casanova, J L (2011). "Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity." Science **332**(6025): 65-68.
- Puig-Asensio, M, Padilla, B, Garnacho-Montero, J, Zaragoza, O, Aguado, J M, Zaragoza, R, . . . Almirante, B (2014). "Epidemiology and predictive factors for early and late mortality in *Candida* bloodstream infections: a population-based surveillance in Spain." Clin Microbiol Infect **20**(4): O245-254.
- Robinson, M J, Osorio, F, Rosas, M, Freitas, R P, Schweighoffer, E, Gross, O, . . . Reis e Sousa, C (2009). "Dectin-2 is a Syk-coupled pattern recognition receptor crucial for Th17 responses to fungal infection." J Exp Med **206**(9): 2037-2051.
- Romani, L (2011). "Immunity to fungal infections." Nat Rev Immunol **11**(4): 275-288.
- Romani, L, Bistoni, F, Puccetti, P (2002). "Fungi, dendritic cells and receptors: a host perspective of fungal virulence." Trends Microbiol **10**(11): 508-514.
- Romani, L, Mencacci, A, Cenci, E, Spaccapelo, R, Toniatti, C, Puccetti, P, . . . Poli, V (1996). "Impaired neutrophil response and CD4+ T helper cell 1 development in interleukin 6-deficient mice infected with *Candida albicans*." J Exp Med **183**(4): 1345-1355.
- Romani, L, Puccetti, P (2006). "Protective tolerance to fungi: the role of IL-10 and tryptophan catabolism." Trends Microbiol **14**(4): 183-189.
- Rossol, M, Pierer, M, Raulien, N, Quandt, D, Meusch, U, Rothe, K, . . . Wagner, U (2012). "Extracellular Ca²⁺ is a danger signal activating the NLRP3 inflammasome through G protein-coupled calcium sensing receptors." Nat Commun **3**: 1329.
- Rubartelli, A, Gattorno, M, Netea, M G, Dinarello, C A (2011). "Interplay between redox status and inflammasome activation." Trends Immunol **32**(12): 559-566.
- Ruiz-Herrera, J, Elorza, M V, Valentin, E, Sentandreu, R (2006). "Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity." FEMS Yeast Res **6**(1): 14-29.
- Sai, S, Holland, L M, McGee, C F, Lynch, D B, Butler, G (2011). "Evolution of mating within the *Candida parapsilosis* species group." Eukaryot Cell **10**(4): 578-587.
- Said-Sadier, N, Padilla, E, Langsley, G, Ojcius, D M (2010). "Aspergillus fumigatus stimulates the NLRP3 inflammasome through a pathway requiring ROS production and the Syk tyrosine kinase." PLoS One **5**(4): e10008.
- Saijo, S, Fujikado, N, Furuta, T, Chung, S H, Kotaki, H, Seki, K, . . . Iwakura, Y (2007). "Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans*." Nat Immunol **8**(1): 39-46.
- Sallusto, F, Geginat, J, Lanzavecchia, A (2004). "Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance." Annu Rev Immunol **22**: 745-763.
- Sathaliyawala, T, Kubota, M, Yudanin, N, Turner, D, Camp, P, Thome, J J, . . . Farber, D L (2013). "Distribution and compartmentalization of human circulating and tissue-resident memory T cell subsets." Immunity **38**(1): 187-197.
- Seider, K, Brunke, S, Schild, L, Jablonowski, N, Wilson, D, Majer, O, . . . Hube, B (2011). "The facultative intracellular pathogen *Candida glabrata* subverts macrophage cytokine production and phagolysosome maturation." J Immunol **187**(6): 3072-3086.

- Shen, F, Gaffen, S L (2008). "Structure-function relationships in the IL-17 receptor: implications for signal transduction and therapy." *Cytokine* **41**(2): 92-104.
- Shevach, E M (2001). "Certified professionals: CD4(+)CD25(+) suppressor T cells." *J Exp Med* **193**(11): F41-46.
- Shibata, K, Yamada, H, Nakamura, R, Sun, X, Itsumi, M, Yoshikai, Y (2008). "Identification of CD25+ gamma delta T cells as fetal thymus-derived naturally occurring IL-17 producers." *J Immunol* **181**(9): 5940-5947.
- Smeekens, S P, van de Veerdonk, F L, Joosten, L A, Jacobs, L, Jansen, T, Williams, D L, . . . Netea, M G (2011). "The classical CD14(+)(+) CD16(-) monocytes, but not the patrolling CD14(+) CD16(+) monocytes, promote Th17 responses to *Candida albicans*." *Eur J Immunol* **41**(10): 2915-2924.
- Smeekens, S P, van de Veerdonk, F L, van der Meer, J W, Kullberg, B J, Joosten, L A, Netea, M G (2010). "The *Candida* Th17 response is dependent on mannan- and beta-glucan-induced prostaglandin E2." *Int Immunol* **22**(11): 889-895.
- Sobel, J D (2007). "Vulvovaginal candidosis." *Lancet* **369**(9577): 1961-1971.
- Steele, C, Rapaka, R R, Metz, A, Pop, S M, Williams, D L, Gordon, S, . . . Brown, G D (2005). "The beta-glucan receptor dectin-1 recognizes specific morphologies of *Aspergillus fumigatus*." *PLoS Pathog* **1**(4): e42.
- Tassi, S, Carta, S, Vene, R, Delfino, L, Ciriolo, M R, Rubartelli, A (2009). "Pathogen-induced interleukin-1beta processing and secretion is regulated by a biphasic redox response." *J Immunol* **183**(2): 1456-1462.
- Tavanti, A, Davidson, A D, Gow, N A, Maiden, M C, Odds, F C (2005). "*Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III." *J Clin Microbiol* **43**(1): 284-292.
- Tavares, A H, Magalhaes, K G, Almeida, R D, Correa, R, Burgel, P H, Bocca, A L (2013). "NLRP3 inflammasome activation by *Paracoccidioides brasiliensis*." *PLoS Negl Trop Dis* **7**(12): e2595.
- Taylor, P R, Tsoni, S V, Willment, J A, Dennehy, K M, Rosas, M, Findon, H, . . . Brown, G D (2007). "Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection." *Nat Immunol* **8**(1): 31-38.
- Tomalka, J, Ganesan, S, Azodi, E, Patel, K, Majmudar, P, Hall, B A, . . . Hise, A G (2011). "A novel role for the NLRC4 inflammasome in mucosal defenses against the fungal pathogen *Candida albicans*." *PLoS Pathog* **7**(12): e1002379.
- Toth, A, Nemeth, T, Csonka, K, Horvath, P, Vagvolgyi, C, Vizler, C, . . . Gacser, A (2014a). "Secreted *Candida parapsilosis* lipase modulates the immune response of primary human macrophages." *Virulence* **5**(4): 555-562.
- Toth, R, Toth, A, Papp, C, Jankovics, F, Vagvolgyi, C, Alonso, M F, . . . Gacser, A (2014b). "Kinetic studies of *Candida parapsilosis* phagocytosis by macrophages and detection of intracellular survival mechanisms." *Front Microbiol* **5**: 633.
- Tragiannidis, A, Tsoulas, C, Kerl, K, Groll, A H (2013). "Invasive candidiasis: update on current pharmacotherapy options and future perspectives." *Expert Opin Pharmacother* **14**(11): 1515-1528.
- Trofa, D, Gacser, A, Nosanchuk, J D (2008). "*Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen." *Clin Microbiol Rev* **21**(4): 606-625.
- Tschopp, J, Schroder, K (2010). "NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production?" *Nat Rev Immunol* **10**(3): 210-215.
- Tsuchiya, K, Hara, H (2014). "The inflammasome and its regulation." *Crit Rev Immunol* **34**(1): 41-80.
- Ulland, T K, Ferguson, P J, Sutterwala, F S (2015). "Evasion of inflammasome activation by microbial pathogens." *J Clin Invest* **125**(2): 469-477.

- Urban, C F, Reichard, U, Brinkmann, V, Zychlinsky, A (2006). "Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms." Cell Microbiol **8**(4): 668-676.
- Valach, M, Pryszcz, L P, Tomaska, L, Gacser, A, Gabaldon, T, Nosek, J (2012). "Mitochondrial genome variability within the *Candida parapsilosis* species complex." Mitochondrion **12**(5): 514-519.
- van de Veerdonk, F L, Joosten, L A, Shaw, P J, Smeekens, S P, Malireddi, R K, van der Meer, J W, . . . Kanneganti, T D (2011). "The inflammasome drives protective Th1 and Th17 cellular responses in disseminated candidiasis." Eur J Immunol **41**(8): 2260-2268.
- van de Veerdonk, F L, Marijnissen, R J, Kullberg, B J, Koenen, H J, Cheng, S C, Joosten, I, . . . Netea, M G (2009). "The macrophage mannose receptor induces IL-17 in response to *Candida albicans*." Cell Host Microbe **5**(4): 329-340.
- van de Veerdonk, F L, Netea, M G (2010). "T-cell Subsets and Antifungal Host Defenses." Curr Fungal Infect Rep **4**(4): 238-243.
- van de Veerdonk, F L, Netea, M G (2013). "New Insights in the Immunobiology of IL-1 Family Members." Front Immunol **4**: 167.
- van der Graaf, C A, Netea, M G, Verschuere, I, van der Meer, J W, Kullberg, B J (2005). "Differential cytokine production and Toll-like receptor signaling pathways by *Candida albicans* blastoconidia and hyphae." Infect Immun **73**(11): 7458-7464.
- Vanaja, S K, Rathinam, V A, Fitzgerald, K A (2015). "Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights." Trends Cell Biol.
- Vermes, I, Haanen, C, Steffens-Nakken, H, Reutelingsperger, C (1995). "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V." J Immunol Methods **184**(1): 39-51.
- Wagener, J, Malireddi, R K, Lenardon, M D, Koberle, M, Vautier, S, MacCallum, D M, . . . Gow, N A (2014). "Fungal chitin dampens inflammation through IL-10 induction mediated by NOD2 and TLR9 activation." PLoS Pathog **10**(4): e1004050.
- Walsh, T J, Gamaletos, M N (2013). "Treatment of fungal disease in the setting of neutropenia." Hematology Am Soc Hematol Educ Program **2013**: 423-427.
- Wang, M, Wang, F, Yang, J, Zhao, D, Wang, H, Shao, F, . . . Song, S (2013). "Mannan-binding lectin inhibits *Candida albicans*-induced cellular responses in PMA-activated THP-1 cells through Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4." PLoS One **8**(12): e83517.
- Wang, Z Y, Sato, H, Kusam, S, Sehra, S, Toney, L M, Dent, A L (2005). "Regulation of IL-10 gene expression in Th2 cells by Jun proteins." J Immunol **174**(4): 2098-2105.
- Wellington, M, Dolan, K, Krysan, D J (2009). "Live *Candida albicans* suppresses production of reactive oxygen species in phagocytes." Infect Immun **77**(1): 405-413.
- Wellington, M, Koslony, K, Krysan, D J (2012). "*Candida albicans* morphogenesis is not required for macrophage interleukin 1 β production." MBio **4**(1): e00433-00412.
- Wellington, M, Koslony, K, Sutterwala, F S, Krysan, D J (2014). "*Candida albicans* triggers NLRP3-mediated pyroptosis in macrophages." Eukaryot Cell **13**(2): 329-340.
- Wille, M P, Guimaraes, T, Furtado, G H, Colombo, A L (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**(3).
- Wisplinghoff, H, Bischoff, T, Tallent, S M, Seifert, H, Wenzel, R P, Edmond, M B (2004). "Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study." Clin Infect Dis **39**(3): 309-317.
- Wuthrich, M, Deepe, G S, Jr., Klein, B (2012). "Adaptive immunity to fungi." Annu Rev Immunol **30**: 115-148.
- Wuthrich, M, Hung, C Y, Gern, B H, Pick-Jacobs, J C, Galles, K J, Filutowicz, H I, . . . Klein, B S (2011). "A TCR transgenic mouse reactive with multiple systemic dimorphic fungi." J Immunol **187**(3): 1421-1431.

- Xu, S, Huo, J, Lee, K G, Kurosaki, T, Lam, K P (2009). "Phospholipase Cgamma2 is critical for Dectin-1-mediated Ca²⁺ flux and cytokine production in dendritic cells." J Biol Chem **284**(11): 7038-7046.
- Yapar, N (2014). "Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis." Ther Clin Risk Manag **10**: 95-105.
- Zelensky, A N, Gready, J E (2005). "The C-type lectin-like domain superfamily." FEBS J **272**(24): 6179-6217.
- Zhong, Y, Kinio, A, Saleh, M (2013). "Functions of NOD-Like Receptors in Human Diseases." Front Immunol **4**: 333.
- Zhou, R, Yazdi, A S, Menu, P, Tschopp, J (2011). "A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation." Nature **469**(7329): 221-225.
- Zilberberg, M D, Shorr, A F, Kollef, M H (2008). "Secular trends in candidemia-related hospitalization in the United States, 2000-2005." Infect Control Hosp Epidemiol **29**(10): 978-980.

10. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönetemet fejezem ki Prof. Dr. Vágvölgyi Csabának, a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar Mikrobiológiai Tanszék vezetőjének, amiért lehetővé tette, hogy PhD munkámat a tanszéken végezzem.

Hálával tartozom témavezetőmnek, Dr. Gácsér Attilának, amiért az elmúlt öt évben irányította és támogatta munkámat. Szeretném megköszönni az évek során kapott rengeteg segítséget, tanácsot és biztatást, valamint, hogy általa megismerhettem a szakterület nemzetközi tudományos közösségét is. Köszönöm belém fektetett bizalmát, és hogy minden segítséget megadott szakmai fejlődésemhez.

Köszönettel tartozom a témavezetőm által irányított kutatócsoport minden volt és jelenlegi tagjának: Dr. Németh Tibornak, Dr. Horváth Péternek, Grózer Zsuzsannának, Szenzenstein Juditnak, Tóth Renátának, Csonka Katalinnak, Papp Csabának, Zajta Eriknek, Luis Antonio Pérez García-nak, Tanmoy Chakraborty-nak, Dávid Edinának, Papp Henriettának, Riba Adriennek, Bernátsky Reginának, Berta Bálintnak, Molnár Gergőnek, Balla Benediktának, Nyúl Máténak, Pintér Lillának, Bohner Flórának, Ébert Attilának és Tóth Alexandrának, amiért egy igazán remek és összetartó csapat része lehettem.

Kollégáim közül külön is szeretném megköszönni a segítségét Dr. Németh Tibornak, aki különösen PhD munkám kezdetén látott el sok elméleti és gyakorlati tanáccsal; Csonka Katalinnak, a PBMC izolálás és ELISA kísérletek során nyújtott segítségéért; Zajta Eriknek, az inflammaszóma aktiváció vizsgálatával kapcsolatos közös munkáért; Tóth Renátának, a CLIB HF *C. parapsilosis* törzs biztosításáért, illetve Szenzenstein Juditnak, aki számtalan alkalommal segített technikai kérdésekben az évek folyamán.

Köszönettel tartozom Prof. Mihai G. Netea-nak, amiért három hónapot csoportjában tölthettem Hollandiában, a Radboud University Nijmegen Medical Centre-ben.

Köszönetet szeretnék mondani továbbá Lele Máriának és Deákné Kulcsár Melindának a sok technikai segítségért; Dr. Palágyi Andrásnének, Kreisch Istvánnének, Szőnyi Jánosnének és Lengyel Boglárkának a munkámmal kapcsolatos gazdasági ügyek intézéséért; valamint a 302. labor és a Mikrobiológiai Tanszék valamennyi dolgozójának segítőkészségükért és a kellemes munkahelyi légkörért.

Végül, de nem utolsó sorban hálásan köszönöm páromnak és családomnak, amiért mindvégig mellettem álltak és mindenben segítettek. Külön hálával tartozom szüleimnek, akik áldozatos munkájukkal lehetővé tették, hogy tanulmányaimat folytathassam az általam választott területen, és egész életemben szeretettel biztattak és önzetlenül támogattak.