

**A *CANDIDA PARAPSILOSIS IN VIVO* FERTŐZÉS JELLEMZÉSE:
A SEJTFAL N-MANNOZILÁCIÓ SZEREPE A VIRULENCIÁBAN**

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

CSONKA KATALIN

TÉMAVEZETŐ:

**PROF. DR. GÁCSER ATTILA
EGYETEMI TANÁR**

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA



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

SZEGED

2018

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
2. BEVEZETÉS.....	6
3.1. Az opportunistá patogén gombák által okozott fertőzések jelentősége	8
3.2. A <i>Candida</i> fertőzések jelentősége és epidemiológiája	9
3.3. A <i>C. parapsilosis</i> klinikai jelentősége.....	11
3.4. A <i>Candida</i> nemzetség általános jellemzése	12
3.5. A <i>C. parapsilosis</i> általános jellemzése.....	13
3.6. A <i>Candida</i> gombák sejtfal felépítése.....	14
3.7. A természetes immunválasz elemei a gombafertőzések során	16
3.7.1. A mintázatfelismerő receptorok	16
3.7.1.1. A Toll-szerű receptorok (TLRs)	17
3.7.1.2. A C-típusú lektin receptorok (CLR)	19
3.7.1.3. A RIG-szerű receptorok (RLR).....	24
3.7.1.4. A NOD-szerű receptorok (NLR).....	25
3.7.2. A természetes immunválasz sejtselemei: neutrofil granulociták, monociták/makrofágok, dendritikus sejtek.....	25
3.8. T helper (Th) sejt válaszok a gombafertőzések során	27
3.9. <i>In vivo</i> modellek alkalmazása a <i>Candida</i> fertőzések során.....	28
3.9.1. A <i>D. melanogaster</i> modellszervezet alkalmazhatósága fertőzési kísérletekben	29
3.9.2. Egér modell a <i>Candida</i> fertőzések vizsgálatában	32
3.9.2.1. Az újszülött egér modell	33
3.10. A gomba sejtfal N-mannán komponensek szerepe a virulenciában.....	34
3.11. A <i>C. parapsilosis</i> sejtfala és a felismerésében szerepet játszó receptorok <i>in vitro</i> körülmények között	35
3.11.1. A <i>C. parapsilosis och1Δ/Δ</i> mutáns törzs jellemzői	36
4. CÉLKITŰZÉSEK.....	39
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	40
5.1. A kísérletek során alkalmazott törzsek és tenyésztési körülmények.....	40
5.2. Alkalmazott tápoldatok, táptalajok, pufferek és egyéb reagensek.....	42
5.3. Sejttenyésztési módszerek, primer sejtek izolálása.....	43
5.3. Alkalmazott kísérleti módszerek	44
5.3.1. <i>In vitro</i> fertőzési modellek	44
5.3.2. <i>In vivo</i> fertőzési modellek	46
5.3.3. A <i>D. melanogaster</i> túlélés vizsgálata.....	47
5.3.4. A CFU (colony-forming unit, kolóniaképző egység) meghatározása	47

5.3.5. Enzim-kötött immunoszorbens próba (ELISA).....	48
5.3.6. Áramlási citometria vizsgálatok az immunsejt infiltráció meghatározásához	49
5.3.7. RNS izolálás, cDNS szintézis és qRT-PCR	52
5.3.8. Mikroszkópos vizsgálatok	53
5.4. Statisztikai analízis	54
6. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK	55
6.1. <i>C. parapsilosis</i> fertőzés jellemzése <i>D. melanogaster</i> modellben.....	55
6.1.1. A <i>D. melanogaster</i> túlélésének vizsgálata <i>Candida</i> fertőzést követően.....	55
6.1.2. A sejtfal <i>N</i> -mannoziláció szerepe a <i>C. parapsilosis</i> virulenciájában a <i>D. melanogaster</i> modellben	57
6.1.3. A <i>D. melanogaster</i> celluláris immunválaszának <i>in vitro</i> vizsgálata	59
6.1.4. A <i>D. melanogaster</i> humorális válaszána vizsgálata a <i>C. parapsilosis</i> fertőzést követően	61
6.1.5. A <i>C. parapsilosis</i> fertőzés jellemzése <i>D. melanogaster</i> modellben – értékelés.....	64
6.2. A <i>C. parapsilosis</i> fertőzés jellemzése újszülött egér modellben.....	66
6.2.1. Az intravénás fertőzéshez kidolgozott újszülött egér modell bemutatása	66
6.2.2. Az újszülött egér modell alkalmazhatósága a <i>C. parapsilosis</i> törzsek virulencia különbségeinek kimutatására	70
6.2.3. A <i>C. parapsilosis</i> sejtfal <i>N</i> -mannoziláció szerepének vizsgálata az újszülött egér modellben.....	72
6.2.4. Az újszülött és kifejlett egerek gombafertőzésre mutatott érzékenységeinek összehasonlítása.....	75
6.2.5. A <i>C. parapsilosis</i> fertőzés jellemzése újszülött egér modellben - értékelés	76
6.3. A szisztémás <i>C. parapsilosis</i> fertőzés <i>in vivo</i> jellemzése felnőtt egér modellben.....	78
6.3.1. A vad típusú és a sejtfal mutáns <i>C. parapsilosis</i> fertőzés jellemzése	78
6.3.2. A szisztémás <i>C. parapsilosis</i> fertőzés <i>in vivo</i> jellemzése - értékelés.....	83
6.4. A Dectin-1 receptor szerepe a szisztémás <i>C. parapsilosis</i> fertőzés során	86
6.4.1. A Dectin-1 receptor szerepe a vad típusú <i>C. parapsilosis</i> felismerésében.....	86
6.4.2. A Dectin-1 receptor szerepének vizsgálata a <i>C. parapsilosis och1Δ/Δ</i> által indukált immunválaszban	89
6.4.3. A Dectin-1 receptor szerepe a szisztémás <i>C. parapsilosis</i> fertőzés során - értékelés	91
6.4.4. <i>C. parapsilosis in vivo</i> fertőzési modellek eredményeinek értékelése	92
7. ÖSSZEFOGLALÁS.....	94
8. SUMMARY	99
9. IRODALOMJEGYZÉK	104
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	119

11. MELLÉKLETEK	121
12. TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA	123

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AIDS	<u>a</u> cquired <u>i</u> mmune <u>d</u> eficiency <u>s</u> yndrome (szerzett immunhiányos tünetegyüttes)
AMP	<u>a</u> ntimicrobial <u>p</u> eptide (antimikrobiális fehérje)
AP-1	<u>a</u> ctivator <u>p</u> rotein <u>1</u> (aktivátor fehérje 1)
CD	<u>c</u> luster of <u>d</u> ifferentiation (differenciációs klaszter)
CFU	<u>c</u> olony- <u>f</u> orming <u>u</u> nit (kolóniaképző egység)
CLR	<u>C</u> -type <u>l</u> ectin <u>r</u> eceptor (C-típusú lektin receptor)
CR3	<u>c</u> omplement <u>r</u> eceptor <u>3</u> (komplement receptor 3)
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)
ELISA	<u>e</u> nzyme- <u>l</u> inked <u>i</u> mmunosorbent <u>a</u> ssay (enzimkötött immunoszorbens próba)
FACS	<u>F</u> luorescence- <u>a</u> ctivated <u>c</u> ell <u>s</u> orting (Fluoreszcencia aktivált sejtválogatás és analízis)
FBS	<u>f</u> etal <u>b</u> ovine <u>s</u> erum (magzati borjú szérum)
GFP	<u>g</u> reen <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein (zöld fluoreszcens fehérje)
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)
GNBP3	<u>G</u> ram- <u>n</u> egative <u>b</u> inding <u>p</u> rotein <u>3</u> (Gram-negatív kötő fehérje 3)
IFN	<u>i</u> nterferon (interferon)
IL	<u>i</u> nterleukin (interleukin)
IRAK	<u>i</u> nterleukin-1 receptor <u>a</u> ssociated <u>k</u> inase (interleukin-1 receptor asszociált kináz)
ITAM	<u>i</u> mmunoreceptor <u>t</u> yrosine-based <u>a</u> ctivation <u>m</u> otif (immunoreceptor tirozin-alapú aktivációs motívum)
JNK	<u>c</u> -Jun <u>N</u> -terminal <u>k</u> inase (c-Jun N-terminális kináz)
KC	<u>k</u> eratinocyte <u>c</u> hemoattractant (keratinocita kemoattraktáns)
<i>l(3)mbn</i>	<i><u>l</u>ethal(3) <u>m</u>alignant <u>b</u>lood <u>n</u>eoplasm</i>
MR	<u>m</u> annose <u>r</u> eceptor (mannóz receptor)
MYD88	<u>m</u> yeloid <u>d</u> ifferentiation primary response 88 (mieloid differenciációs elsődleges válasz gén 88)
NAC	<u>n</u> on- <i><u>a</u>lbicans</i> <u>C</u> andida (nem- <i>albicans</i> <i>Candida</i> faj)
NFκB	<u>n</u> uclear <u>f</u> actor <u>κ</u> B (Nukleáris faktor κB)
NLR	<u>N</u> OD- <u>l</u> ike <u>r</u> eceptor (NOD-szerű receptor)
NOD	<u>n</u> ucleotide-binding <u>o</u> ligomerization <u>d</u> omain (nukleotid-kötő oligomerizációs domén)
PAMP	<u>p</u> athogen <u>a</u> ssociated <u>m</u> olecular <u>p</u> attern (patogén-asszociált molekuláris mintázat)
PAS	<u>P</u> eriodic <u>a</u> cid- <u>S</u> chiff (perjódsav-Schiff festés)
PBMC	<u>p</u> eripheral <u>b</u> lood <u>m</u> ononuclear <u>c</u> ell (perifériás vér mononukleáris sejt)
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)
PRR	<u>p</u> attern <u>r</u> ecognition <u>r</u> eceptor (mintázatifelismerő receptor)
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)
psh	<u>P</u> ersephone
ROS	<u>r</u> eactive <u>o</u> xygen <u>s</u> pecies (reaktív oxigéngyökök)

Syk	spleen tyrosine kinase (lép tirozin kináz)
TGF β	transforming growth factor- β (transzformáló növekedési faktor- β)
Th	T helper (segítő T-sejt)
TIR	Toll/interleukin-1 receptor (Toll/interleukin-1 receptor)
TLR	Toll-like receptor (Toll-szerű receptor)
TNF α	tumor necrosis factor α (tumor nekrosis faktor α)
Treg	regulatory T cells (regulátoros T-sejt)
YPD	yeast extract - peptone - dextrose medium (élesztőkivonat - pepton - glükóz táptalaj)
vt	vad típus

A dolgozatban alkalmazott *Candida* törzsek:

Cpoch1 Δ / Δ *OCH1* deléció *Candida parapsilosis* törzs
Cp vt vad típusú *C. parapsilosis*

2. BEVEZETÉS

Az invazív gombás fertőzések száma az utóbbi évtizedekben jelentősen emelkedett, elsősorban a legyengült immunrendszerű betegek növekvő száma (pl. AIDS, rosszul kezelt diabetes mellitus, szervátültetés miatt), az immunszuppresszív terápia elterjedése, a széles spektrumú antibiotikumok nem megfelelő használata és az antibiotikumokra rezisztens mikroorganizmusok számának növekedése következtében (Brown és mtsi., 2012). Különösen az opportunista humánpatogén gombák által okozott fertőzések esetszámában következett be nagymértékű emelkedés, ezen belül is a *Candida* nemzetség tagjai okoznak kiemelkedően magas számban megbetegedéseket (Kullberg és Arendrup 2015). A leggyakrabban izolált kórokozó, melyet egyben a leginkább virulensnek is tartanak a *Candida albicans*. A felszíni fertőzések mellett a *C. albicans* súlyos, egyéb fertőzéseket is képes okozni, mint például a kandidémiát és disszeminált kandidiázist, melyek akár 50%-os mortalitással is társíthatók (Lamoth és mtsi., 2018).

Az elmúlt két évtizedben a *Candida parapsilosis* egyre fontosabb kórokozóvá vált, mivel jelenleg geográfiai régióktól függően a második vagy harmadik leggyakrabban izolált faj *Candida* fertőzött páciensek vérkultúrájából (Guinea 2014). A *C. parapsilosis* tipikusan a humán bőr kommenzalistája, azonban képes horizontális terjedésre akár kórházi dolgozók kezéről és biofilm létrehozására katétereken és más beültetett orvosi eszközökön, ami növeli a nozokomiális fertőzések kockázatát (Pfaller és Diekema 2007). A *C. parapsilosis* által okozott fertőzések előfordulása különösen aggasztó a kritikusan alacsony születési súlyú újszülöttek körében, mivel az Egyesült Királyságban és Észak-Amerikában az invazív gombafertőzések több mint egynegyedét okozza ebben a korcsoportban (Clerihew és mtsi., 2007; Pammi és mtsi., 2013).

Míg a *C. albicans* a gombafertőzésekre irányuló kutatások egyik leggyakrabban alkalmazott modellorganizmusa, a *C. parapsilosis* által okozott fertőzések immunológiai hátteréről viszonylag kevés ismerettel rendelkezünk. Kutatócsoportunk korábbi eredményei alapján tudjuk, hogy a *C. parapsilosis* sejtfal *N*-mannozilációja befolyásolja a gazda-patogén interakciót és a patogenitást (Perez-Garcia és mtsi., 2016). A *C. parapsilosis*-ban az *OCH1* gén kódolja a α -1,6-mannozil-transzferázt, ami a sejtfal *N*-mannozilációját katalizáló enzim. A gén delécioja a mutáns törzs csökkent fertőzőképességét eredményezi (Perez-Garcia és mtsi., 2016). Kísérleteink során *Drosophila melanogaster*-ben, újszülött és kifejlett egér *in vivo* modellekben jellemeztük a *C. parapsilosis* fertőzést és vizsgáltuk a sejtfal mutáns törzs

csökkent virulenciájának hátterében álló immunreakciókat. Emellett kísérleteink során vizsgáltuk a Dectin-1 receptor szerepét a *C. parapsilosis* felismerésében.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. Az opportunistá patogén gombák által okozott fertőzések jelentősége

A gombafertőzések komoly egészségügyi problémát jelentenek, amelyek nem csak a bőr és nyálkahártya betegségeit vagy az allergiát foglalják magukban, hanem az invazív mikózisokat is, amik sok esetben halálozással is végződhetnek (Benedict és mtsi., 2017). A gomba-asszociált fertőzésekkel járó globális halálozási arány nagyobb, mint a malária és az emlőrák esetében és egyenértékű a tuberkulózis (TBC) és a HIV okozta halálesetekkel (Casadevall és Pirofski 2003; Gow és Netea 2016).

Egyes gombacsoportok képviselői elsődleges, valódi kórokozók az egészséges emberi szervezetre nézve, azonban a legtöbb életveszélyes gombafertőzés elsősorban a legyengült immunrendszerű betegeket érinti. Napjainkban különösen az opportunistá gombafertőzések esetszámában következett be nagymértékű növekedés, amikor is a legyengült szervezetben kórokozóként tűnik fel egy egészséges emberrel szemben nem-patogén gomba (Vallabhaneni és mtsi., 2016). Ez a magas esetszám olyan tényezőkhez kapcsolódik, mint az immunrendszert érintő, különböző rendellenességekben szenvedő betegek számának növekedése (pl. AIDS, leukémia), az immunszuppresszív terápia terjedése, a katéterekkel kezelt betegek növekvő száma és széles spektrumú antibiotikumok alkalmazása (Brown és mtsi., 2012). A szervátültetést igénylő, valamint a cukorbetegségben szenvedő betegek növekvő száma is hozzájárul ehhez a jelenséghez (Higa 2008; Silva, R. F. 2010).

Számos gombafaj köthető invazív fertőzés kialakulásához, melyek megközelítőleg 90%-a sorolható az *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Pneumocystis* vagy *Candida* nemzetségek egyikébe (Brown és mtsi., 2012). A legfrissebb epidemiológiai kutatások alapján a gomba eredetű invazív fertőzések 80%-át különböző *Candida* fajok okozzák, míg az *Aspergillus* nemzetség tagjai 0,3-19%-ban tehetők felelőssé (Bassetti és mtsi., 2017). Bár az új gombaellenes szerek kidolgozása és a jobb diagnosztikai fejlesztések folyamatban vannak (McCarty és Pappas 2016), a jelenleg rendelkezésre álló eszközök és beavatkozások hatása az invazív *Candida* fertőzések okozta halálozási arányokra nem okozott jelentős változást az elmúlt években (Bassetti és mtsi., 2018). Ezért a mikózisok immunológiájával kapcsolatos ismereteink szélesítéséhez és hasznosításához fűződő alapkutatások rendkívül fontosak a mikózisok által okozott klinikai problémák megértésében és kezelésében.

3.2. A *Candida* fertőzések jelentősége és epidemiológiája

A *Candida* nemzetségbe tartozó fajok sokszor kórházi környezetben kialakuló (nozokomiális) fertőzéseket okoznak olyan páciensek esetében, akik súlyos immunhiányos állapotban vannak, invazív kórházi beavatkozásokon estek át vagy valamilyen traumát követően hosszabb időn keresztül történő kórházi kezelésben részesülnek. A beültethető orvostechikai eszközök (kanül, katéter, műbillentyű, endotracheális tubus, ízületi protézis) egyre szélesebb körű alkalmazása is kockázati tényező a fertőzések kialakulásában (Pfaller és Diekema 2007; Brown és mtsi., 2012). A *Candida* fajok egészséges egyénekben jelen vannak a bőrön, a szájüregben, a gasztrointesztinális- és a húgyúti rendszer nyálkahártya felületein. Normális körülmények között az immunrendszer megakadályozza, hogy ez a kommenzalista gomba kórokozóvá váljon. A bőr vagy a nyálkahártya védő funkcióinak sérülése, a mikrobiológiai egyensúlytalanságok vagy az immunrendszer védőmechanizmusainak károsodása mind fokozott érzékenységhez és súlyos mukokután vagy invazív candidiasishoz vezethet (Smeekens és mtsi., 2013).

A nyálkahártyát és bőrt érintő felületi kandidiázis előfordul immunszupprimált állapotban, valamint immunkompetens betegek esetében is. A legtöbb ilyen a bőr, köröm, nyelöcső és genitális traktust érintő *Candida* fertőzés alkalmi, azonban néhány beteg esetében (pl. cukorbeteg) súlyos, visszatérő vagy tartós fertőzés is kialakulhat (ún. krónikus mukokután candidiasis) (Smeekens és mtsi., 2013). Az invazív candidiasis során a kórokozók a véráramba kerülnek (candidémia) és elterjednek a szervezetben (disszeminált candidiasis), illetve egyes szerveket érintő mélyebb fertőzéseket (pl. hepatosplenikus candidiasis) is kialakíthatnak. Így a fertőzés következtében olyan betegségek alakulhatnak ki, mint a szívbelhártya-gyulladás (endocarditis), csontgyulladás (osteomyelitis), hashártyagyulladás (peritonitis) és agyhártyagyulladás (meningitis) (Trofa és mtsi., 2008). Az invazív candidiasis halálozási aránya az 5-70%-ot is elérheti (Bassetti és mtsi., 2018).

Napjainkban hozzávetőlegesen 400 *Candida* fajt ismerünk, melyek közül körülbelül húsznak lehet etiológiai szerepe a candidiasis kialakításában (Williams és mtsi., 2013; Daniel és mtsi., 2014). Habár a *C. albicans* felelős a legtöbb fertőzés kialakításáért, egyre növekvő esetszámot mutatnak az úgynevezett nem-*albicans* (NAC) fajok, úgymint a *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* és *C. auris* által kiváltott megbetegedések is (Pfaller és mtsi., 2014; Bassetti és mtsi., 2018). A NAC fajok elterjedésének legfőbb oka feltételezhetően az azol típusú antifungális szerek (pl. flukonazol) bevezetése a klinikumba és az intravénás katéterek gyakori használata (Guinea 2014; Yapar 2014).

Fontos azonban kiemelni, hogy a *Candida* fajok megjelenése jelentős eltéréseket mutat a földrajzi régió és a betegcsoport függvényében, egyes NAC-fajok klinikai előfordulása pedig bizonyos országokban gyakoribb, mint a *C. albicans*-é (Silva, S. és mtsi., 2012; Guinea 2014).

A *C. glabrata* rezisztens az azol típusú antifungális szerekre és elsősorban idősebb, daganatos, illetve őssejt- és szervtranszplantáción átesett betegekben okoz fertőzést. Megjelenése főleg Észak-Európában és az USA-ban lévő kórházakban jellemző, azonban előfordulásában növekvő trend figyelhető meg Ausztráliában is (Guinea 2014; Chapman és mtsi., 2017).

Ezzel szemben a *C. parapsilosis* fertőzés elsősorban a fiatalabb korcsoportok tagjait, újszülötteket és katéterezett pácienseket érinti, aminek oka, hogy ez a faj képes terjedni az egészségügyben dolgozók kezéről és könnyen kolonizálja a centrális vénás katétereket. Megjelenését Dél-Amerikában, Ausztráliában, valamint Afrika és Európa mediterrán területein (pl. Spanyolország) regisztrálták (1. ábra) (Guinea 2014; Doi és mtsi., 2016; Lamoth és mtsi., 2018).

A *C. tropicalis* a neutropéniás páciensekben és a *C. glabrata*hoz hasonlóan, a rosszindulatú hematológiai daganattal rendelkező betegek körében gyakori (Yapar 2014). Az ázsiai országokban a *C. tropicalis* okozta esetek számában folyamatosan növekvő tendencia figyelhető meg, emellett Indiában és Pakisztánban nagyobb elterjedést mutat, mint a *C. albicans* (Lamoth és mtsi., 2018). A *C. krusei* fertőzés a hematopoetikus őssejt transzplantáción átesett és flukonazol profilaxis kezelésben részesülő leukémiás pácienseket veszélyeztet leginkább, elterjedése a kelet-európai régióra (Csehország, Szlovákia és Lengyelország) jellemző (Pfaller és mtsi., 2008; Yapar 2014). A *C. auris* fertőzésre először 2009-ben Japánban figyeltek fel, azóta gyors terjedésnek indult és mind az öt kontinensen megjelent (Chowdhary és mtsi., 2017; Lockhart és mtsi., 2017). Ez a faj képes kolonizálni a bőrt és kórházi környezetből is kimutatható, ezen túlmenően a *C. auris* gyakran rezisztens az antifungális szerekkel szemben és néhány izolátum multidrog rezisztensnek bizonyult (Chowdhary és mtsi., 2017). Egy közelmúltban megjelent riport szerint 54 *C. auris* izolátum közül 50 (93%) rezisztensnek bizonyult flukonazzal szemben, míg az izolátumok 54%-a vorikonazzal, 35%-a amfotericin B-vel szemben volt ellenálló (Lockhart és mtsi., 2017).

Habár a legtöbb megbetegedésért továbbra is a *C. albicans* felelős, ezek az adatok mindenképpen kiemelik a NAC fajok klinikai fontosságát és felhívják a figyelmet ezen *Candida* fajok patogenitásának és az immunrendszer védőmechanizmusainak megismerésének fontosságára.



1. ábra. A NAC fajok által okozott fertőzések előfordulása földrajzi régióként (Quindos 2014).

3.3. A *C. parapsilosis* klinikai jelentősége

A *C. parapsilosis*t először Ashford izolálta 1928-ban. Bár kezdetben nem tartották patogénnek, 1940-ben, mint kórokozót azonosították egy halálos kimenetelű szívbélhártya gyulladást követően (Trofa és mtsi., 2008). Egyes tanulmányok szerint a *C. glabrata* (Foster és mtsi., 2007), míg más tanulmányok alapján a *C. parapsilosis* a második leggyakoribb okozója az invazív gombafertőzéseknek (Hays és mtsi., 2011). A *C. parapsilosis* klinikai jelentősége, hogy a *C. albicans*szal ellentétben gyakran izolálható a környezetből és horizontális (pl. a kórházi ápolók kezéről a betegekre) terjedésre képes, ami növeli a nosokomiális fertőzések kialakulásának esélyét. Emellett jó biofilm képző képességet mutat különböző implantátumokon, katétereken, illetve egyéb beültethető orvostechnikai eszközökön (Pfaller és Diekema 2007; Trofa és mtsi., 2008). A *Candida* fajok a katéter-asszociált véráramfertőzések harmadik leggyakoribb kórokozói (Hidron és mtsi., 2008). Egy 2017-es tanulmány alapján pedig a katéter-asszociált fertőzések esetén a leggyakrabban izolálható fajok a *C. parapsilosis* fajkomplex tagjai (42,8%), illetve a *C. albicans* (34,7%) (Brunetti és mtsi., 2017).

A *C. parapsilosis* fertőzés általában alacsonyabb mortalitással jár, mint a *C. albicans* által okozott invazív candidiasis. Felnőttek esetében az invazív *C. parapsilosis* fertőzés

átlagosan 25-30% mortalitást mutat, míg a *C. albicans* okozta candidémia 40-50%-os halálozási aránnyal jár (Trofa és mtsi., 2008).

A felszíni és invazív gombafertőzések nagy részét a *Candida* fajok okozzák az újszülött populációban. Bár a *C. albicans* továbbra is a leggyakoribb kórokozója az újszülött invazív candidiasisnak, a NAC fajok közül a *C. parapsilosis* okozta fertőzés gyakran érinti az újszülötteket, különösen az alacsony súllyal világra jött csecsemők körében mutat nagyobb mértékű előfordulást (20%-40%) (Lamoth és mtsi., 2018). A *C. albicans* képes vertikális úton (anyáról gyermekre) terjedni, míg a horizontális terjedés a *C. parapsilosis*-ra jellemző (Saiman és mtsi., 2001). Az újszülöttkori candidiasis következtében a mortalitás a rendkívül alacsony születési súlyú (akiknek súlya 1000 g vagy annál kisebb) csecsemők esetében elérheti a 26%-ot is, az átlag arány pedig 5,4%-18,3% között mozog (Zaoutis és mtsi., 2007). Habár az invazív candidiasis előfordulási gyakorisága ebben a korcsoportban csökkent az utóbbi évtizedben a flukonazol profilaxis használatának köszönhetően (Aliaga és mtsi., 2014), a candidémiából felépülő illetve túlélő páciensek 57%-ában észleltek az idegrendszer fejlődését érintő károsodást még akkor is, ha a gombaellenes kezelés gyors és megfelelő volt (Benjamin és mtsi., 2014).

3.4. A *Candida* nemzetség általános jellemzése

A *Candida* nemzetség tagjai az *Ascomycota* (aszakuszos gombák) törzsének *Saccharomycetales* rendjén belül a *Saccharomycetaceae* (élesztőgombafélék) családjába tartoznak. A nemzetség fajai közül számos izolálható a környezetből (talaj, felszíni vizek) is, míg más tagok kommenzalista életmódot folytatnak magasabbrendű szervezetekkel (ízeltlábúak, emlősök) (Nguyen és mtsi., 2007; Pereira és mtsi., 2013). A csoportba tartozó élesztőgombák többnyire ivartalanul szaporodnak, azonban néhány faj esetében paraszexuális és ivaros szaporodást is leírtak (Butler és mtsi., 2009). A *Candida* fajok között haploid és diploid genommal rendelkező organizmusokat egyaránt találunk. A nemzetségből számos faj az úgynevezett CUG kládba tartozik, azaz a CUG kodon leucin aminosav helyett szerint kódol (Massey és mtsi., 2003). A *Candida* sejtek morfológiájára a kerek vagy enyhén ovális megjelenés jellemző, méretüket tekintve pedig a 2-7 µm-es tartományba tehetőek. Agar lemezen tenyésztve sima, ráncos vagy gyűrött felszínű, fehér vagy enyhén krémszínű telepeket képeznek (Laffey és Butler 2005).

A *Candida* nemzetségben sok dimorf faj található, amelyekre három különböző megjelenési forma jellemző: az élesztő, a megnyúlt élesztő (pseudohifa) és a valódi fonalas (hifa) struktúra. A csoport tagjai közül a *C. albicans*, *C. dubliniensis* és a *C. tropicalis* mindhárom formában előfordul, míg a *C. parapsilosis* és *C. guilliermondii* az élesztő morfológia mellett pseudohifa képzésére képesek, a *C. glabrata* pedig többnyire csak élesztő formában van jelen (Thompson és mtsi., 2011; Lackey és mtsi., 2013; Lastauskiene és mtsi., 2015). Az élesztőszerű és fonalas növekedés közötti váltás képessége a *C. albicans* esetében intenzíven kutatott és fontos virulencia faktorként jellemzik (Jacobsen és Hube 2017). Emellett a *C. albicans* által termelt hidrolitikus enzimek, mint a lipázok és proteázok patogenitásában betöltött szerepe is jól ismert (Monod és Borg-von 2002; Gacser és mtsi., 2007b).

3.5. A *C. parapsilosis* általános jellemzése

A *C. parapsilosis* a normál emberi mikrobiális flóra tagját képezi, azonban előfordul a környezetben is, izolálható például talajból vagy tengervízből (Nosek és mtsi., 2009). A *C. parapsilosisként* azonosított törzsek jelentős genetikai heterogenitást mutattak és ez alapján 1995-ben három csoportra osztották azokat (Lin és mtsi., 1995). További molekuláris vizsgálatok a három csoport három külön fajként történő azonosításához vezettek. 2005 óta *C. parapsilosis sensu stricto*ként (vagy *C. parapsilosis*, korábban I. csoport), *C. orthopsilosisként* és *C. metapsilosisként* (II. és III. csoport) definiáljuk a csoport tagjait (Lin, D. és mtsi., 1995; Tavanti és mtsi., 2005). A három faj virulenciájában jelentős különbségek figyelhetők meg: míg a *C. parapsilosis* felelős a klinikai esetek többségéért, a *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* mindössze 1-10%-ban izolálható fertőzésekből (Lockhart és mtsi., 2008; Bertini és mtsi., 2013). Csoportunk által készített tanulmányok szintén alátámasztották, hogy a fajkomplex tagjai közül a *C. metapsilosis* a legkevésbé virulens (Gacser és mtsi., 2007a; Nemeth és mtsi., 2013).

A *C. parapsilosis* további jellemzője közé tartozik, hogy a *C. albicans*szal ellentétben valódi hifa képzésére nem képes, ugyanakkor pseudohifa képleteket hozhat létre (Nosek és mtsi., 2009). Szintén csoportunk munkája során derült ki, hogy a pseudohifa képző *C. parapsilosis* törzsek jobban ellenállnak a primer humán makrofágok ölümechanizmusainak, és nagyobb gazdasejt károsító hatást mutatnak a kizárólag élesztő morfológiát mutató törzsekhez képest, ami alátámasztja a pseudohifa virulenciában betöltött jelentőségét

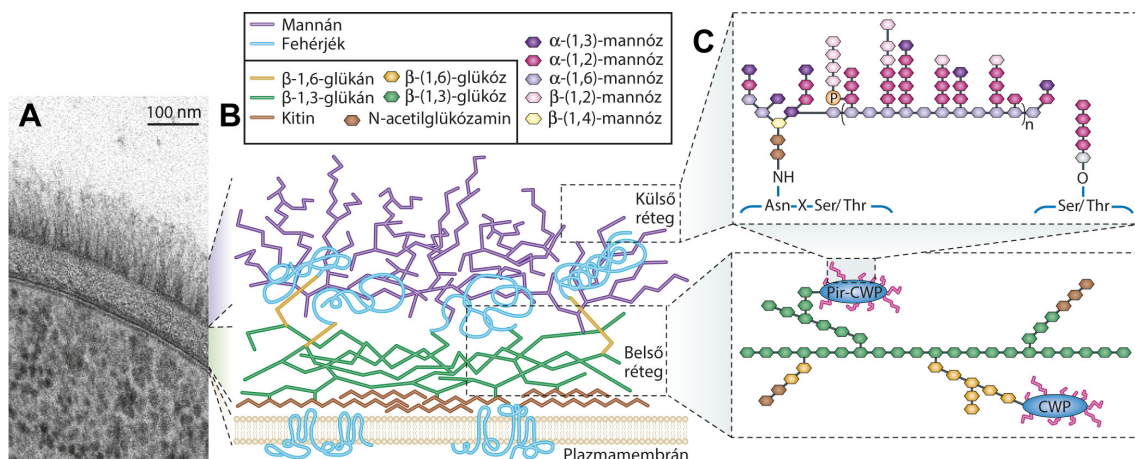
(Nemeth és mtsi., 2013). A *C. parapsilosis* további patogenitási faktoraik közé tartoznak a hidrolitikus enzimek, amelyek közül a lipázokról és az aszpartil proteinázokról bizonyosodott be, hogy szerepet játszanak a gomba virulenciájában (Horvath és mtsi., 2012; Toth, R. és mtsi., 2017). A *C. parapsilosis* könnyen képez biofilmet magas glükóz, illetve lipid tartalmú médiumban, aminek különös jelentősége van parenterális táplálásban részesülő betegek körében. Ezen kívül az intenzív biofilm képzés az előzőekben már említett katétereken, protéziseken és egyéb orvosi eszközökön is megfigyelhető (Trofa és mtsi., 2008; Nosek és mtsi., 2009). A *C. parapsilosis* a CUG kládba tartozik és ivaros szaporodásra nem képes. 2009 óta elérhető a CDC 317 jelű *C. parapsilosis* izolátum teljes genomszekvenciája: a haploid genom mérete 13,1 Mb, és mintegy 5700 ORF-et (nyitott leolvasási keretet) tartalmaz (Shibanoki és mtsi., 1991). Azóta kutatócsoportunk további izolátumok teljes genomszekvenciájának analizisét is elvégezte (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 lehet felfedezni. Egy összehasonlító vizsgálat szerint a *C. parapsilosis* CLIB 214 törzs fehérje szekvenciái 59%-os hasonlóságot mutatnak a *C. albicans*-specifikus megfelelőjükkel, ezen felül találtak olyan fehérjét, ami nincs meg a *C. albicans*ban, de megtalálható a *C. parapsilosis*ban (Nosek és mtsi., 2009). Többek között ezek az adatok is felhívják a figyelmet arra, hogy a *C. albicans*szal folytatott kutatások eredményei fontos alapot szolgáltathatnak, azonban nem teljesen vonatkoztathatóak a *C. parapsilosis*ra.

3.6. A *Candida* gombák sejtfa felépítése

A sejtfa a gazda-patogén interakció első színtere, így a szerkezete nagyban befolyásolja a gombasejtek érzékelését és a kiváltott immunválaszt. A legtöbb ismeretanyag a *C. albicans* sejtfa szerkezetéről áll rendelkezésünkre, azonban a többi *Candida* faj sejtfa is hasonló felépítést mutat (Gow és mtsi., 2017).

A sejtfa három fő poliszacharidból, kitinből, glükánból és mannánból áll. A *C. albicans*ban ezek a poliszacharidok két réteget alkotnak: a belső a kitint és a β -glükánt tartalmazó réteg, amelyet a külső réteg erősen mannozilált fehérjéi borítanak (Gow és mtsi., 2017) (2.B. ábra). A kitin egy β -1,4-*N*-acetilglükózaminokból álló poliszacharid és fontos szerepet tölt be a sejtfa rigiditásában és a fizikai stresszel szembeni ellenállásban. A kitinre épülő β -glükán vázat a lineáris felépítésű β -1,3-glükán és a rövidebb β -1,6-glükán oldalláncok alkotják (Brown és Gordon 2005). A sejtfa egyes komponensei kovalens

kereszt-kötésekkel kapcsolódnak egymáshoz. *C. albicans* esetében a β -1,3-glükán kapcsolódik a kitinhez és a β -1,6-glükánhoz. A β -1,6-glükán pedig, mint kapcsoló molekula működik és a külső réteget alkotó mannoproteineket és a β -1,3-glükán-kitin vázat köti össze glikozilfoszfatidil-inozitol (GPI) horgonnyal. A külső sejtfalréteg fehérjéit kovalens kötésen keresztül módosíthatják a mannózban gazdag oligoszacharidok, amelyek aszparagin (*N*-kapcsolt mannán) és szerin vagy treonin (*O*-kapcsolt mannán) láncokhoz kapcsolódnak (Klis és mtsi., 2001; Mora-Montes és mtsi., 2009; Mora-Montes és mtsi., 2010) (2.C. ábra). Az *O*-kapcsolt oligoszacharidok rövid, lineáris α -1,2-oligomannánokból állnak (Bates és mtsi., 2006). Az *N*-kapcsolt mannánok elágazó struktúrával rendelkeznek és elsősorban α -1,6-mannóz láncok alkotják, amelyekhez α -1,2-oligomannóz oldalláncok kapcsolódnak és gyakran β -1,2-kapcsolt mono-, di-, tri, vagy tetramannán molekulákkal végződnek (Shibata és mtsi., 2007). Emellett az *N*-mannán eloszlása a sejtfalban különbözik a *C. albicans* élesztő és hifa alak között. Kevesebb mennyiségű foszfodiészter kötést tartalmazó β -1,2-oligomannán és kevésbé elágazó α -1,6-kötött mannózt találhatunk a hifában, mint az egysejt alakban (Shibata és mtsi., 2007). Továbbá a sejtfelszíni mannoproteinek olyan enzimeket is tartalmaznak, amelyek fontos szerepet játszanak a sejtfal biogenezésében, az adhézióban és a biofilm képzésben, befolyásolva ezzel a gomba patogenitását (Hoyer 2001; Dunkler és mtsi., 2005; Nobile és mtsi., 2006).



2. ábra. A *C. albicans* sejtfal elektronmikroszkópos felvétele és sematikus ábrázolása felépítése (Gow és mtsi., 2011) alapján módosítva.

3.7. A természetes immunválasz elemei a gombafertőzések során

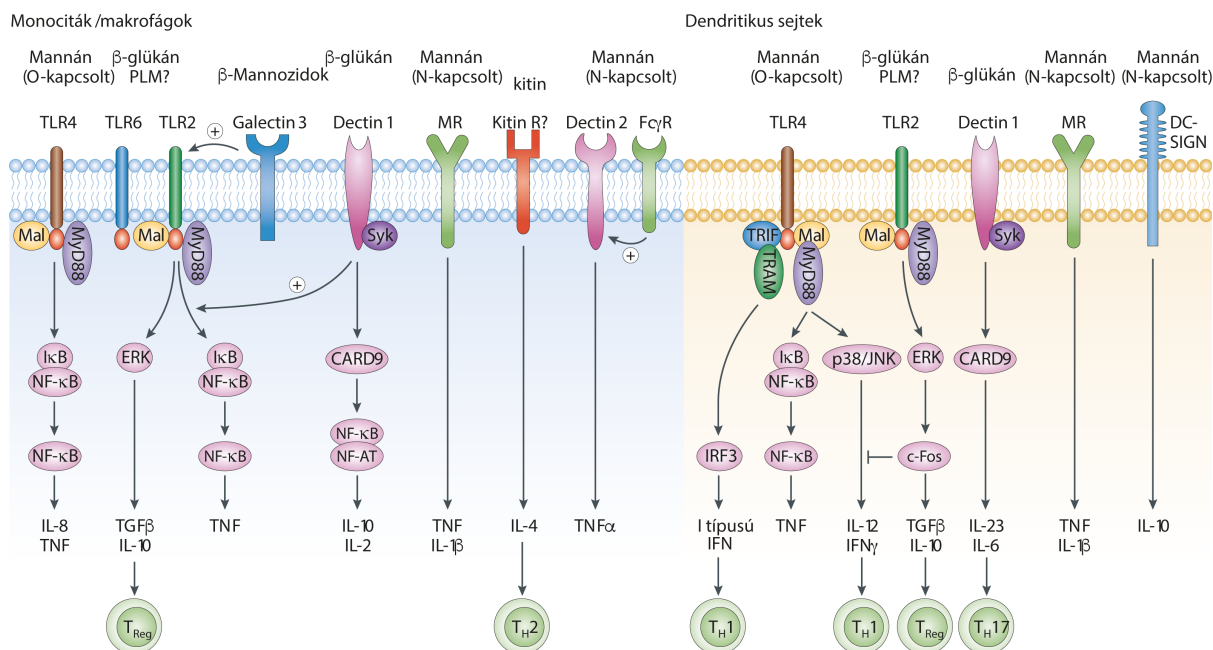
A természetes immunrendszer központi jelentőségű abban, hogy képesek vagyunk ellenállni az opportunist gombafertőzéseknek. Míg az adaptív immunrendszer egyértelműen fontos a fertőzések elleni védelemben, annak hatásait nagyrészt a természetes immunrendszer mechanizmusai segítik elő.

3.7.1. A mintázatfelismerő receptorok

Charles Janeway 1989-es cikke alapján vezették be a mintázat felismerő receptorok (pathogen recognition receptors, PRR) fogalmát (Janeway 1989). A gomba sejtfal alkotóelemei, mint a mannoпротеinek, kitin és β -glükán patogén-asszociált molekuláris mintázatok (pathogen associated molecular patterns, PAMPs), amelyek ligandumként szolgálnak a gazdaszervezet evolúciósan konzervált mintázatfelismerő receptorai számára (Janeway 1989).

A PRR-ek a fertőzések elleni első védelmi vonalat jelentik, ugyanis a természetes immunrendszer elemeiként képesek felismerni a betolakodó mikroorganizmust, majd pedig szabályozni az immunválasz folyamatait (Salazar és Brown 2018). A PRR-ek négy nagy családba sorolhatók, 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) (Salazar és Brown 2018).

Az immunrendszer kórokozókka történő találkozása számos PRR egyidejű stimulációját okozza és a különböző receptoroktól származó jelek összehangolva alakítják ki a megfelelő biológiai választ (Dambuza és mtsi., 2017) (3. ábra).



3. ábra. A főbb mintázattfelismerő receptorok (PRR), amelyek részt vesznek a *C. albicans* fertőzés során a patogén-asszociált molekuláris mintázatok (PAMP) felismerésében (Gauglitz és mtsi., 2012) alapján.

3.7.1.1. A Toll-szerű receptorok (TLRs)

A TLR-eket több mint 2 évtizeddel ezelőtt azonosították *Drosophila melanogaster*-ben és felfedezték, hogy a Toll gén szerepet játszik a gombafertőzések elleni védekezésben (Lemaitre és mtsi., 1996). A Toll receptorok emlős homológjai a Toll-szerű receptorok. Egérben 12 (TLR1-9 és TLR11-13), míg emberben 10 (TLR1-10) funkcióképes tagja található meg. A TLR1-9 konzervált az egér és humán szervezetben (Kumar és mtsi., 2011). A TLR-ek I-es típusú transzmembrán proteinek, amelyeknek az extracelluláris doménje leucin-gazdag ismétlődéseket (leucin rich repeats, LRR) tartalmaz és a specifikus PAMP-ok felismerését végzi. A receptorok citoplazmatikus régiója TIR (Toll/interleukin-1 receptor) domént tartalmaz, ami a szignalizáció elindításáért felelős (Kawasaki és Kawai 2014).

A TLR-ek elhelyezkedésük alapján is osztályozhatóak: a TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 és TLR10 a sejtfelszínen expresszálódik, míg a TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11, TLR12 és TLR13 endoszómális lokalizációt mutat (Kawasaki és Kawai 2014). A sejtfelszíni TLR-ek elsősorban mikrobiális sejtfal és membrán komponenseket (lipopeptidek, peptidoglikán, lipopoliszacharid, mannán és flagellin) ismernek fel, míg az intracelluláris

TLR-ek elsősorban bakteriális és virális nukleinsavak érzékelésére képesek (Kawasaki és Kawai 2014).

Ezek a receptorok képesek homo- vagy heterodimert alkotni a ligand kötése során, ami a TIR domén tartalmú adaptor fehérjék, mint a MyD88 (myeloid differentiation primary response 88) és a TRIF (TIR domain-containing adapter-inducer interferon- β) kötéséhez vezet (Dambuza és mtsi., 2017). Így az adaptor molekulától függően a TLR jelátvitel két útvonalon történhet: a MyD88 függő és a TRIF függő útvonalon (Dambuza és mtsi., 2017).

A MyD88 adaptor fehérje komplexet formál az interleukin-1 receptor-asszociált kinázokkal (IRAK1 és IRAK4). Az IRAK1 kötődik a TRAF6-tal (tumor necrosis factor receptor-associated factor 6). A TRAF6 elősegíti a TAK1 (transforming growth factor- β -activated protein kinase 1), majd az IKK (I κ B kinase) komplex kialakulását, ami végül az NF κ B (nuclear factor κ B) transzkripciós faktor aktivációjához vezet. A TAK1 működése során aktiválhatja a MAP kináz család tagjait, mint az ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase), a p38 (mitogen-activated protein kinase) és JNK (c-Jun N-terminal kinase), amelyek az AP-1 (activator protein 1) transzkripciós faktort szabályozzák. Az AP-1 aktivációja növekedési faktorok, citokinek és kemokinek termelődését indukálja (Kawasaki és Kawai 2014). A TRIF függő, vagyis a MyD88 független útvonal a TLR3 és TLR4 receptorra jellemző, és az IRF3 (interferon regulatory transcription factor) és az NF κ B aktivációjához is vezet, ami a gyulladásos citokinek és az I-es típusú interferonok termelődését váltja ki (Kawasaki és Kawai 2014).

Számos tanulmány támasztja alá, hogy a TLR-ek, elsősorban a CLR-ekkel együttműködve képesek a gombaellenes immunválasz kiváltására. Jelentőségüket továbbá az is igazolja, hogy a MyD88 deficiens egerek érzékenyek a *C. albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans* és *Histoplasma capsulatum* fertőzésre (Drummond és mtsi., 2014). A TLR2 és TLR6 képes heterodimert kialakítva a *C. albicans* foszfolipomannánok felismerésére és gyulladásos mediátorok termelésének indukciójára makrofágokban (Jouault és mtsi., 2003). Meg kell jegyezni azonban, hogy ellentétes tanulmányok is születtek a TLR-ek specifikus szerepéről a gombaellenes immunitásban. Disszeminált candidiasis során a TLR2 mutáns egerek szenzitívnek bizonyultak, amit a gyulladásos citokinek csökkent termelése és a neutrofil aktivációban lévő defektusok jelenléte jellemzett (Villamon és mtsi., 2004). Egy másik tanulmány pedig arról számolt be, hogy a TLR2 hiánya növelte a *C. albicans* elleni rezisztenciát egerekben, ami emelkedett immunsejt aktivációval párosult (Netea és mtsi., 2004). Ezek az eredmények valószínűleg az eltérő egér modell és a különböző *Candida* törzsek használatán alapulhatnak (Salazar és Brown 2018).

A TLR4 receptor mononukleáris sejteken és makrofágokon található és képes kötődni a *C. albicans* sejtfal O-kapcsolt mannánjához. *In vivo* kísérletekben, a *tlr4*^{-/-} egerek alacsony szintű neutrofil infiltrációt mutattak, mindemellett nem voltak képesek kontrollálni a *C. albicans* terjedését a lépben és nyirokcsomókban (Gasparoto és mtsi., 2010). További kísérletek azonban bizonyították, hogy a receptor *in vivo* szerepe *C. albicans* fertőzés szabályozásában törzsfüggő, ami a gomba törzsek eltérő sejtfal szerkezetével magyarázható (Netea és mtsi., 2010). Egészséges emberekben a MyD88 jelátvitel defektusa nem okoz fogékonyságot a gombafertőzésekre, azonban polimorfizmus számos TLR-ben, mint a TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR6 és TLR9 érzékenységet vált ki immunhiányos egyéneknél. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a humán gombaellenes immunválasz kialakításában elsősorban nem a TLR-ek szükségesek, de immundeficiencia esetében szerepük nyilvánvaló (Dambuza és mtsi., 2017).

3.7.1.2. A C-típusú lektin receptorok (CLR)

A CLR-ek diverz és a legnagyobb családját képviselik a lektineknek. Mindegyik receptor legalább egy szénhidrát felismerő domént (carbohydrate recognition domain, CRD) hordoz, amit a családra jellemzően C-típusú lektinszerű doménnek (C-type lectin-like domain, CTLD) neveznek. A C-típusú elnevezés onnan ered, hogy ezek a receptorok Ca^{2+} -ot igényelnek a szénhidrát felismerésekor. Ismert azonban, hogy nem minden CLR számára szükséges a Ca^{2+} a ligand kötések, ezek a receptorok többféle exogén és endogén ligandot, fehérjéket és lipideket is képesek felismerni (Zelensky és Gready 2005).

A Dectin-1 (vagy más néven CLEC7A) az egyik legjobban jellemzett CLR (Tang és mtsi., 2018). Elsősorban a mieloid eredetű immunsejtek felszínén expresszálódik, mint a monociták, a makrofágok, a neutrofilek és a dendritikus sejtek, de a B- és a T-limfocitákon, illetve humán eozinofileken is megtalálható (Taylor és mtsi., 2002; Reid és mtsi., 2004; Brown és mtsi., 2006). A receptor extracelluláris része egyetlen CTLD-t tartalmaz, míg az intracelluláris domén régióban egy ITAM-szerű (immunoreceptor tirozin-alapú aktivációs motívum) motívum található, amely a szignalizáció elindításáért felelős (Brown és mtsi., 2007). A Dectin-1 aktivációja függ a β -glükán polimerek hosszúságától, a receptor CRD része a minimum hét glükóz egységből álló β -1,3-glükán fragmentumokat ismeri fel, emellett egyetlen β -1,6-kapcsolt oldallánc a β -1,3-glükán polimeren is megerősíti a receptor affinitását (Adams és mtsi., 2008). A receptor-ligandum kötődés elindítja az ITAM-szerű motívum

foszforilációját az Src családba tartozó kinázok által, ami kötőhelyet biztosít a Syk (lép-tirozin kináz) számára. A Syk egy kulcsfontosságú kináz, amely további szignáltranszdukciós faktorok aktivációján keresztül szabályozza a citokin és a ROS (reaktív oxigén gyökök) termelést (Brown és mtsi., 2006; Plato és mtsi., 2013). A Syk a CARD9 (caspase recruitment domain 9)-BCL10 (B cell lymphoma 10)-MALT1 (mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1) komplex aktivációját is kiváltja, ami a kanonikus és nem-kanonikus NF κ B útvonalat is indukálhatja (Gross és mtsi., 2006; Dennehy és mtsi., 2008; Plato és mtsi., 2013). A Dectin-1 a Syk-függő, de CARD9 független útvonalon a MAP kinázok (p38, ERK, JNK) aktivációját is kiváltja, ám ennek az útvonalnak a pontos lépései még nem teljesen tisztázottak (Slack és mtsi., 2007). Emellett a receptor képes a Syk-független módon, a Raf1 szerin-treonin kinázon keresztül is szignál indukcióra, ami az NF κ B aktiválás pontján kapcsolódik a Syk útvonalhoz (Gringhuis és mtsi., 2009; Tang és mtsi., 2018). A Dectin-1 számos immunfolyamat szabályozásban vesz részt, mint például a leukociták fagocitózisa, a TLR9 receptorok toborzása a fagolizoszómához, a fagolizoszóma érése, az autofágia és ROS termelődésének indukciója (Goodridge és Underhill 2008; Tam és mtsi., 2014). A receptor ugyanúgy fontos szabályozója a lipid mediátorok és a gyulladást serkentő kemokinek/citokinek szekréciójának. Azonban az, hogy a Dectin-1 közvetlenül képes ezen válaszok elindítására sejttípus-függőnek bizonyult, illetve ezek a folyamatok más MyD88-kapcsolt TLR (TLR2, TLR4, TLR5, TLR7, TLR9) receptorokkal való együttműködést igényelhetnek vagy szinergisztikus módon felerősíthetik a kiváltott immunfolyamatot (Gantner és mtsi., 2003; Dennehy és mtsi., 2008; Alvarez és mtsi., 2010). Kiváló példa erre, hogy dendritikus sejtekben a Dectin-1 útvonal közvetlenül képes indukálni a TNF α (tumor necrosis factor α) termelődését, míg makrofágokban a citokin indukciójához a TLR2 receptor aktivációja is szükséges (Dennehy és mtsi., 2008; Ferwerda és mtsi., 2008). Szintén bizonyított, hogy a Dectin-1 mediált útvonalak képesek befolyásolni olyan citokinek termelődését, amelyek hatással vannak az adaptív immunválasz polarizáltságára és függetlenek a TLR-ek jelátvitelétől (Gringhuis és mtsi., 2009; Gringhuis és mtsi., 2011). A receptor hatása az adaptív immunválasz irányára azzal magyarázható, hogy képes a dendritikus sejtek érését és ezáltal azok citokin termelését szabályozni (LeibundGut-Landmann és mtsi., 2007). Ezeket a válaszokat az is befolyásolhatja, hogy a Dectin-1 közvetlen kapcsolatot képes kialakítani a limfocitákkal, ugyanis eredetileg a dendritikus sejtek felszínén lévő kostimulációs molekulaként azonosították, amely képes kötődni a T-sejtek felszínén lévő ismeretlen endogén ligandhoz (Ariizumi és mtsi., 2000).

Az adaptív immunitás mellett, a receptornak szerepe van a természetes immunmemória vagy “képzett immunitás” (trained immunity) kialakításában a monociták epigenetikus újraprogramozása során (Quintin és mtsi., 2012; Cheng és mtsi., 2014). Kimutatták, hogy a *C. albicans* sejtfalból származó β -glükán molekulák a monocitákban a Dectin-1/Raf-1 útvonalon fokozott és tartós módon indukálják olyan jelátviteli molekulák aktiválódását, mint például a p38 (Quintin és mtsi., 2012), ami az epigenetikus hiszton módosulások kialakulásán keresztül emelkedett proinflammatorikus citokin termelődéshez és az antifungális mechanizmusok nagyfokú iniciációjához vezet (Quintin és mtsi., 2014).

Az utóbbi években számos tanulmány fókuszált a Dectin-1 receptor és a *C. albicans* β -glükán kapcsolatára, így ez a gazda-patogén interakció részletesen jellemzett. *In vitro* kísérletek bizonyítják, hogy a Dectin-1-nek fontos szerepe van a *C. albicans* fertőzések során a fagocitózis és ROS termelődés, az arachidonsav metabolitok és citokin szekréció szabályozásában (Suram és mtsi., 2006; Taylor és mtsi., 2007; Heinsbroek és mtsi., 2008). A receptor jelentőségét a *C. albicans* fertőzés elleni védekezésben Dectin-1 deficiens egerekkel történt kísérletek is kiemelik. A Dectin-1^{-/-} egerek magasabb mortalitást és szervkolonizáltságot mutattak a patogénnel történt szisztémás fertőzés során, ami csökkent citokin termeléssel és károsult neutrofil-mediált gombaöléssel párosult (Taylor és mtsi., 2007). Makrofág-specifikus Dectin-1 deficiens egerek fertőzésekor is bebizonyosodott, hogy a receptor fontos eleme a gomba fagocitózisának és részt vesz a gombafertőzés kontrollálásában (Gales és mtsi., 2010). Mindemellett az is világossá vált, hogy a receptor szerepe a *C. albicans* által kiváltott immunválaszban törzsspecifikus, amire magyarázatul szolgálhat, hogy a gomba törzsek eltérést mutatnak a sejtfalösszetételben és az adaptációs képességekben (Marakalala és mtsi., 2013).

A Dectin-1 szerepe a *C. albicans* fertőzés következtében kialakult adaptív immunválasz szabályozásában még nem teljesen tisztázott. Egér modellben szisztémás fertőzést követően a Dectin-1 nem bizonyult esszenciálisnak az IL-17 (interleukin-17, lsd. később) citokin termelődés kiváltásában (LeibundGut-Landmann és mtsi., 2007), azonban kimutatták, hogy bőr fertőzés modellben a receptor azon hatása, hogy szabályozza a T-sejt differenciációt, függ a gomba morfológiájától (a β -glükán kifejeződéstől a sejtfalban) és a dendritikus sejtekkel történő interakciótól (Kashem és mtsi., 2015).

Egy 2009-ben megjelent publikáció alapján kiderült, hogy emberben a Dectin-1 hiánya (polimorfizmus a humán Dectin-1 génben, Y238X aminosav szubsztitúció) fokozza a

fogékonyságot a gombafertőzésekre, ami krónikus *Candida* bőr- és nyálkahártya fertőzést okozhat (Ferwerda és mtsi., 2009).

A Dectin-2 (CLEC4n) elsősorban mieloid eredetű sejteken, monocitákon, szöveti makrofágokon, dendritikus sejteken és neutrofileken található és expressziója megemelkedik a gyulladásos folyamatok során. A *C. albicans* sejtfalában a β -kapcsolt mannán végek elfedik az α -1,2-mannán szerkezetet, azonban a Dectin-2 receptor CRD része képes felismerni ezt a specifikus struktúrát (Brown és Crocker 2016). Fontos megjegyezni, hogy a Dectin-2 szerkezete hasonló a Dectin-1-éhez, azonban ennek a receptornak nincs citoplazmatikus jelátvivő motívuma, így a szignál továbbításához más receptorokkal kell kapcsolatot létesítenie (Brown és Crocker 2016). Kimutatták, hogy képes heterodimer formát kialakítani a Dectin-3 (CLEC4D vagy MCL) receptorral, ami képes az α -mannán felismerésére, és így elindítani a celluláris szignál kaszkádot (Zhu és mtsi., 2013). Dectin-2 deficiens egerek szenzitivitást mutattak *C. albicans* és *C. glabrata* fertőzésre, ami magában foglalja a csökkent túlélést, az emelkedett vese kolonizációt és a csökkent citokin termelődést (Ifrim és mtsi., 2014; Ifrim és mtsi., 2016).

A Dectin-3 receptor elsősorban mieloid eredetű sejteken expresszálódik, azonban megtalálható B sejteken is. *In vitro* *C. albicans* fertőzés során indukálja a protektív immunválaszt, mint a fagocitózis, az ölési folyamatok és a gyulladás-serkentő citokinek termelése (Brown és Crocker 2016). A Dectin-3 mutáns egerek magasabb mortalitást és vese kolonizációt mutattak *C. albicans*-szal történt intravénás fertőzés után, ami alátámasztja a Dectin-2/Dectin-3 heterodimer fontosságát az α -mannán felismerésében (Wells és mtsi., 2008; Zhu és mtsi., 2013).

A DC-SIGN (dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3- grabbing non-integrin vagy CD209) receptorról ismert, hogy képes kötni az *N*-mannánokat (Cambi és mtsi., 2008). A citoszólikus doménben megtalálható internalizációs motívumok alapján a DC-SIGN, mint endocitotikus receptor működik és elsősorban olyan professzionális antigén prezentáló sejtek felszínén található, mint a makrofágok és dendritikus sejtek (Barreto-Bergter és Figueiredo 2014). A DC-SIGN szerepet játszik a patogének bekebelezésében, a *C. albicans* sejtek kötését a mannóz receptorral együttműködve végzi (Cambi és mtsi., 2003).

A mannóz receptor (mannose receptor, MR vagy CD206) a CLR családba tartozó I-típusú transzmembrán protein. Nyolc CTLD-t tartalmaz és a terminális mannóz struktúrákat, az α -mannózt ismeri fel. Elsősorban fagociták felszínén expresszálódik, azonban proteolitikus hasítást követően szolubilis formája is megtalálható (Barreto-Bergter és

Figueiredo 2014). Az MR szerepet játszik a *Candida* sejtek fagocitózisában és humán keratinocita sejtek ölési mechanizmusában (Snarr és mtsi., 2017). Kimutatták, hogy egér makrofágokban az MR szolubilis formává történő hasítását növeli a Dectin-1 β -glükán általi aktivációja és a mannóz receptor a fagoszóma kialakulásának későbbi állapotában vesz részt (Heinsbroek és mtsi., 2008). Az MR rövid intracelluláris domént tartalmaz és nem rendelkezik ismert szignál motívummal, ami a citokinek génexpressziójához vezethetne, így más CLR és TLR receptorokkal együttműködve indukálja ezen hírvivő molekulák termelődését (Netea és mtsi., 2006). Szintén megfigyelték, hogy az MR deficiens egerek nem mutatnak érzékenységet *C. albicans*szal szemben (Lee és mtsi., 2003).

Az epidermiszben és a nyálkahártyákon található Langerhans sejtek (Langerhans cells, LCs) a felszínükön langerint expresszálnak, ami szintén a CLR-ek közé tartozik. Ez a receptor képes a mannóz és a β -glükán kötésére és a különböző *Candida* fajok felismerésére, mint a *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* és *C. krusei* (de Jong és mtsi., 2010; De Jesus és mtsi., 2015).

A szolubilis galaktóz-specifikus lektin, a Galectin-3 (korábban Mac-2, ϵ BP vagy CBP30/35) az S-típusú lektinek közé tartozik és specifikitást mutat az *N*-mannán β -1,2-mannán oldalláncának kötésében. Emellett a β -glükán aktivált Dectin-1 jelátvitelt is befolyásolhatja, ugyanis képes közvetlen kapcsolatot létesíteni a Dectin-1 receptorral. Ennek ellenére ellentmondásos eredmények is születtek a Galectin-3 *in vivo* szerepét illetően. Egy 2017-es publikáció alapján a Galectin-3 deléciója egerekben emelkedett rezisztenciát okozott a *C. albicans* fertőzésre és az intracelluláris Galectin-3 gátolta a Syk útvonalat neutrofil granulocitákban, ami a gomba elleni csökkent ROS termelődéshez vezetett ezekben a sejtekben (Wu és mtsi., 2017). Ezek az eredmények ellentmondanak egy korábbi tanulmánnyal, ahol azt találták, hogy a Galectin-3^{-/-} egerek magasabb mortalitást mutattak a *C. albicans*, és magasabb szerv kolonizáltságot a *C. parapsilosis* fertőzést követően (Linden és mtsi., 2013a). Egyelőre a molekuláris mechanizmusok, amelyek az ellentétes eredmények hátterben állhatnak, még nem tisztázottak, azonban nem zárhatjuk ki, hogy a Galectin-3 szerepe a gombaellenes immunválasz szabályozásában függ a receptor intracelluláris és extracelluláris kifejeződésétől (Dumic és mtsi., 2006).

A mannóz-kötő lektin (Mannose-binding lectin, MBL) szintén fontos receptora a *C. albicans* mannánnak. Az MBL a kollektinek osztályába tartozó szolubilis lektin és olyan glikoproteineket ismer fel, amelynek terminális cukor molekulája mannóz, fruktóz, glükóz vagy N-acetilglükózamin. Az MBL affinitást mutat az élesztő és a hifa alakhoz is, emellett

közvetlen képes gátolni a *C. albicans* növekedését és indukálja a hifa agglutinációját (Lillegard és mtsi., 2006). A szénhidrát kötés következtében az MBL az MBL-asszociált szerin-proteázokkal (MASP) képez komplexet, majd pedig komplement aktivációt indukál (Holmskov és mtsi., 1994). Az MBL és más szérum fehérjék által formált komplex kialakulása (MBL komplexek, pentraxin-3 vagy szérum amiloid P) elindítja a *C. albicans* élesztő sejtek C4 és C3b-mediált fagocitózist és a komplement mediált ölési folyamatokat a C1q faktor depozícionálásával (Ip és Lau 2004). Ezenfelül a humán MBL gén polimorfizmusa fokozza az érzékenységet a vulvovaginális *Candida* fertőzésekre (Nedovic és mtsi., 2014).

A komplement receptor 3 (Complement receptor 3, CR3, korábban ismert néven Mac-1 vagy integrin $\alpha_M\beta_2$) is hozzájárul a gombaellenes válasz kialakításához a β -1,6-glükán kötése során (Rubin-Bejerano és mtsi., 2007). Egér csontvelő eredetű neutrofilekkel történt kísérletekben a CR3 receptor kifejeződése emelkedést mutatott a β -glükán-Dectin-1 ligandum-receptor kötődés hatására, ami fokozott fagocitózist indukált. Szintén a receptor fontosságát mutatja, hogy a CR3-deficiens egerek magasabb mortalitást és kolonizáltságot mutattak a vad-típusú kontrollhoz képest *C. albicans* fertőzést követően (Li és mtsi., 2011).

3.7.1.3. A RIG-szerű receptorok (RLR)

Az RLR-ek (retinoic acid-inducible gene-I-like receptors) intracelluláris receptorok és szerepüket a virális fertőzések során írták le. Az RLR-ek olyan jelátvitel útvonalakat regulálnak, amelyek elősegítik az I- és III típusú IFN-ok termelődését (Dambuza és mtsi., 2017). Dendritikus sejtekben az I típusú-IFN válasz kulcsszerepűnek bizonyult a *C. albicans* elleni védekezésben, az interferonok termelődéséhez szükségesek voltak a Dectin-1 és TLR7/TLR9 aktivációja által szabályozott útvonalak (Bourgeois és mtsi., 2011; del Fresno és mtsi., 2013). Az MDA5 (melanoma differentiation-associated protein 5) receptor is érintett a *C. albicans* elleni védekezésben, habár a ligand, ami aktiválja a receptort még nem ismert; az MDA5 deficiencia csökkent citokin választ okozott egér és humán sejtekben is (Jaeger és mtsi., 2015).

3.7.1.4. A NOD-szerű receptorok (NLR)

Az NLR-ek citoplazmatikus receptorok, amelyeket az N-terminális effektor domén, a centrális NOD (nucleotide-binding and oligomerization domain) és a PAMP-ok kötéséért felelős C-terminális és leucin gazdag ismétlődéseket tartalmazó domén jellemez. Négy alcsaládja ismert, amelyeket az N-terminális domén alapján osztályoznak. Eredetileg bakteriális fertőzések során írták le szerepüket, azonban az inflammaszóma kialakításában részt vevő NLR-eknek is meghatározó a funkciójuk a gombaellenes immunválaszban (Dambuza és mtsi., 2017). A *C. albicans* és *C. parapsilosis* fertőzés során kialakuló inflammaszóma aktivációról Dr. Tóth Adél részletesen írt doktori tanulmányában (Tóth 2016). Az NLR-ek részt vesznek a kitin-mediált válaszok közvetítésében is. Egy tanulmány alapján a *C. albicans*ból izolált kitin közvetlenül növelte az IL-10 gyulladáscsökkentő citokin termelődését humán mononukleáris sejtekben, ahol megfigyelték, hogy a citokin szekréciója az MR, TLR9 és NOD2 receptorok által mediált folyamat (Wagener és mtsi., 2014).

3.7.2. A természetes immunválasz sejtjes elemei: neutrofil granulociták, monociták/makrofágok, dendritikus sejtek

A természetes immunválasz fő sejtjei, amelyek felismerik a támadó patogéneket, a vérben keringő monociták és neutrofilek, valamint a makrofágok és a dendritikus sejtek a szövetekben. A fertőzés akut fázisában a neutrofilek az első sejtek, amelyek a fertőzés helyére vándorolnak. A neutrofil granulocita sejtek felszínén alacsony szinten expresszálódnak a TLR-ek, azonban membránjukon nagy számban vannak jelen a CR3 és Fc γ fagocitotikus receptorok (Netea és mtsi., 2008). A neutrofilek kulcsszerepet játszanak a védekezésben, mivel közvetlenül támadják a patogént három különböző folyamatot alkalmazva. Az első mechanizmus a fagocitózis, azaz a mikroorganizmus felvétele, intracelluláris elpusztítása és emésztése. A bekebelezett patogént tartalmazó fagoszómák lizoszómákkal fuzionálnak és különböző hidrolitikus enzimek, antimikrobiális peptidek és ROS termelődés segítségével történik meg a patogén elpusztítása (Becker és mtsi., 2015). A ROS képződésében fontos szerepet játszik a NADPH-oxidáz enzimkomplex, amely a fagoszóma membránjában szerelődik össze. A NADPH-oxidáz a molekuláris oxigént szuperoxiddá alakítja, majd ebből további reaktív intermedierek (hidrogén-peroxid, hidroxil gyök) képződnek (Amulic és mtsi., 2012). A másik fontos mechanizmus a degranuláció, amely során a granulumban tárolt antimikrobiális fehérjék (mieloperoxidáz, defenzinek,

katepszinek) kibocsátásával a szöveti környezetben, extracellulárisan történik a betolakodó mikroorganizmus elölése (Becker és mtsi., 2015). A harmadik a neutrofil extracelluláris csapdák (neutrophil extracellular traps, NETs) létrehozásának folyamata ("NETózis"). A NET a sejtekből származó DNS és antimikrobiális fehérjekomplexekből áll, ami a fagocitózishoz túlságosan nagy hifa képletek elpusztítása során alakulhat ki (McCormick és mtsi., 2010). Kimutatták például, hogy a *Candida* sejteket a NET képes rögzíteni, azonban nem járul hozzá a hatékony gombasejt öléshez (Menegazzi és mtsi., 2012). A neutrofilek szerepét a kórokozók elleni védelemben az is kiemeli, hogy a neutropéniában szenvedő betegek fogékonyak a gombafertőzésekre (Walsh és Gamaletsou 2013).

További sejtek, mint a monociták és a szövetekben található makrofágok is nélkülözhetetlen szerepet játszanak a PAMP-ok felismerésében, a fagocitózisban és a hatékony gombaellenes védelem első lépéseinek közvetítésében (Qin és mtsi., 2016). A szöveti rezidens makrofágok kulcsfontosságú effektorsejtek, amelyek gyulladásos citokineket és kemokineket (leginkább TNF α , IL-1 β [interleukin-1 β], IL-6 [interleukin-6]) termelnek, ami hatására más immunsejteket toboroznak és aktiválnak a fertőzés helyén (Netea és mtsi., 2015). Emellett ezek a folyamatok az adaptív immunválaszra, a T sejtek polarizációjára is hatással vannak (Romani 2011; Qin és mtsi., 2016). A makrofágok jelentőségét *Candida* fertőzés esetében korai *in vivo* vizsgálatok is igazolták. A makrofág deficiens egerek szöveteiben erőteljes *C. albicans* proliferációt és az állatok megnövekedett mortalitását tapasztalták (Qian és mtsi., 1994). Új bizonyítékok azt mutatják, hogy a *Candida* stimulus a makrofágok proinflammatorikus fenotípusból (M1, klasszikusan aktivált makrofágok) gyulladásgátló fenotípussá (M2, alternatív módon aktivált makrofágok) való differenciálódását eredményezheti, ami egyrészt elősegítheti a gomba túlélését, másrészt azonban része lehet a gazda szervezetben a fertőzés okozta károsodás csökkentésére irányuló folyamatoknak (Reales-Calderon és mtsi., 2014).

A dendritikus sejtekről ismert, hogy központi szerepet játszanak számos folyamatban, mint a kórokozók felismerése, a citokinek szekretálása, a mikroorganizmusok fagocitózisa és végül az adaptív immunreakciók indukálása a T-sejteknek történő antigén prezentálás következtében (Ramirez-Ortiz és Means 2012; Qin és mtsi., 2016). Az antigén prezentálás során játszott szerepük miatt a dendritikus sejtek a legtöbb PRR-t (TLR, CLR és Fc γ R) expresszálják (del Fresno és mtsi., 2013). Habár ezek az immunsejtek képesek fagocitálni és elpusztítani a különböző *Candida* fajok sejtjeit, kevésbé hatékonyak a gomba ölési folyamatokban, mint a makrofágok (Netea és mtsi., 2015).

3.8. T helper (Th) sejt válaszok a gombafertőzések során

A természetes immunitás és az adaptív immunválasz iránya szorosan összefügg a gombafertőzések során. Az adaptív immunitás legfontosabb effektor sejtjei a B- és T-limfociták, amelyek a humorális és celluláris válaszok kialakításáért felelősek. A T-limfocitákon belül CD4⁺ Th és CD8⁺ citotoxikus T-sejt populációkat különböztetünk meg. A CD8⁺ T-sejtek a patogének által fertőzött és tumoros sejtek közvetlen elpusztításában vesznek részt (van de Veerdonk és Netea 2010). A Th sejtekkel ellentétben, a CD8⁺ T sejtek szerepe nincs egyértelműen definiálva a gombafertőzések elleni védelemben, azonban *in vivo* eger kísérletekben kimutatták, hogy a CD4⁺ T-sejtek hiányában a CD8⁺ T-sejt populáció szerepet játszik az orális candidiasis kontrollálásában (Marquis és mtsi., 2006).

A CD4⁺ T-helper (Th) sejteket funkciójuk és a sejtek által termelt citokinek alapján lehet csoportosítani (Mosmann és Coffman 1989). A naiv CD4⁺ T-sejtek specifikus T-helper sejtekké fejlődése a hivatásos antigén-prezentáló sejtek antigén prezentációjától, a kostimulációs molekulák kötődésétől és egy specifikus citokin milliőtől függ (van de Veerdonk és Netea 2010).

Az úgynevezett Th1 sejtek differenciálódásához az interleukin-12 (IL-12) és IL-18 szekréció vezet (Luckheeram és mtsi., 2012). A Th1 sejteket az interferon- γ (IFN γ) és IL-2 termelése jellemzi. Az IFN γ a fagociták aktivációjának fokozását idézi elő, így az intracelluláris kórokozókkal szembeni védekezésben jelentősek ezek a sejtek (van de Veerdonk és Netea 2010).

Az IL-4 citokin a naiv T-sejtek érését a Th2 fenotípus felé irányítja. A Th2 sejteket az IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-10, IL-25 termelése jellemzi és elsősorban allergiás betegségben és a parazita fertőzések elleni védelemben mutatták ki szerepüket (Luckheeram és mtsi., 2012). A Th2 sejtek működésük során a Th1 sejtek patogén ellenes effektor funkcióit csillapítják, valamint alternatív makrofág aktivációt indukálhatnak, ami a patogének elpusztítása helyett a fertőzés elterjedését, a gomba-asszociált allergiás válaszok és a megbetegedések súlyosbodását idézheti elő (Romani 2011).

A közelmúltban T-helper sejtek egy új alcsoportját írták le, amelyet Th17 sejteknek neveznek. Az IL-23, IL-1 β , IL-6 és a transzformáló növekedési faktor- β (TGF- β) citokinek indukálják a Th17 sejtek fejlődését. A Th17 sejtekre egy különálló citokin profil, nevezetesen IL-17A, IL-17F, IL-21 és IL-22 termelése jellemző (van de Veerdonk és Netea 2010). A Th17 sejtek általi IL-17 és IL-22 citokinek szekréciója szintén fontos a különböző *Candida* fajok elleni védekezésben. Ezek a citokinek indukálják a neutrofil granulociták toborzását,

felelősek az endotélsejtek aktiválásáért és az antifungális β -defenzinek felszabadulásáért (Liang és mtsi., 2006). Számos tanulmány kimutatta, hogy az IL-17 jelátvitelben hiányos egerek hajlamosabbak mind a szisztémás candidiasis, mind a nyálkahártya fertőzésekre. Habár emberek esetében azok a páciensek, akik az IL-17 termelődést érintő betegségben szenvednek, a nyálkahártyát érintő, de nem az invazív candidiasisra mutatnak fogékonyságot (Netea és mtsi., 2015).

A Th1- és Th17 típusú immunválaszokkal szemben, a Th2-típusú immunitással kapcsolatos citokineknek ellentmondó szerepe van a gombaellenes védekezésben. Egyrészt a vad típusú egerek IL-4 vagy IL-10 jelátvitelének terápiás blokkolása növelte a *Candida* fertőzéssel szembeni rezisztenciát, emellett az IL-10 deficiens egerek nagyobb ellenállást mutattak a szisztémás candidiasis során (Vazquez-Torres és mtsi., 1999; Mencacci és mtsi., 2001). Más tanulmányok azonban azt mutatták, hogy az IL-4 szükséges a *Candida* fertőzéssel szembeni protektív immunreakciók kialakulásához, a korai IL-10 termelés pedig hozzájárul az IL-12 hiányos egerek védő Th1 sejtválaszainak kifejeződéséhez (Netea és mtsi., 2015).

A T-sejtek másik fontos alcsoportja a regulátoros T-sejtek (Treg). A Treg sejtek fontos szerepet játszanak a saját és idegen antigének immunológiai toleranciájának fenntartásában. A szervezetet ért fertőzések során pedig a patogének eliminációját követően negatívan szabályozzák a gyulladásos immunválaszt, ezáltal megelőzve a szöveti károsodást. Az általuk termelt anti-inflammatorikus citokinek közé tartozik az IL-10 és a TGF- β (Luckheeram és mtsi., 2012).

3.9. *In vivo* modellek alkalmazása a *Candida* fertőzések során

Számos kutatás fókuszál arra, hogy részletesebb és mélyebb ismeretet szerezzünk arról, hogy a különböző *Candida* fajok hogyan kerülnek ki az immunrendszer védekező mechanizmusait. Ennek következtében jelentős számú, a patogének virulenciájában szerepet játszó gén kutatása van folyamatban. Így, a mutáns törzsek teszteléséhez megfelelő és reprodukálható *in vivo* modell szükséges. Az immunválaszban szerepet játszó gén, illetve fehérje szerepéről ugyan nyerhetünk információt *in vitro* kísérletek segítségével is, azonban a szisztémás fertőzés során játszott funkció tisztázása csak *in vivo* modellben lehetséges. Az elmúlt évek során a természetes immunitás számos aspektusát vizsgálták több, egymástól igen különböző modellszervezetet felhasználva. A rovarok hatékony immunrendszerrel

rendelkezik, amely mintegy prototípusa a gerinces szervezetek veleszületett immunitásának, ezért a rovarok immunrendszerének megismerése nagyban hozzájárul a törzsfeljődés során konzervált immunfolyamatok megértéséhez (Chamilos és mtsi., 2007).

A *Candida* fertőzések vizsgálatának kedvelt nem- emlős modell organizmusai a *Drosophila melanogaster* (ecetmuslica), a *Caenorhabditis elegans* (fonálféreg) és a *Galleria mellonella* (nagy viaszmolylepke) lárvája (Segal és Frenkel 2018). A *G. mellonella* modellt elsősorban a különböző *Candida* fajok és virulencia faktorokban deléciós mutáns törzsek patogenitásának összehasonlítására használják, emellett antifungális szerek tesztelésére is alkalmas (Mesa-Arango és mtsi., 2013). A *C. elegans* szintén az antimikrobiális szerekkel és a konzervált immunmediátorokkal kapcsolatos tanulmányok során alkalmazzák (Pukkila-Worley és mtsi., 2014; Segal és Frenkel 2018).

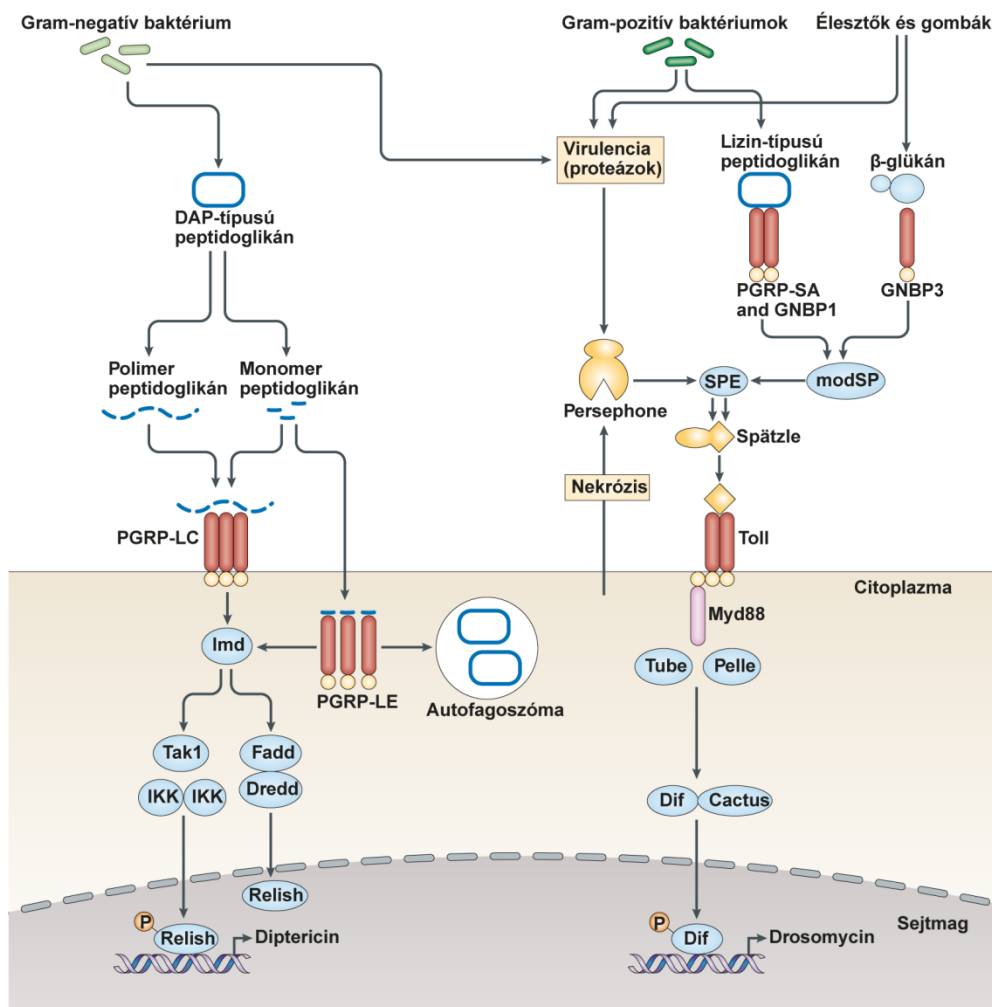
3.9.1. A *D. melanogaster* modellszervezet alkalmazhatósága fertőzési kísérletekben

A rovar modellek közül is kiemelkedő jelentőséggel bír a *D. melanogaster*, mivel a teljes genom szekvenciája ismert és több ezer génre nézve állnak mutánsok a kutatók rendelkezésére. A *D. melanogaster* modell alkalmas a mikrobiális fertőzések során a veleszületett immunitás specifikus lépéseinek megismerésére (Chamilos és mtsi., 2007). A *Drosophila* mintázat felismerő receptorai felismerve a konzervált mikrobiális mintázatokat aktiválják a sejtes és humorális választ, amely specifikus az adott mikroorganizmusra (Ferrandon és mtsi., 2004). Két fő szignál út vonal vezet az antimikrobiális fehérjék (antimicrobial peptides, AMPs) termelődéséhez (4. ábra): az immune deficiency (Imd) út vonal, amely a Gram negatív baktériumok elpusztításáért felelős és a Toll út vonal, ami pedig Gram-pozitív baktériumok és gombák jelenlétére aktiválódik (Hetru és Hoffmann 2009; Buchon és mtsi., 2014).

Habár a *Drosophila* genom 9 Toll fehérjét kódol és a Toll jelátviteli út homológ az emlős Toll/IL-1 receptor út vonallal, azzal ellentétben nem közvetlenül érzékeli a mikrobiális PAMP-okat (kivételez képez a Toll7, ami közvetlenül képes felismerni a virális komponenseket, hasonlóan az emlős TLR-ekhez). A receptor funkciót a Spätzle látja el (Buchon és mtsi., 2014). Ez a molekula előalakban képződik és aktív formáját az SPE (Spätzle-processing enzyme) általi hasítás során nyeri el, amit a fertőzés és sejt károsodás során elinduló proteolitikus kaszkád alakít át (Buchon és mtsi., 2009). Az aktivált Spätzle kötődik a transzmembrán Toll receptorhoz, előidézve annak dimerizációját, ami pedig a

Drosophila adaptor fehérjéhez kötődik (dMyD88), ami homológ az emlős MyD88-cal. Az útvonal során kialakul a dMyD88-Tube-Pelle heterotrimer komplex, ami majd degradálja az NF- κ B transzkripciós faktorhoz, a Dorsalhoz kapcsolódó és az azt gátló Cactust (*Drosophila* I κ B factor). A Dorsal bejut a sejtmagba, és AMP-k génjeinek átírását szabályozza, mint a Drosomycin, Metchnikowin és a Defensin (Valanne és mtsi., 2011). Ismert, hogy a β -glükánt felismerő fehérjék családjának (GNBP/ β -glucan recognition proteins, β GRP) tagja, a GNBP3 (Gram-negative binding protein 3), képes felismerni a β -1,3-glükán elemeket a gomba sejt falban (Gobert és mtsi., 2003). A GNBP3, ligand kötése során, Spätzle-függő módon aktiválja a Toll útvonalat. Mindemellett ez a fehérje felelős a hemolimfában lévő gombasejtek agglutinációjáért, ami független a Toll útvonaltól (Matskevich és mtsi., 2010). A Toll útvonal azonban aktiválódhat szerin proteázok által is (Ligoxygakis és mtsi., 2002). A gomba és bakteriális fertőzés során a Persephone (psh) képes érzékelni a patogén-asszociált aktivitásokat a hemolimfában. Ez a szerin proteáz szintén a Spätzle érését váltja ki (Ligoxygakis és mtsi., 2002; Issa és mtsi., 2018).

Az Imd útvonalat gyakran azonosítják az emlős TNFR és a TIR-függő TLR útvonallal (Buchon és mtsi., 2014). Az Imd útvonal aktivátorai a transzmembrán receptor PGRP-LC (peptidoglycan recognition protein-LC) és a citoszolikus PGRP-LE, amelyek a Gram-negatív és a *Bacillus* és *Listeria* nemzetségbe tartozó Gram-pozitív baktériumokban található diaminopimelinsav-típusú (DAP-típusú) peptidoglikánokat ismerik fel. Az útvonal végül az NF- κ B faktor Relish aktivációjához vezet, ami a nukleuszba transzlokálódik és az effektor proteinek, köztük az AMP-k transzkripcióját szabályozza (Buchon és mtsi., 2014).



4. ábra. A Toll és az Imd útvonal szabályozása *D. melanogaster*ben (Buchon és mtsi., 2014) alapján).

A *Drosophila* sejtveszélyeztető funkcióiért a hemociták felelősek. Három típusa ismert ezeknek a vérsejteknek: a kristály sejtek, a lamellociták és a plazmatociták. A plazmatociták fagocitotikus aktivitást mutatnak a behatoló mikroorganizmusokkal szemben, az apoptotikus sejtek eltávolítását végzik, valamint antimikrobiális peptideket is termelnek (Fauvarque és Williams 2011). A kristály sejteknek az idegen testek melanizációjában és a sebgyógyulásban van szerepe, míg a lamellociták a plazmatocitákkal együtt a nem fagocitálható, nagyobb méretű idegen testek által kiváltott tokképző folyamatban vesznek részt (Fauvarque és Williams 2011). A fagocitózis folyamata nagymértékben konzerválódott a fajok között, és ezért a *D. melanogaster* számos információt nyújtott a kórokozók érzékelésében szerepet játszó sejtfelszíni receptorokról és a fagoszóma érésének lépéseiről (Kurucz és mtsi., 2007; Stuart és Ezekowitz 2008; Honti és mtsi., 2014).

Mindezen tulajdonságai a *D. melanogaster*t alkalmassá teszik arra, hogy

tanulmányozhassuk a gazda-patogén interakciókat a gombafertőzések során (Alarco és mtsi., 2004). Chamilos és munkatársai használták először a Toll (*Tl*) deficiens *D. melanogaster*-t a *Candida* fajok virulenciájának tanulmányozására. Kísérleteik alkalmával a *C. parapsilosis* kevésbé virulensnek bizonyult, mint a *C. albicans* a *Tl*^{-/-} legyekben, ami hasonló a klinikai állapotokhoz (Chamilos és mtsi., 2006). A hifaképzésben mutáns *C. albicans* törzsek (a *cph1Δ/Δ* törzs csak élesztő formában jelenik meg, míg az *efg1Δ/Δ* törzs defektust mutat a hifa képzésben) csökkent virulenciával rendelkeztek a *Tl*^{-/-} legyekkel szemben, amely eredmények megegyeznek az egér modellben tapasztaltakkal (Lo és mtsi., 1997; Chamilos és mtsi., 2007). Glittenberg és munkatársai munkájuk során a *C. albicans* különböző klinikai izolátumainak fertőzőképességét tesztelte egy vad típusú ecetmuslica törzsben és eredményeik szintén korreláltak a korábban egér modellben végzett kísérletekkel (Glittenberg és mtsi., 2011b). A kutatók egy másik csoportja kimutatta, hogy az emlős modellekben a virulencia szempontjából fontos *C. albicans* gének szintén szükségesek a *Drosophila* megfertőzéséhez és a Toll útvonal elengedhetetlen a *C. albicans* fertőzés elleni védekezésben. Ezekből az eredményekből arra a következtetésre jutottak, hogy az immundeficiens *D. melanogaster* ígéretes eszközt jelent olyan gazda-specifikus komponensek és *C. albicans* gének azonosításához, amelyek a gazda-gomba kölcsönhatásban játszanak szerepet (Alarco és mtsi., 2004).

3.9.2. Egér modell a *Candida* fertőzések vizsgálatában

A rágcsálók közül az egerek a legszélesebb körben használt modell állatok. Az egér modellekben számos klinikai szempontból fontos *Candida* fertőzéssel kapcsolatos jellemzőket tanulmányoztak, beleértve a nyálkahártya orális vagy hüvelyi fertőzéseit, az emésztőszervrendszeri, vagy a candidiasis mélyebb szerveket érintő és szisztémás formáit, amelyeket kísérleti úton indukálnak az állatokban (Segal és Frenkel 2018). Annak érdekében, hogy a klinikai állapotoknak megfelelő kísérleti *Candida* fertőzéseket tanulmányozzanak, nemcsak naiv egerekben, hanem különböző módon immunszuppresszált (például ciklofoszfamiddal, 5-fluorouracillal vagy besugárzással előkezelt) egerekben is végeztek már megfigyeléseket (Semis és mtsi., 2011; Frenkel és mtsi., 2016).

Ezen kívül a fertőzés módja is változhat: a szisztémás *Candida* fertőzés indukálható a gomba intravénás beoltásával, általában a fark vénájába, ami a legszélesebb körben alkalmazott modell (Lionakis és mtsi., 2011). Az intraperitoneális és az

emésztőszervrendszeri injekció is alkalmas a szisztémás fertőzés kialakításához (Sandovsky-Losica és mtsi., 1992; Segal és Frenkel 2018). Az intravénás fertőzés modellekben a virulenciát a fertőzött egerek túlélésének monitorozásával és/vagy a gomba által okozott szerv kolonizáció meghatározásával lehet megfigyelni. Immunkompetens egerek esetében az intravénás modell alkalmazható a különböző *Candida* fajok virulenciájának összehasonlítására. A *C. albicans* nyilvánvalóan a legvirulensabb faj, amelyet szorosan követ a *C. tropicalis*. Ezzel szemben a *C. krusei* és a *C. parapsilosis* nem okoz mortalitást a fertőzött állatokban, még magas inokulum használata során sem, a gombák végül a gazdaszervezetből kitisztulnak (Arendrup és mtsi., 2002; Koga-Ito és mtsi., 2011).

Emellett a szakirodalomban számos publikáció található, amelyekben az egér *in vivo* modellt használják az immunrendszer különböző molekuláinak (pl. mintázatfelismerő receptorok, citokinek, sejtfelszíni fehérjék stb.) *Candida* fertőzések során betöltött funkciójának tanulmányozására (Segal és Frenkel 2018).

3.9.2.1. Az újszülött egér modell

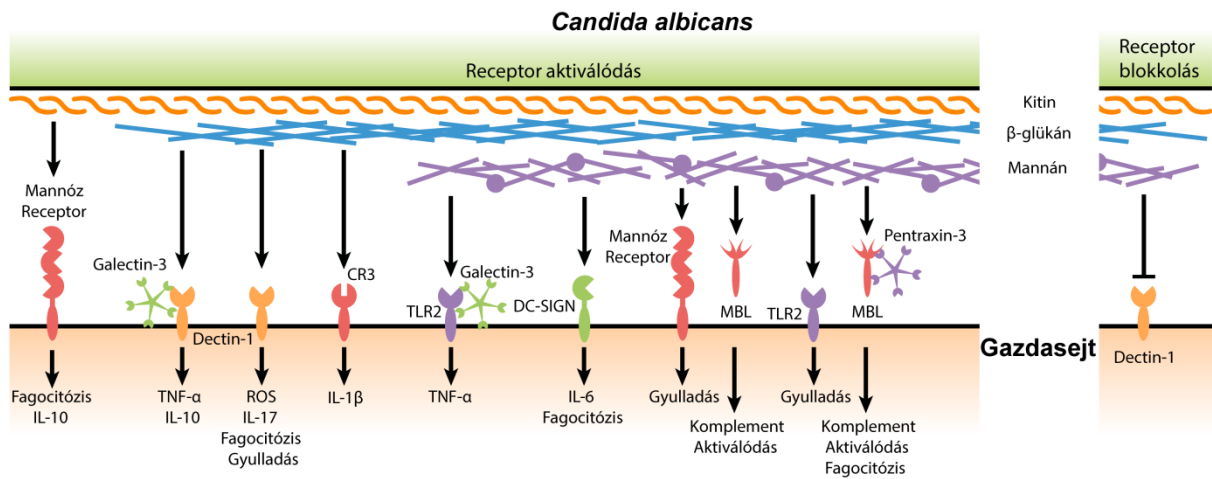
Korábban említett epidemiológiai jelentések bizonyították a *Candida* fajok által okozott fertőzések közötti különbséget. Habár a *C. albicans* az invazív candidiasis fő oka általában, a 2 év alatti gyermekek számára nagyobb kockázatot jelentenek a nem-*albicans* fajok, mint például a *C. parapsilosis* (Arsenault és Bliss 2015). Már több mint 30 éve használnak újszülött állat modelleket a humán csecsemőket és gyermekeket érintő betegségek tanulmányozására (Billingham és Silvers 1961; Pope és mtsi., 1979). Az újszülött állat modelleket a *Candida* fertőzések megfigyelésére is alkalmazták (Arsenault és Bliss 2015). Korai kísérletekben a szisztémás candidiasis kialakításához emésztőszervrendszerbe történő injektálást alkalmaztak (Pope és mtsi., 1979; Domer 1988). Tsai és munkatársai 2 napos egereket használtak, amelyekben intraperitoneális injektálást követően vizsgálták a különböző *C. albicans* törzsek virulencia tulajdonságait a túlélési arány, a szervkolonizáció mértékének összehasonlításával és a szövetminták hisztopatológiai elemzésével (Tsai és mtsi., 2011). Trofa és mtsai (2011) elsőként jellemezték a *C. albicans* és *C. parapsilosis* fertőzést és a gomba által szekretált lipázok virulenciában betöltött szerepét újszülött patkány modellben intravénás, intraperitoneális és emésztőszervrendszerbe történő injektálást követően. Kimutatták, hogy az újszülött rágcsálók nagyobb fokú érzékenységet mutatnak a

Candida fertőzésekre mint a kifejezett állatok, és megerősítették az újszülött állat modellek hasznosságát a *C. parapsilosis* patogenezisének jellemzésére (Trofa és mtsi., 2011).

3.10. A gomba sejtfal N-mannán komponensek szerepe a virulenciában

Számos tanulmány számolt be arról, hogy a külső mannán réteg egyik fontos funkciója, hogy elrejtse a belső β -glükán réteget, és így akadályozza a gazda szervezet általi immunfelismerést (5. ábra). *In vitro* kísérletek során, ahol primer emlős dendritikus sejteket használtak megfigyelték, hogy a β -1,2-mannán deficiens *C. albicans* magasabb arányban indukálja citokinek termelődését (IL-6, IL-12p40, IL-23 és TNF α), mint a vad típusú törzs (Ueno és mtsi., 2013). Hasonló eredményeket mutattak ki humán sejtekkel történő kísérletek során is (ahol emelkedett IL-1 β , IL-10 és TNF α szekréción mértek), aminek oka lehet, hogy az N-kapcsolt mannóz elemek mutációja egyidejűleg nagyobb mennyiségű β -glükán szintet okozott a gomba sejtfalban (Mora-Montes és mtsi., 2010). A gazdaszervezetben számos receptor szabályozza a mannán komponensek felismerését és az *in vivo* tanulmányok alátámasztják, hogy ezen sejtfal poliszacharidok fontosak a *Candida* fajok virulenciájában (Snarr és mtsi., 2017). Az α -1,6-mannóz kötésekben mutáns *C. albicans* csökkent virulenciát mutatott egér modellben és emelkedett Th1 és Th17 immunválaszt illetve nagyobb IFN- γ , IL-6, és IL-17 citokin szekréción indukált (Zhang és mtsi., 2016). Ehhez hasonlóan, az O-kapcsolt mannán deficiens *C. albicans*, ami szintén nagyobb β -glükán kifejeződéssel jellemezhető a sejtfalban, nem képes elkerülni a fagolizozóma fúziót emlős makrofágokban, emellett gyenge fertőzőképességgel rendelkezik *in vivo* egér kísérletek során, ami bizonyítja, hogy az O-mannán a sejtfalban szükséges a normál mannoprotein funkciókhoz (Timpel és mtsi., 1998; Bain és mtsi., 2014).

Emellett szintén kimutatásra került, hogy a nem-*albicans Candida* fajok által kiváltott immunválasz eltér a *C. albicans* esetében tapasztaltaktól. A *C. glabrata* genetikailag közelebb áll a *Saccharomyces cerevisiae*-hez, a sejtfalának a mannán felépítése is nagymértékben hasonlít ehhez a nem patogén organizmushoz (Snarr és mtsi., 2017). A *C. albicans*szal ellentétben, az N-mannán mutáns *C. glabrata* törzsek virulensebbnek bizonyultak egér modellben (West és mtsi., 2013).



5. ábra. A *C. albicans* sejtfal poliszacharidok és a gazdasejt közötti eddig feltárt kölcsönhatások (Snarr és mtsi., 2017) alapján).

3.11. A *C. parapsilosis* sejtfala és a felismerésében szerepet játszó receptorok *in vitro* körülmények között

Kutatócsoportunk intenzíven vizsgálja a *C. parapsilosis* patogenitásának immunológiai hátterét. Eredményeink lényeges különbségekről számolnak be a *C. albicans* és *C. parapsilosis* indukálta immunválaszban. *In vitro* kísérletekben megállapítottuk, hogy míg a *C. albicans* fertőzés erőteljes inflammaszóma aktivációt és Th1/Th17 polarizációt vált ki, addig a *C. parapsilosis* szignifikánsan alacsonyabb IL-1 β , IL-17, IL-22 és INF γ , de magasabb IL-10 citokin és egyben tolerogén Th2/Treg választ indukál (Toth és mtsi., 2013).

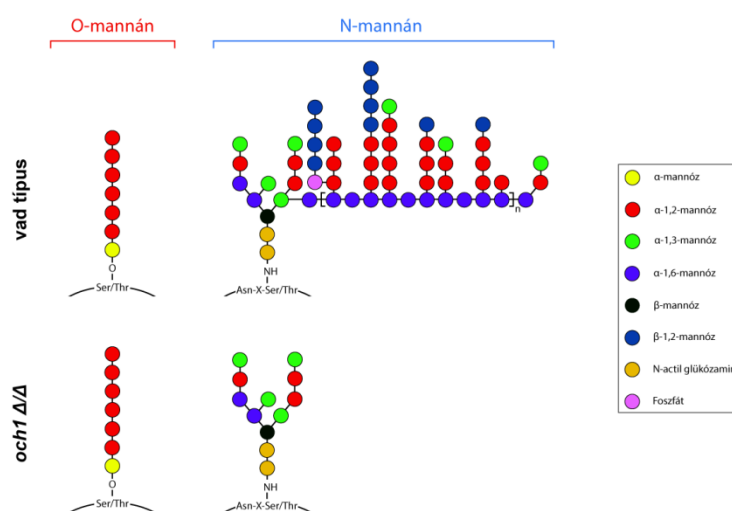
A *C. parapsilosis* esetében csak korlátozott mennyiségű információ áll rendelkezésre a természetes immunitás elemeivel történő kölcsönhatás alapjául szolgáló mechanizmusokról. Eddig kimutatták, hogy a *C. albicans*-sal ellentétben a humán neutrofilek felszínén expresszálandó Galectin-3 növeli a *C. parapsilosis* sejtek fagocitózist (Linden és mtsi., 2013b). Kutatócsoportunk *in vitro* kísérletei alapján pedig a Dectin-1 szerepet játszik a *C. parapsilosis* felismerésében, ugyanis a hővel előlt gomba által stimulált citokinek (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-10 és INF γ) termelését szignifikánsan csökkentette a receptor blokkolása humán mononukleáris sejtekben (Toth és mtsi., 2013). Ugyanebben a rendszerben, a TLR2 érintettnek bizonyult az IL-1 β és IL-6 citokinek indukciójában, azonban a TLR4 receptor blokkolása nem volt hatással a mononukleáris sejtek citokin koncentrációjára (Tóth 2016).

A gombasejtek felismerésében kulcsszerepet játszik a sejtfal szerkezete, ami a *C. albicans* esetében részletesen jellemzett, azonban keveset tudunk a *C. parapsilosis* sejtfal

integritásáról. Korábbi tanulmányok eltérést találtak a *C. albicans*hoz képest a kitin kifejeződésben (Lima-Neto és mtsi., 2011), illetve rövidebb *N*-kapcsolt mannán oldalláncokat írtak le a *C. parapsilosis*ban (Shibata és mtsi., 1995). További kísérletek is alátámasztják, hogy habár a sejtfa szerkezete hasonló felépítésű a két organizmusban, a *C. parapsilosis* kevesebb mannán, de erőteljesebb kitin és β -1,3-glükán kifejeződést mutat a *C. albicans*hoz képest (Estrada-Mata és mtsi., 2015).

3.11.1. A *C. parapsilosis och1Δ/Δ* mutáns törzs jellemzői

*C. albicans*ban az *OCH1* gén kódolja a Golgi rezidens α -1,6-mannoziltranszferázt, ami a sejtfa *N*-mannozilációját katalizáló enzim (Bates és mtsi., 2006). Az Och1p mannoziltranszferáz működése nélkül nem alakult ki ebben a törzsben az α -1,6-polimannóz gerinc, ennek következtében hiányzik a külső elágazó *N*-mannán oldallánc, de az *O*-mannán struktúra érintetlen maradt (6. ábra). Az *N*-mannán mutáns törzsben azonban megnövekedett a sejtfaiban a kitin és a β -glükán tartalom (Bates és mtsi., 2006). Az *OCH1* gén kiütése a *C. albicans*ban csökkent virulenciát eredményezett egerek intravénás fertőzését követően és a mutáns gyenge citokin választ indukált humán PBMC és dendritikus sejtekben a vad típushoz viszonyítva (Bates és mtsi., 2006; Netea és mtsi., 2006; Cambi és mtsi., 2008).



6. ábra. A vad típusú és az *och1Δ/Δ* *C. albicans* törzsek mannóz szerkezete (Hall és Gow 2013; Hwang és mtsi., 2017) alapján.

A *C. parapsilosis* *OCH1* gén funkcionális ortológja a *C. albicans* *OCH1* génnek, és kutatócsoportunk sikeresen létrehozta az *N*-mannozilációban mutáns *C. parapsilosis* (*Cpoch1Δ/Δ*) törzset (Perez-Garcia és mtsi., 2016). A *Cpoch1Δ/Δ* az *N*-kapcsolt mannozilációs útvonal defektusaival kapcsolatos tipikus fenotípusokat mutatja, beleértve a lassabb növekedési rátát, az aggregátumok képzését folyékony tápközegben, a kerekesebb egysejt formát és az abnormális morfogenezist, ugyanis a mutáns csökkent pseudohifa képző képességgel rendelkezik. A sejtfal összetételében is megmutatkoztak a defektusok, mint a 67%-os csökkenés a mannántartalomban, valamint az emelkedett β -glükán és kitin szint a vad típusú törzshöz képest (Perez-Garcia és mtsi., 2016). Az *N*-mannán oldalláncok hiánya a sejtfal integritásására is hatással van, ugyanis a *Cpoch1Δ/Δ* érzékenynek bizonyult a sejtfal perturbáló szerekkel szemben, mint a kalkofluor fehér (Calcofluor white) és kongó vörös (Congo Red), amelyek a sejtfalban lévő kitinnel és β -glükánnal történő kölcsönhatásra utalnak. Emellett a mutáns törzs emelkedett érzékenységet mutatott a tunikamicinre, ami az *N*-mannán bioszintézis első lépésének inhibitora és szintén szenzitívnek bizonyult az SDS-sel (Sodium Dodecyl Sulphate, nátrium-lauril-szulfát) történt kezelésre, ami egy plazmamembránra ható detergens (Perez-Garcia és mtsi., 2016).

Az *N*-mannoziláció a *C. parapsilosis* sejtfalban befolyásolja a gazda-patógén interakciót. Az *N*-mannán réteg hiánya a gomba csökkent virulenciáját eredményezte *in vivo* egér kísérletekben, ugyanis BALB/c egerek intravénás fertőzését követően a *Cpoch1Δ/Δ* szignifikánsan alacsonyabb szervkolonizáltságot okozott az állatok lépében, veséjében és májában, mint a vad típusú törzs (Perez-Garcia és mtsi., 2016). *In vitro* kísérletek során, a *Cpoch1Δ/Δ* szignifikánsan magasabb TNF α , IL-1 β , IL-6 és IL-10 citokin szekréciót indukált humán PBMC-kben, a vad típusú törzshöz viszonyítva. Mindemellett a *Cpoch1Δ/Δ* sejtek β -eliminációs kezelésének következtében, ami hatására eltávolítható az *O*-mannán a sejtfalból (Diaz-Jimenez és mtsi., 2012), csökkent az IL-1 β szekréció a humán sejtekben, azonban a kezelés nem volt hatással a TNF α , IL-6 és IL-10 termelés indukciójára. Receptorblokkolók alkalmazásával szintén kiderült, hogy a magasabb IL-1 β szint, amit a *Cpoch1Δ/Δ* sejtfalban még jelen lévő *O*-mannán okoz, függ a Dectin-1 és TLR4 receptorok általi ligand kötéstől, ugyanis ezen receptorok gátlása során megszűnt a *Cpoch1Δ/Δ* általi IL-1 β indukció a gazdasejtekben (Perez-Garcia és mtsi., 2016). Ezek az eredmények eltérnek a *C. albicans* esetében találtaktól, ugyanis a *C. albicans och1Δ/Δ* csökkent citokin indukciós képességgel rendelkezik (Netea és mtsi., 2006; Cambi és mtsi., 2008). Mindemellett humán PBMC sejtekben a *C. albicans* által stimulált IL-1 β termelés az *N*-mannán és kitin MR általi

felismerésétől és a β -glükán által aktivált Dectin-1/TLR2 receptorok működésétől függ (van de Veerdonk és mtsi., 2009). Ezek az eredmények alátámasztják az eltérő felismerési mechanizmusokat a *C. albicans* és a *C. parapsilosis* fertőzés során. Ezen felül laborunk eredményei azt sugallják, hogy az *N*-mannán hiányában a hozzáférhető β -glükán és *O*-mannán a *C. parapsilosis* sejtfalban a Dectin-1 és TLR4 receptorok aktivációját okozza és ezáltal a patogén elleni hatékony immunválaszt és eliminációt váltja ki.

4. CÉLKITŰZÉSEK

Klinikai jelentősége ellenére keveset tudunk a *C. parapsilosis* által kiváltott immunválasz lépéseiről. Kutatócsoportunk korábbi munkája során bebizonyosodott, hogy a sejtfal *N*-mannoziláció hiánya befolyásolja a gazda-patogén interakciót, ami alapján a *Cpoch1Δ/Δ* magasabb citokin választ indukált *in vitro* körülmények között és csökkent virulenciát mutatott BALB/c egér modellben. Így munkánk során a *C. parapsilosis* fertőzés *in vivo* rendszerekben történő jellemzése mellett vizsgálni kívántuk a sejtfal mutáns törzs csökkent virulenciájának hátterében álló immunmechanizmusokat. Munkánk során a következő célokat fogalmaztuk meg:

1. A vad típusú és a sejtfal mutáns *C. parapsilosis* által indukált természetes immunválasz elemeinek vizsgálata *D. melanogaster* modellben.
2. A szisztémás candidiasis jellemzéséhez egy intravénásan fertőzött újszülött egér modell létrehozása és leírása a vad típusú és a sejtfal mutáns *C. parapsilosis* fertőzést követően.
3. Szisztémás candidiasist modellező egér *in vivo* rendszerben a vad típusú és a sejtfal mutáns *C. parapsilosis* fertőzés részletesebb jellemzése és összehasonlítása.
4. A Dectin-1 receptor szerepének *in vivo* vizsgálata a vad típusú és a sejtfal mutáns *C. parapsilosis* felismerésében.

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1. A kísérletek során alkalmazott törzsek és tenyésztési körülmények

Alkalmazott baktérium törzsek:

Micrococcus luteus, SZMC 0264 (Szeged Microbiological Collection (SZMC), <http://www.sci.u-szeged.hu/microbiology/>).

Alkalmazott *Candida* törzsek:

A munkánk során felhasznált *Candida* törzseket az 1. és 2. táblázat tartalmazza.

1. táblázat. Felhasznált *Candida* törzsek.

Fajnév	Törzs	Származási hely	Referencia
<i>C. albicans</i>	SC5314, vad típus	New York, USA	(Gillum és mtsi., 1984)
<i>C. glabrata</i>	CBS 138, vad típus	n.a.	(Sato és mtsi., 1994)
<i>C. parapsilosis</i>	GA1, vad típus	Hamburg, Németország	(Gacser és mtsi., 2005)
<i>C. parapsilosis</i>	CDC 317, vad típus	n.a.	(Kuhn és mtsi., 2004)
<i>C. parapsilosis</i>	CLIB 214, vad típus	Puerto Rico	(Laffey és Butler 2005)
<i>C. parapsilosis</i>	CPRI *	-	(Holland és mtsi., 2014)
<i>C. parapsilosis</i>	<i>Cpoch1Δ/Δ</i> **	-	(Perez-Garcia és mtsi., 2016)
<i>C. parapsilosis</i>	<i>och1Δ+OCH1</i>	-	(Perez-Garcia és mtsi., 2016)

N.a., nincs adat. *A CPRI jelű törzs a *C. parapsilosis* CLIB 214 törzséből létrehozott, CPL2H1 jelű hisztidin, leucin deléció mutáns törzs reintegrált törzse (Holland és mtsi., 2014). A CLIB 214 háttérén készült mutánsok referencia törzseként használják. Genotípusa: *leu2Δ::FRT/leu2Δ::FRT*, *his1Δ::FRT/his1Δ::FRT*, *FRT::CmLEU2/FRT::CdHIS1*. **A *C. parapsilosis och1Δ/Δ* szülői törzse a CLIB 214, genotípusa: *leu2::FRT/leu2::FRT*, *his1::FRT/his1::FRT*, *och1::CmLEU2/och1::CdHIS1*.

A *D. melanogaster*rel végzett kísérletek során, a *C. parapsilosis och1Δ/Δ* törzzsel történt fertőzések elemzéséhez a *C. parapsilosis* CPRI törzset használtuk referenciaként. A vad

típusú, *MyD88*^{-/-} és *GNBP3*^{hades} *D. melanogaster* túlélésének vizsgálatát elvégeztük a *C. parapsilosis* CLIB 214 és a *C. parapsilosis* CPRI törzsszel is. Mivel nem találtunk különbséget a legyek túlélésében, az egér kísérleteinkhez a *C. parapsilosis* CLIB 214 klinikai izolátummal (anyai törzs) dolgoztunk tovább. Az eredmények a Mellékletek 11.1. pontjában találhatóak. A *C. parapsilosis och1Δ+OCH1* reintegrált törzsszel végzett kísérletek a Mellékletek 11.2. és 11.3. pontjában találhatóak.

2. táblázat. A mikroszkópos felvételekhez az alábbi GFP-vel jelölt *Candida* törzseket használtuk:

Törzs	Genotípus
GFP- <i>C. parapsilosis</i> CPRI	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, frt::CdHIS1, CpNEUT5L/CpNEUT5L::Clp10-P_{TDH3}-GFP::CmLEU2</i>
GFP- <i>C. parapsilosis och1Δ/Δ</i>	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, och1::CmLEU2/och1::CdHIS1, CpNEUT5L/CpNEUT5L::Clp10-P_{TDH3}-GFP::SAT1</i>
GFP- <i>C. albicans</i> SC5314	<i>RPS1/RPS1::Clp10-P_{TDH3}-GFP::SAT1</i>

A GFP-vel jelölt törzseket Dr. Németh Tibor biztosította számunkra.

Alkalmazott *Drosophila* törzsek:

A *D. melanogaster* törzseket 25 °C-on neveltük, standard kukorica keményítős táptalajon. Kísérleteink során a következő ecetmuslica törzseket használtuk: vad típus (G0147) (Gottar és mtsi., 2006), *GNBP3*^{hades} (Gottar és mtsi., 2006), *psh*^{-/-} (Ligoxygakis és mtsi., 2002) és *MyD88*^{-/-} (Tauszig-Delamasure és mtsi., 2002) *D. melanogaster*, amelyeket együttműködésünk során Jessica Quintin (Pasteur Intézet, Párizs) küldött számunkra. A fagocitózis kísérletekhez az *l(3)mbn-1/TM6Tb (lethal(3)malignant blood neoplasm-1)* törzset használtuk (Konrad és mtsi., 1994).

Alkalmazott egér törzsek:

Kísérleteink során 8-12 hetes, illetve 2 napos immunokompetens BALB/c és 12-15 hetes C57BL/6 és Dectin-1^{-/-} (*Clec7a*^{-/-}) hím és nőstény egereket használtunk. A BALB/c egerek az MTA SZBK állatházából, míg a C57BL/6 és Dectin-1^{-/-} állatok a Friedrich Schiller Egyetem (Serviceeinheit Experimentelle Biomedizin, Bioinstrumentezentrum, Jéna, Németország)

állatházából származtak. A Dectin-1^{-/-} egerek előállítását a The Jackson Laboratory (<https://www.jax.org/strain/012337>) végezte. A kísérleteink során az állatokat állandó, kontrollált körülmények között (12 óra fény/12 óra sötét ciklus, 21 °C tartási hőmérséklet, igény szerint hozzáférhető ivóvíz és normál rágszálótáp) tartottuk. Az *in vivo* kísérletek engedély száma: XVI./3646/2016.

5.2. Alkalmazott tápoldatok, táptalajok, pufferek és egyéb reagensek

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.

LB tápoldat és táptalaj: 0,5 m/V% élesztőkivonat, 1 m/V% tripton és 1 m/V% nátrium-klorid (NaCl) tartalmú tápoldat, szilárd táptalaj esetén 2,5 m/V% agarral kiegészítve.

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

Drosophila Schneider tápoldat: Schneider tápoldat (Lonza) 10 m/V% hőinaktivált borjúsérummal (fetal bovine serum, FBS; Lonza), 100 I.U./ml penicillinnel, 100 µg/ml streptomycinnel kiegészítve.

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

Mounting (dermedő) fedő médium: Fluoromount G (Southern Biotech)

PBSTX: 0,1 m/V% Triton X-100 PBS oldatban

PBST: 0,01 m/V% Tween 20 PBS oldatban

Drosophila Ringer oldat: 111 mM NaCl, 1,87 mM KCl, 2,38 mM NaHCO₃, 1,1 mM CaCl₂, 0,84 mM NaH₂PO₄

PTU: 1-fenil-2-tiourea (Sigma-Aldrich)

ACK puffer: 150 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1 mM EDTA.Na₂.2H₂O (pH 7,2-7,4)

70 % Percoll oldat: 2.1 ml Percoll + 0.9 ml RPMI 1640

30 % Percoll oldat: 0.9 ml Percoll + 2.1 ml RPMI 1640

FACS puffer: 2 m/V% FBS PBS pufferben

5.3. Sejtenyésztési módszerek, primer sejtek izolálása

***Candida* törzsek fenntartása/előkészítése a kísérletekhez**

A felhasznált *Candida* törzsek fenntartása YPD táptalajon történt havi 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 (1310×g, 5 perc, 25 °C) összegyűjtöttük, kétszer PBS pufferrel (a *D. melanogaster* kísérletek esetében PBST-vel) mostuk, majd Bürker kamra segítségével meghatároztuk a szuszpenziók sejtszámát.

Baktérium törzsek fenntartása/előkészítése a kísérletekhez

A felhasznált *M. luteus* törzset LB táptalajon 4 °C-os hűtőben tartottuk fenn havi átoltással. A kísérleteket megelőző napon a törzset átoltottuk 2 ml LB tápoldatot tartalmazó centrifugacsőbe és egy éjszakán át inkubáltuk (37 °C, 200 rpm). A kísérletekhez az *M. luteus* sejtsuszpenzió előállítását ugyanúgy végeztük el, mint a *Candida* törzsekét.

A hemocita izolálás

A harmadik stádiumos *D. melanogaster l(3)mbn-1* lárvákat PTU-t tartalmazó Ringer oldatban boncoltuk fel, a hemolimfát 10 percig, 25 °C-on 300×g-n centrifugáltuk. A felülúszó eltávolítása után a hemocitákat tartalmazó üledéket Schneider/FBS/PS tápoldatba vettük fel. Az izolált sejteket a kísérleteinkhez azonnal felhasználtuk.

5.3. Alkalmazott kísérleti módszerek

5.3.1. *In vitro* fertőzési modellek

5.3.1.1. A fagocitózis vizsgálata mikroszkópiával

A fagocitózis vizsgálathoz a 10 db/minta harmadik stádiumos *D. melanogaster* lárvából izolált hemocitákat 150 µl Schneider/FBS/PS tápoldatban üveg lemezre helyeztük. A mintákhoz 50 µl, GFP-t expresszáló *Candida* törzsek sejtjeit tartalmazó szuszpenziót (2×10^7 sejt/ml) adtunk és három órán át 25 °C-on, fénytől elzárva, vizes kamrában inkubáltuk. Az inkubáció leteltével a nem fagocitált gombák eltávolítását PBS mosással végeztük el. A gombasejtek adherenciájának a tényleges fagocitózistól való elkülönítése érdekében, a mintákat 10 percig 100 µl kalkofluor fehérrel (Sigma-Aldrich, kalkofluor fehér M2R 1g/l, Evans kék 0,5g/l, a gomba sejtfalban lévő kitint képes kötni) festettük, majd ismét mostuk kétszer PBS-sel. A mintákat 15 percig fixáltuk (4% formaldehid PBS-ben), majd kétszer 15 percig mostuk PBSTX-szel. A *Drosophila* hemociták jelöléséhez a phalloidin (Texas Red®-X Phalloidin, Life Technologies) (1:300) festést 20 percig PBSTX-ben végeztük. Ezt követően a mintákat kétszer 10 percig PBSTX-ben, majd egyszer 10 percig PBS-ben mostuk. A mintákat Mounting médiummal fedtük le. A minták elemzéséhez BX51 OLYMPUS mikroszkópot használtunk.

5.3.1.2. A fagocitózis vizsgálata áramlási citometriával, FlowSight készülékkel

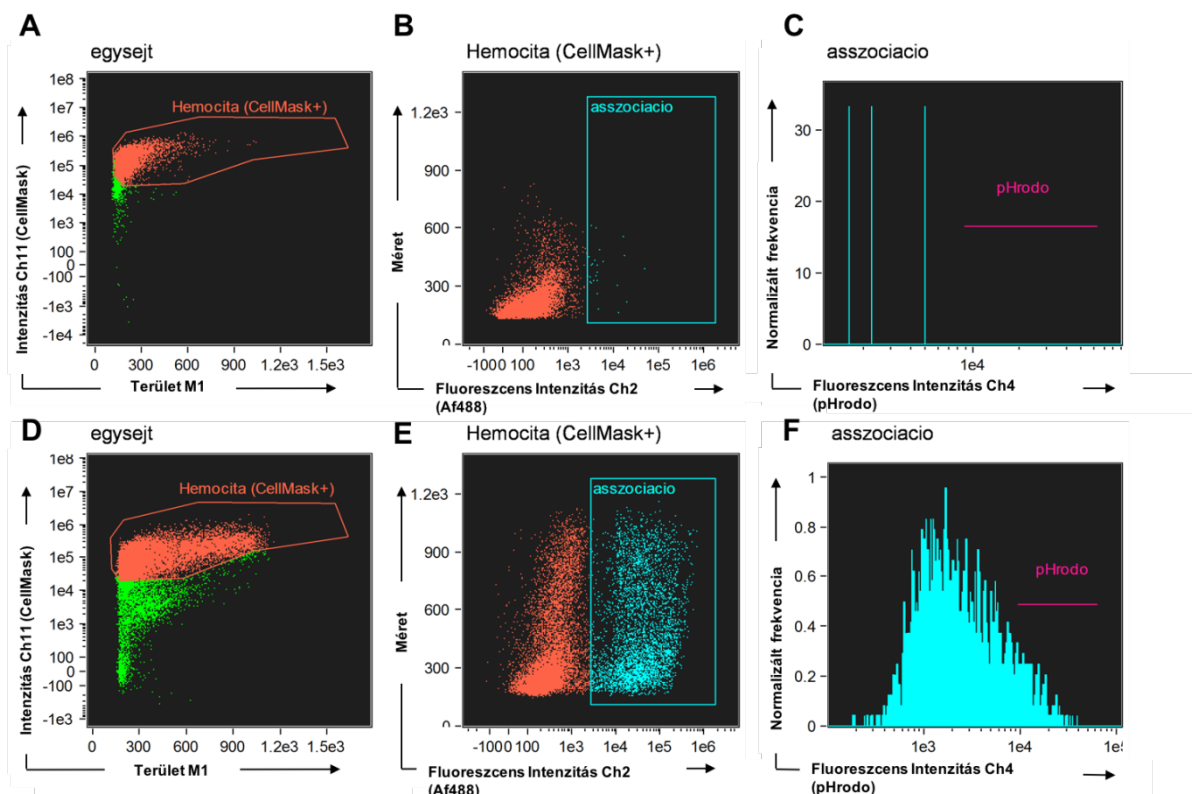
Candida sejtek fluoreszcens jelölése

A *Candida* sejtek festéséhez 100 µl 10^9 sejt/ml koncentrációjú szuszpenzióhoz 11 µl Na_2CO_3 oldatot (1 M, pH 10 törzsoldatból), majd 2 µl, 1 mg/ml koncentrációjú Alexa Fluor® 488 szukcinimidil észter festéket (Life Technologies) és 5 µl 10 mM-os pHrodo™ Red oldatot adtunk. Szobahőmérsékleten 45 percig történő inkubáció után a sejteket centrifugálással ($1310 \times g$, 5 perc, 25 °C) összegyűjtöttük, majd háromszor PBS pufferrel mostuk. Ezt követően meghatároztuk a szuszpenziók sejtszámát Bürker kamra segítségével, majd beállítottuk a megfelelő sejtszámot (2×10^7 sejt/ml, Schneider tápoldatban). A sejtek homogén festődését áramlási citometria segítségével ellenőriztük.

A hemocita sejtek fluoreszcens jelölése

A fagocitózis kvantitatív méréséhez a frissen izolált hemocitákat (15 lárva/minta) Eppendorf csövekbe helyeztük és 10 percig, sötétben CellMask-DeepRedTM plazma membrán festékkel (1:1000, Schneider tápoldatban) jelöltük, majd kétszer PBS-sel mostuk (5 perc, 300×g). Ezt követően a sejteket 150 µl Schneider/FBS/PS tápoldatban vettük fel. A *Candida* fertőzéshez készített mintákkal párhuzamosan Cytochalasin D-vel kezelt hemocita mintákat is készítettünk (a CytochalasinD aktin polimerizációt gátló mikotoxin, az inhibitor alkalmazásával a gazdasejtek nem képesek a gombasejtek bekebelezésére). A festési eljárást megelőzően a vérsejteket 2,5 µM Cytochalasin D-vel kezeltük 1 órán át, majd elvégeztük a festési eljárást.

A fagocitózis vizsgálatához a hemocita mintákhoz 50 µl *Candida* sejtuszuspenziót (2×10^7 sejt/ml) adtunk és 3 órán át 25 °C-on, sötétben inkubáltuk azokat. Centrifugálást (300×g, 5 perc, 25 °C) követően a mintákat 50 µl FACS pufferben vettük fel. A kísérlethez FlowSight® áramlási citométert használtunk, amely segítségével a méret és a piros fluoreszcens jel alapján (CellMask-DeepRedTM jelölt) különítettük el és gyűjtöttük a méréshez a *Drosophila* vérsejteket. Az adatok értékeléséhez az IDEAS (verzió 6.2) programot használtuk, ami során a vérsejt populáción belül (7. ábra A és D) a gomba-vérsejt asszociációt a zöld fluoreszcenciát mutató sejtek aránya alapján határoztuk meg (7. ábra B és E), illetve ezen populáción belül vizsgáltuk a pHrodoTM Red intenzitása alapján (7. ábra C és F) azon hemocita sejtek arányát, amelyekben fagoszómában voltak detektálhatóak a *Candida* sejtek. A hemociták és a *Candida* sejtek tényleges asszociációjának megadásához a Cytochalasin D-vel kezelt minták esetében tapasztalt asszociáció %-os arányát kivontuk a nem kezelt minták asszociációjának arányából.



7. ábra. Az áramlási citometria során használt stratégia a fagocitózis meghatározásához. Kontroll hemocita (A), (B), (C) és a *C. parapsilosis* CPRI fertőzött hemociták (D), (E), (F).

5.3.2. *In vivo* fertőzési modellek

D. melanogaster fertőzése

A fiolánkénti 15 db (2-4 napos nőstény és hím) vad típusú és mutáns ecetmuslicákat szeptikus sérüléssel fertőztük. A legyeket inzulinos tüvel injektáltuk, amelyet előzőleg baktérium vagy élesztő szuszpenzióba mártottunk. A kísérlethez kontrollként PBS pufferrel injektált egyedeket alkalmaztunk. A fertőzést követő 3. órától az élő, fertőzött legyeket tartalmazó fiolákat inkubátorba helyeztük a mikroorganizmusoknak megfelelő hőmérsékletre (29 °C gomba- és 25 °C bakteriális fertőzés esetén). A legyeket két naponta új fiolákba helyeztük a kísérletek végéig.

Az újszülött egerek fertőzése

A vemhes BALB/c egerek a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Állatházából származtak. Az egereket folyamatosan megfigyeltük, hogy meghatározzuk a születés dátumát. A születést

követő 2. napon az újszülött egerek súlyát megmértük (2,2-2,7 g között változott, az ugyanabban az alomban lévő egyedek számától függően), és 20 μ l 1×10^7 vagy 2×10^7 *Candida* sejtet tartalmazó szuszpenzióval vagy steril PBS (kontroll) oldattal injektáltuk azokat. Az újszülött egerek injekcióját 30 g x 8 mm-es tűvel ellátott 1 ml-es inzulinfecskendővel végeztük. A szuszpenzióban lévő buborékokat eltávolítottuk az embólia megelőzésének érdekében. A véna láthatóvá tételét fényforrás segítségével biztosítottuk (lásd: 17. ábra). Az injekció beadása után az állatokat naponta vizsgáltuk.

A vad típusú C57BL/6 és Dectin-1 egerek fertőzése

A kifejlett 8-12 hetes BALB/c, a 12-15 hetes C57BL/6 és Dectin-1^{-/-} (*Clec7a*^{-/-}) hím és nőstény egereket az oldalsó farokvénán keresztül, intravénásan fertőztük 100 μ l 2×10^7 *Candida* sejtet tartalmazó szuszpenzióval. A fertőzést követően az egereket folyamatosan, naponta monitoroztuk.

5.3.3. A *D. melanogaster* túlélés vizsgálata

A fiolánkénti 15 db (csoportonként 3 db fiola, összesen 45 db légy) vad típusú és mutáns *D. melanogaster* törzseket 2×10^7 sejt/ml gombaszuszpenzióval oltottuk. A túléléshez a legyeket 7 napig monitoroztuk és két naponta új fiolákba helyeztük. Az eredményeket a túlélő legyek százalékában fejeztük ki a fertőzés utáni különböző időpontokban.

5.3.4. A CFU (colony-forming unit, kolóniaképző egység) meghatározása

CFU meghatározás *D. melanogaster*ben

A fiolánkénti 15 db (csoportonként 3 db fiola, összesen 45 db légy) vad típusú és mutáns *D. melanogaster* törzseket 2×10^7 sejt/ml gombaszuszpenzióval oltottuk és a jelzett kísérleti időpontokban (a szeptikus sérüléssel történt fertőzés után 0, 5, 48 és 96 óra) CO₂-vel elaltattuk, 1.5 ml-es Eppendorf csőbe helyeztük majd jégen tartottuk. A legyeket 900 μ l PBS-ben homogenizáltuk. A nyert szuszpenziót 5x-ére, 10x-ére és 50x-ére hígítottuk, YPD/PS agarlemezekre szélesztettük és 48 órán át inkubáltuk 30 °C-on. A legyekből visszanyert élesztő telepeket megszámoltuk, majd a kolonizáltság mértékét a hígításnak és a csoportonkénti légyszámnak megfelelően CFU/légy formájában fejeztük ki.

CFU meghatározás az egér modellekben

A jelzett kísérleti időpontokban (újszülött egér esetében 2 és 7 nap, felnőtt egerek esetében 1, 3 és 7 nap) a disszekciót és a PBS-sel történt perfúziót (az újszülött egerek esetében nem alkalmaztunk perfúziót a kis testtömeg és a szervek mérete miatt) követően az egerek szerveit megmértük, a lép, májat és agyat PBS-ben, míg a veséket proteáz inhibitor (Complete Protease Inhibitor Tablet, Santa Cruz Biotechnology) tartalmazó PBS-ben homogenizáltuk. A homogenizátumokból hígított szuszpenziót (10x-es, 50x-es, 100x-os hígítás) készítettünk és YPD/PS agar lemezekre szélesztettük, majd 30 °C-on 48 óráig inkubáltuk. A szervekből visszanyert gomba telepeket megszámoltuk, majd a kolonizáltság mértékét a hígításnak és a szerv tömegének megfelelően CFU/g szövetként fejeztük ki. A fennmaradó tömény szervhomogenizátumokat centrifugáltuk (1310×g, 4 °C, 15 perc) és a felülúszókat -80 °C-on tároltuk a citokinek méréséig.

5.3.5. Enzim-kötött immunoszorbens próba (ELISA)

A citokinek koncentrációját a 2 napos BALB/c egerek szervhomogenizátumainak felülúszóiból enzim-kötött immunoszorbens próba (ELISA) segítségével határoztuk meg. A kísérletek során a következő termékeket használtuk: Mouse IL-1 β DuoSet (R&D Systems), Mouse TNF α DuoSet (R&D Systems), Mouse KC DuoSet (R&D Systems), Mouse IL-10 DuoSet (R&D Systems). A kísérleteket a gyártói utasításoknak megfelelően végeztük. A méréseket SPECTROstar Nano Microplate Reader készülékkel (BMG Labtech), 450 nm-en végeztük és az adatokat MARS Data Analysis szoftverrel (verzió 2.22) analizáltuk.

A C57BL/6 és Dectin-1^{-/-} egerek szervhomogenizátumaiból a citokin profil felállítását MultiPlex ELISA segítségével végeztük. A mérésekhez a Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Treg Cytokine 17-Plex Mouse ProcartaPlex™ Panel-t (eBioscience) használtuk a gyártó utasításainak megfelelően. A méréseket Dr. Bianca Schulze (Hans-Knöll Institute, Jéna, Németország) végezte.

A citokinek mennyiségének meghatározásához a felhasznált szerv tömegét és térfogatát meghatároztuk, az eredményeket 1 g szövetre vonatkoztatva pg-ban és ng-ban adtuk meg.

5.3.6. Áramlási citometria vizsgálatok az immunsejt infiltráció meghatározásához

Egysejt szuszpenzió készítése lépéből:

A lép szövet darabokat megmértük, majd 2 ml PBS-sel 70 µm-es sejtszűrőn 50 ml-es Falcon csőbe homogenizáltuk. Centrifugálást követően (300×g, 8 perc, 4 °C) a sejt pelletet 1 percig 2 ml ACK pufferrel kezeltük jégen, majd megállítottuk a reakciót 10 ml 3%-os FBS-t tartalmazó PBS-sel. Centrifugálás után (300×g, 3 perc, 4 °C) Bürker kamra segítségével meghatároztuk a sejtszámot, majd 100 µl 2×10^5 sejtet tartalmazó szuszpenziót mértünk 96 lyukú V-aljú lemezekre (CELLSTAR®).

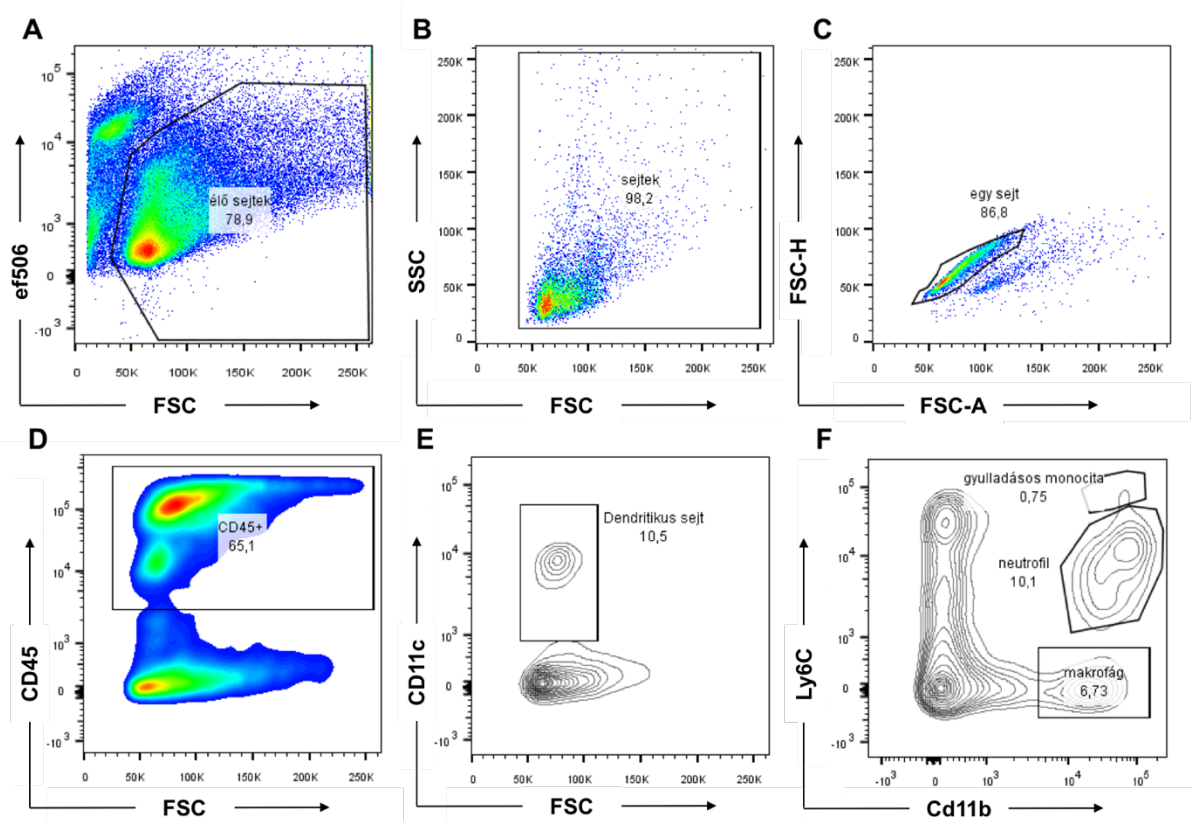
Egysejt szuszpenzió készítése veséből és májból:

A vese és máj szövet darabokat megmértük, majd steril penge segítségével felaprítottuk. A szöveteket 9.5 ml RPMI 1640/10 % FBS/1 % PS oldatot tartalmazó 15 ml-es Falcon csőbe helyeztük, majd a szervminták emésztéséhez 200 µl kollagenáz A-t (30 mg/ml, Sigma-Aldrich), 200 µl DNázt (0,7 mg/ml, Sigma-Aldrich) és 100 µl Na-piruvátot (1 mM, Sigma-Aldrich) adtunk. A csöveket 30 percig 37 °C-on rázattuk, majd a szövet darabokat 70 µm-es sejtszűrőn 50 ml-es Falcon csőbe homogenizáltuk 10 ml 3%-os FBS-t tartalmazó PBS-sel. Centrifugálást (300×g, 8 perc, 4 °C) követően a sejt pelletet 2 ml ACK pufferben vettük fel, majd jégen inkubáltuk 1 percig. A reakció megállításához a mintákhoz 10 ml 3%-os FBS-t tartalmazó PBS-t adtunk. Centrifugálás után (300×g, 8 perc, 25 °C) a pelletet 3 ml 70% Percoll oldatban felszuszpendáltuk, majd a 3 ml 70%-os Percoll szuszpenziót egy 15 ml-es Falcon csőben lévő 3 ml 30% Percoll oldat alá pipettáztuk. A mintákat 20 percig centrifugáltuk (400×g, szobahőmérséklet). A külön réteget képező sejteket összegyűjtöttük és kétszer 10 ml PBS-sel mostuk (300×g, 5 perc, 4 °C). Bürker kamra segítségével meghatároztuk a sejtszámot, majd 100 µl 2×10^5 sejtuszuszpenziót mértünk 96 lyukú V-aljú lemezekre.

A szervekből származó sejtek antitesttel történő festése (“Multicolour”antitestes festés):

A 96 lyukú V-aljú lemezekben lévő sejteket kétszer mostuk 200 µl PBS-sel (300×g, 3 perc, 25 °C). Az élő és halott sejtek elkülönítéséhez a mintákhoz 50 µl eF506 festéket (1:500 PBS-

ben) adtunk és 20 percig jégen inkubáltuk azokat. A festék centrifugálással (300×g, 4 perc, 4 °C) történő eltávolítását követően a mintákat kétszer mostuk 200 µl FACS pufferrel, majd 5 percig 10 µl/lyuk Fc-Block oldatot (1:50 FACS pufferben) adtunk hozzájuk. Ezt követően 20 µl antitesteket tartalmazó oldattal festettük a mintákat jégen 15 percig, fénytől elzárva. A festést követően a mintákat kétszer mostuk FACS pufferrel (centrifugálás: 300×g, 4 perc, 4 °C), majd 100 µl 2 % PFA/PBS oldatban fixáltuk szobahőmérsékleten 20 percig. A fixáló oldat eltávolítása után kétszer mostuk PBS-sel (centrifugálás: 400×g, 3 perc, 4 °C), majd a mintákat a mérésig 4 °C-os hűtőben tároltuk. A felhasznált antitesteket a 3. táblázat tartalmazza. A méréseket a BD FACSVersé készülékkel végeztük, az adatokat FlowJo v10 szoftver segítségével elemeztük. A sejt populációk identifikálásához először megkülönböztettük az élő és halott sejteket (8.A. ábra), majd az élő sejteken belül (8.B. ábra) kiválasztottuk az egy sejt populációt (8.C. ábra). A következő lépésben a CD45+ sejteket (8.D. ábra) választottuk ki és a populáción belül elemeztük a dendritikus sejteket (8.E. ábra), a makrofágok, a neutrofilek és a gyulladásos monociták százalékos arányát (8.F. ábra). Az alacsony százalékos arány miatt a dolgozat nem tartalmazza a gyulladásos monocitákból származó adatokat. Az immunsejtek abszolút számát a következő képlet alapján kalkuláltuk ki: $[(\text{teljes minta térfogata} / \text{festéshez felhasznált minta térfogata}) * ((\text{teljes minta térfogata} / \text{mért minta térfogata}) * \text{CD45+ sejtek száma})] / (\text{mg/felhasznált szerv}) / (\text{makrofágok vagy dendritikus sejtek vagy neutrofil granulociták \% -os aránya} / 100)$ és mint szám/szerv határoztuk meg.



8. ábra. Az áramlási citometria során használt stratégia az immunsejtek meghatározásához.

3. táblázat. A kísérletek során felhasznált antitestek listája.

FITC anti-mouse Ly6G antibody	BioLegend
FITC rat IgG2a izotípus kontroll	BioLegend
PE-Cy7 anti-mouse CD45 antibody	BioLegend
PE-Cy7 rat IgG2b izotípus kontroll	BioLegend
PerCP-Cy5.5 anti-mouse Cd11c antibody	BioLegend
PerCP-Cy5.5 ahan IgG1 izotípus kontroll	BioLegend
Alexafluor 647 anti-mouse Cd11b antibody	BioLegend
Alexafluor 647 rat IgG2b izotípus kontroll	BioLegend
eV450 anti-mouse Ly6C antibody	eBioscience
eV450 rat IgM izotípus kontroll	eBioscience
Fixable Viability Dye eFluor™ 506	eBioscience
TruStain FcX™ (anti-mouse CD16/32) Antibody	BioLegend

5.3.7. RNS izolálás, cDNS szintézis és qRT-PCR

Totál RNS izolálás

Az ecetmuslicákat 5×10^7 sejt/ml gomba vagy baktérium szuszpenzióba mártott inzulinos tűvel oltottuk. 24 órával a fertőzést követően a legyeket (5 db ecetmuslica/minta) 1.5 ml-es Eppendorf csőbe gyűjtöttük, majd folyékony nitrogénbe helyeztük. RNS izoláláshoz Quick-RNA MiniPrep Kit-et (Zymo Research) használtunk, a mellékelt gyártói utasításoknak megfelelően. Az izolált RNS mennyiségét NanoDrop spektrofotométer (ND-1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific) segítségével határoztuk meg. A minta DNS szennyezettségét a *D. melanogaster Drosomycin* génre tervezett primerek segítségével, valós idejű PCR-rel ellenőriztük. Ezt követően a megfelelő mennyiségű és minőségű totál RNS izolátumokból cDNS-t szintetizáltunk.

cDNS szintézis

A cDNS szintézishez RevertAid First strand cDNA synthesis kit-et (Thermo Scientific) használtunk a gyártó utasításai szerint. A szintézishez 1 µg totál RNS-t alkalmaztunk. Egy reakció során 0,5 µl oligo(dT)₁₈ és 0,5 µl random hexamer primert használtunk. Az alkalmazott reakciókörülmények a következők voltak: 25 °C/5 perc, 42 °C/60 perc és végül 70 °C/5 perc.

Kvantitatív valós-idejű PCR (qRT-PCR)

A qRT-PCR során Maxima SYBR Green qPCR Master Mix-et (Thermo Scientific) használtunk a gyártó utasításainak megfelelően. A qRT-PCR-hez 50x-es hígított cDNS mintákat és 300 nM koncentrációjú specifikus primereket alkalmaztunk. Belső kontrollként a ribosomal protein 49 (*rp49*) gén szolgált. A reakciók során felhasznált primerek a következők voltak: *rp49*, *Drosomycin* (*Drs*) a primereket az irodalom alapján használtuk (Gottar és mtsi., 2006), *Metchnikowin* (*Mtk*). A primer szekvenciákat a 4. táblázat tartalmazza.

4. táblázat. A qRT-PCR során felhasznált primerek és jellemzőik.

Primer	Írány	Szekvencia 5'-3'	Amplifikált szakasz mérete (bp)
<i>rp49</i>	forward	GACGCTTCAAGGGACAGTATCTG	144
	reverse	AAACGCGGTTCTGCATGAG	
<i>Drs</i>	forward	CGTGAGAACCTTTTCCAATATGATG	79
	reverse	TCCCAGGACCACCAGCAT	
<i>Mtk</i>	forward	GCTACATCAGTGCTGGCAGA	146
	reverse	TGTGTTAACGACATCAGCAGTGTG	

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 perc); 2. denaturáció (95 °C, 10 mp.); 3. annealing-elongáció (60 °C, 30 mp.); 4. oladási görbe analízis (65 °C-ról 95 °C-ra, 0,5 °C/5 mp.). A program a 2-3. lépéseket 40-szer ismételte. Az eredményeket a $2^{-\Delta\Delta C_t}$ módszer (Livak és Schmittgen 2001) segítségével értékeltük ki.

5.3.8. Mikroszkópos vizsgálatok

Drosomycin-GFP expressziójának vizsgálata

Kísérleteink során a *C. parapsilosis* által indukált *Drosomycin* termelés megfigyeléséhez *Drosomycin*-GFP transzgén hordozó *Drosophila* törzs (Ferrandon és mtsi., 1998) egyedét 2×10^8 sejt/ml koncentrációjú *Candida* sejtszuszpenzióval illetve kontrollként PBS-sel injektáltuk. A megfigyeléseket 24 órával a fertőzést követően végeztük el OLYMPUS SZX7 sztereomikroszkóppal.

Hisztopatológiai vizsgálatok

A PBS kontroll és a $20 \mu\text{l}$ 2×10^7 *C. parapsilosis* sejtekkel fertőzött egerek teljes szerveit 4% paraformaldehidben fixáltuk és ebben tartottuk, amíg szövettani feldolgozásra nem kerültek. A rögzített szerveket metszettük és hagyományos PAS (perjódsav-Schiff) festéssel festettük.

A szövetmetszeteket BX51 OLYMPUS vagy Zeiss Imager Z1 mikroszkóppal analizáltuk.

5.4. Statisztikai analízis

A statisztikai számításokat a GraphPad PRISM 7 szoftverrel végeztük. A statisztikai szignifikancia kiszámításához használt tesztet az adott ábraaláírás tartalmazza. Statisztikailag akkor tekintettük szignifikánsnak a különbséget, ha $p < 0,05$ volt.

6. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

6.1. *C. parapsilosis* fertőzés jellemzése *D. melanogaster* modellben

6.1.1. A *D. melanogaster* túlélésének vizsgálata *Candida* fertőzést követően

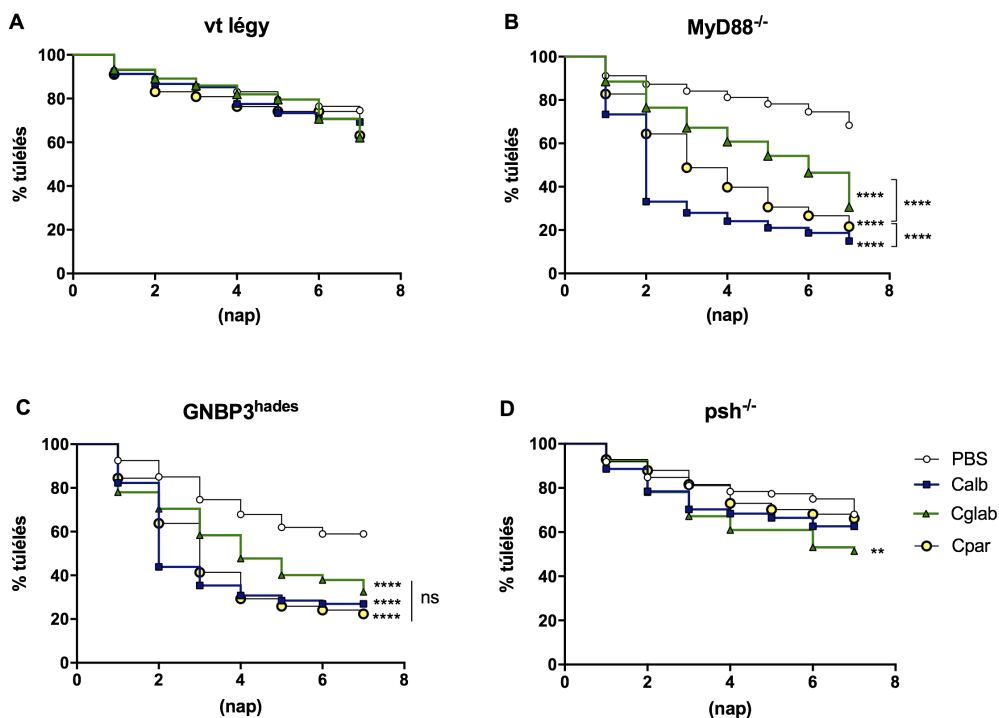
A *D. melanogaster* modellben a *C. albicans* és *C. glabrata* fertőzés részletesen jellemzett, azonban a *C. parapsilosis* fertőzést még senki nem vizsgálta mélyebben. Egyedül Chamilos és munkatársai írták le, hogy a Toll-deficiens legyek túlélési aránya nagyobb a *C. parapsilosis* fertőzést követően, mint a *C. albicans* fertőzésnél (Chamilos és mtsi., 2006).

Korábban Quintin és munkatársai kimutatták, hogy a MyD88 mutáns (a Toll szignaling transzkripciós faktora) legyek érzékenyek a *C. albicans* és *C. glabrata* fertőzésre (Quintin és mtsi., 2013). Így elsőként teszteltük a *MyD88^{-/-}* *D. melanogaster* törzs túlélését a *C. parapsilosis*szal történt fertőzést követően. Kísérleteink során *C. parapsilosis* típus törzsként a laboratóriumunkban gyakran alkalmazott GA1 jelű klinikai izolátumot választottuk. Referencia törzsként a *C. albicans* SC5314 (az egyik leggyakrabban alkalmazott referencia törzs) és a *C. glabrata* CBS 138 törzseket használtuk. Annak érdekében, hogy össze tudjuk hasonlítani a gombafajok virulenciáját a különböző genotípusú legyekben, a kísérletekhez 2×10^7 sejt/ml *Candida* szuszpenzióba mártott inzulinos tűvel szűrtük meg (fertőztük) az ecetmuslicákat és vizsgáltuk azok túlélését. Ezt a dózist a szakirodalmi adatok és saját tapasztalataink alapján határoztuk meg (Chamilos és mtsi., 2006).

Eredményeink azt mutatják, hogy a *Candida* fajokkal injektált vad típusú (vt) legyek nem érzékenyek a *Candida* fertőzésre (9.A. ábra), ami megfelel a szakirodalmi adatoknak (Quintin és mtsi., 2013). A *MyD88^{-/-}* legyek halálozási aránya szignifikánsan nagyobb a *C. parapsilosis*szal történt inkubáció során összehasonlítva a PBS kontrollal. Mindemellett azt is tapasztaltuk, hogy a *C. parapsilosis* fertőzés a *C. albicans*hoz képest csökkent, míg a *C. glabrata*hoz viszonyítva nagyobb elhullást okozott a mutáns legyekben (átlag túlélési arány a 7. napon: *C. albicans* 14.9%, *C. glabrata* 30.6%, *C. parapsilosis* 21.6%) (9.B. ábra). Így ezekből az eredményekből arra következtettünk, hogy a *D. melanogaster* Toll útvonal szükséges a *C. parapsilosis* elleni védekezésben.

Ahogy az már korábban említésre került (3.9.1. fejezet), a Toll transzmembrán fehérje nem képes a PAMP-ok közvetlen érzékelésére, ehhez szenzor molekulák szükségesek, amelyek a ligand kötése után aktiválják az útvonalat. A *Drosophila* GGBP3 nevű PRR-je,

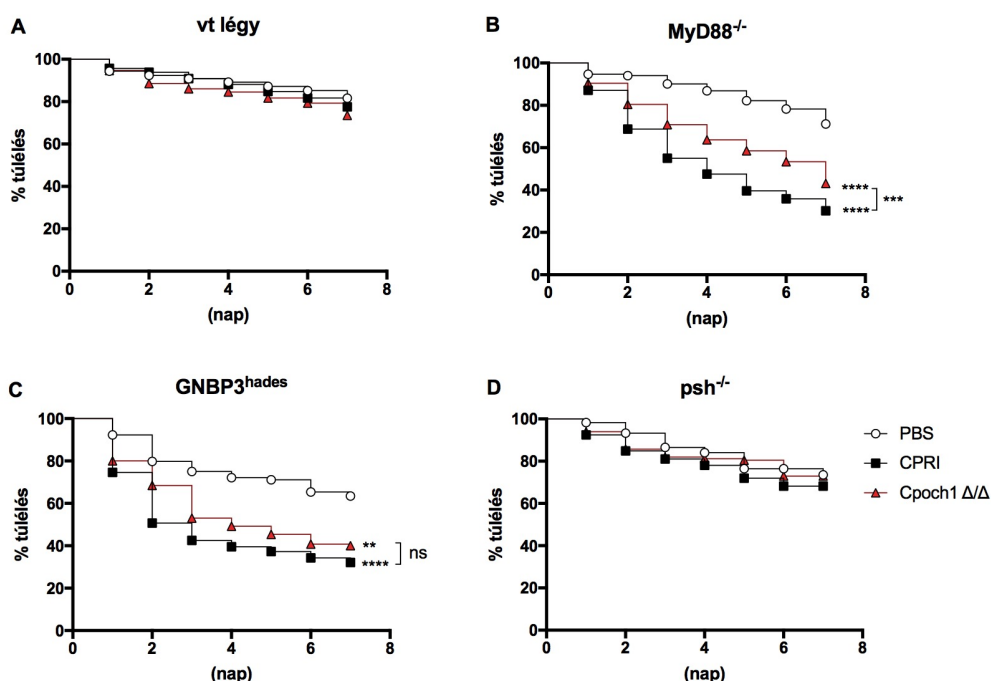
amely a sejtfal β -1,3-glükánt képes kötni, szükséges a *C. albicans* és *C. glabrata* fertőzés elleni védelemben (Gottar és mtsi., 2006; Quintin és mtsi., 2013). A Persephone (*psh*) szerin proteáz pedig a gomba proteázok aktivitását érzékeli a hemolimfában és mutációja érzékenységet okozott a *C. glabrata* fertőzésre (Quintin és mtsi., 2013), azonban a *psh*^{-/-} legyek rezisztensek a *C. albicans*szal szemben (Gottar és mtsi., 2006). Így megvizsgáltuk, hogy a GGBP3 és a *psh* szerepet játszik-e a felismerésben és a Toll útvonal aktivációjában a *C. parapsilosis* fertőzés során. Eredményeink azt mutatják, hogy a *C. albicans* és *C. glabrata* fertőzött *GGBP3*^{hades} legyek túlélési aránya szignifikánsan csökkent a PBS kontroll csoporthoz képest. Szintén látható, hogy az előző két fajhoz hasonló módon, a *C. parapsilosis* fertőzés szignifikáns csökkenést okozott a β -glükán receptor mutáns *ecetmuslica* túlélésében (9.C. ábra). A *psh*^{-/-} legyek a vad típushoz hasonlóan rezisztensek a *C. albicans* és *C. parapsilosis* fertőzésre és egyedül a *C. glabrata*val történt infekció okozott érzékenységet a kontrollhoz képest (9.D. ábra).



9. ábra. A *D. melanogaster* túlélésének vizsgálata *C. albicans*, *C. glabrata* és *C. parapsilosis* fertőzést követően. A vt (A), *MyD88*^{-/-} (B), *GGBP3*^{hades} (C) és *psh*^{-/-} (D) legyek (n=45/csoport) túlélését a gombákkal (2x10⁷ sejt/ml) történt fertőzést követően 7 napig monitoroztuk. Az ábra négy független kísérlet eredményeit foglalja össze százalékos arányban megadva. Feltüntetett adatok: PBS, PBS-sel injektált kontroll csoport; Calb SC5314, *C. albicans* SC5314; Cglab CBS 138, *C. glabrata* CBS 138; Cpar GA1, *C. parapsilosis* GA1. Szignifikancia mértéke: **** p<0,0001; ** p<0,0021; ns, nem szignifikáns (Mantel-Cox teszt).

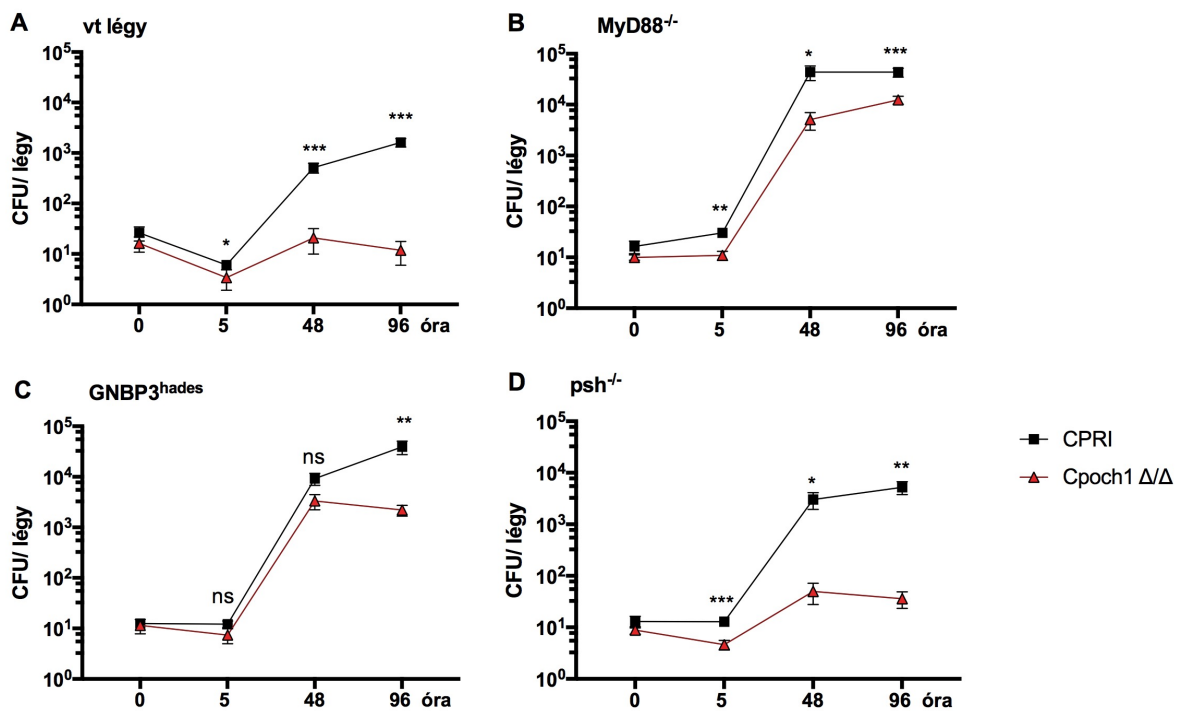
6.1.2. A sejtfal *N*-mannoziláció szerepe a *C. parapsilosis* virulenciájában a *D. melanogaster* modellben

Annak érdekében, hogy megfigyeljük hogy a sejtfal *N*-mannán komponense hatással van-e a *C. parapsilosis* patogenitására ebben a modellben, vizsgáltuk a *vt*, a *MyD88^{-/-}*, a *GNBP3^{hades}* és a *psh^{-/-}* legyek túlélését a *Cpoch1Δ/Δ* és a referencia törzzsel (CPRI) történt szeptikus fertőzést követően. Azt tapasztaltuk, hogy a *Cpoch1Δ/Δ* fertőzésre a *MyD88^{-/-}* legyek érzékenységet mutatnak a PBS kontroll csoporthoz viszonyítva, azonban a legyek túlélési aránya szignifikánsan magasabb a CPRI-injektált csoporthoz képest (10.B. ábra). A *GNBP3^{hades}* legyek életképessége szignifikánsan csökkent a *Cpoch1Δ/Δ*-val való inkubáció hatására, emellett nem detektáltunk különbséget a CPRI és a *Cpoch1Δ/Δ* fertőzött csoportok túlélési arányában (10.C. ábra). Adataink alapján a *vt* és *psh^{-/-}* legyek életképessége nem mutatott eltérést a gombával fertőzött és a PBS kontroll csoport között (10. ábra A. és D.).



10. ábra. A *D. melanogaster* túlélésének vizsgálata a CPRI és a *Cpoch1Δ/Δ* fertőzést követően. A *vt* (A), *MyD88^{-/-}* (B), *GNBP3^{hades}* (C) és *psh^{-/-}* (D) legyek (n=45/csoport) túlélését a gomba törzsekkel (2×10^7 sejt/ml) történt fertőzést követően 7 napig monitoroztuk. Az ábra egymástól négy független kísérlet eredményeit foglalja össze százalékos arányban megadva. Feltüntetett adatok: PBS, PBS-sel injektált kontroll csoport; CPRI, *C. parapsilosis* CPRI; *Cpoch1Δ/Δ*, *C. parapsilosis och1Δ/Δ*. Szignifikancia mértéke: **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,0002$; ** $p < 0,0021$; ns, nem szignifikáns (Mantel-Cox teszt).

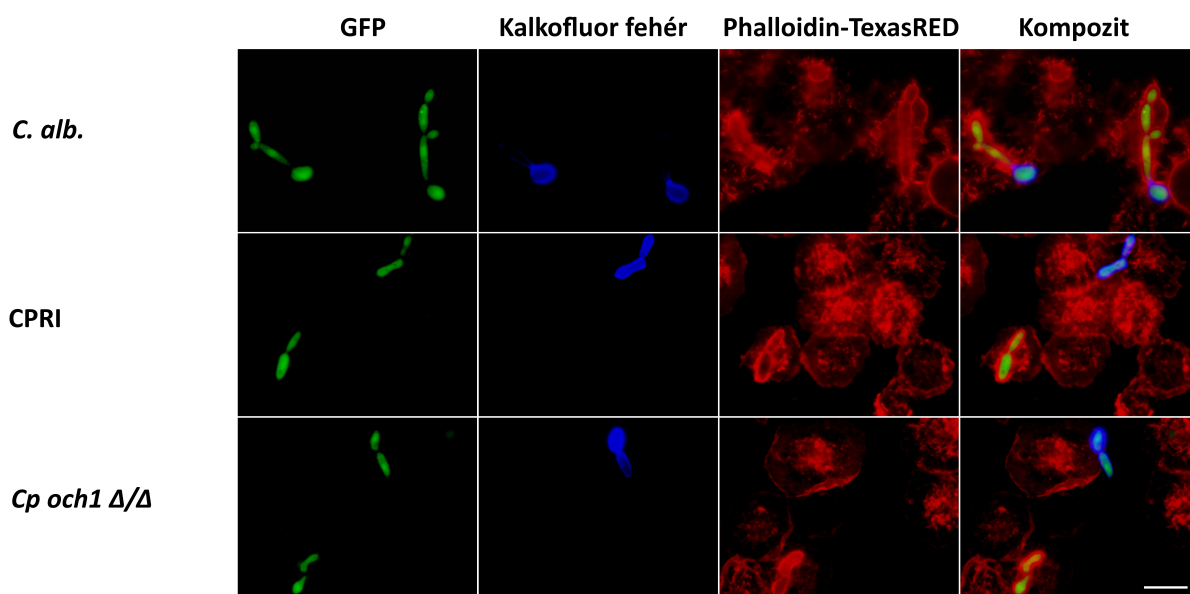
A kísérletek során összehasonlítottuk a *C. parapsilosis* törzsek proliferációját a különböző genotípusú ecetmuslicákban a CFU meghatározásával. Azt tapasztaltuk, hogy a *vt* és *psh*^{-/-} legyekben a *Cpoch1Δ/Δ* csökkent fertőzőképességgel bírt, mivel szignifikánsan alacsonyabb CFU volt detektálható a fertőzést követően 5, 48 és 96 óra elteltével a CPRI-hez viszonyítva. Szintén látható, hogy ezekben a csoportokban a *Cpoch1Δ/Δ* CFU csökkenést mutat a fertőzést követő 48 és 96 óra között, ami utal a mutáns gombasejtek hatékonyabb eliminációjára (11. ábra A. és D.). A *MyD88*^{-/-} törzsben is tapasztalható a különbség, miszerint a *Cpoch1Δ/Δ* szignifikánsan csökkent proliferációt mutat a CPRI-vel összehasonlítva (11.B. ábra). A *GNBP3*^{hades} esetében a CPRI és *Cpoch1Δ/Δ* kolónia számban nem detektáltunk eltérést az első három inkubációs időpontban, azonban szignifikáns különbséget tapasztaltunk a fertőzést követő 96. órában (11.C. ábra).



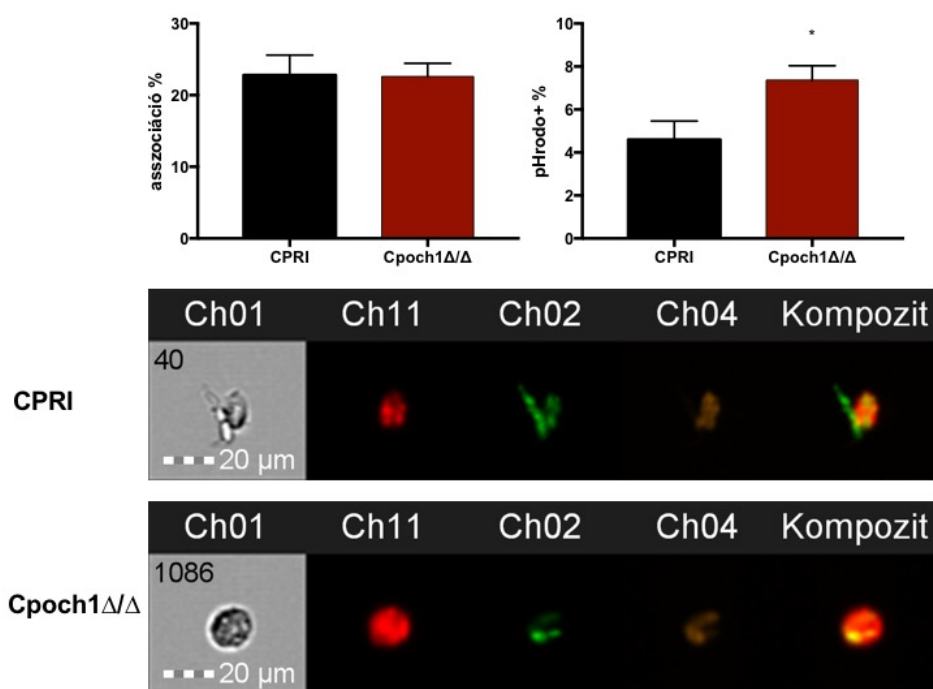
11. ábra. A *D. melanogaster* kolonizáltságának vizsgálata a CPRI és a *Cpoch1Δ/Δ* fertőzést követően. A CPRI és a *Cpoch1Δ/Δ* CFU/légy számát a *vt* (A), *MyD88*^{-/-} (B), *GNBP3*^{hades} (C) és *psh*^{-/-} (D) legyekben (n=15/csoport) a közvetlen az injektálás (0) illetve 5, 48 és 96 óra után határoztuk meg. A fertőzéshez 2x10⁷ sejt/ml gomba szuszpenziót használtunk. Az ábra egymástól hat független kísérlet eredményeit foglalja össze. Feltüntetett adatok: átlag ± standard hiba; CPRI, *C. parapsilosis* CPRI; *Cpoch1Δ/Δ*, *C. parapsilosis och1Δ/Δ*. Szignifikancia mértéke: *** p<0,0002; ** p<0,0021; * p<0,0332; ns, nem szignifikáns (Párosított t-teszt).

6.1.3. A *D. melanogaster* celluláris immunválaszának *in vitro* vizsgálata

Azt tapasztaltuk, hogy a vt legyek kolonizáltságában csökkenés figyelhető meg közvetlen az injektálást és a fertőzést követő 5 óra elteltével (10.A. ábra), ezért feltételeztük, hogy a jelenség mögött a *D. melanogaster* celluláris védelmének egyik eleme, a vérsejtek általi fagocitózis áll. A *C. albicans* patogenitására fókuszáló tanulmányok korábban már vizsgálták ezt a gazda-patogén interakciót *Drosophila* Schneider 2 (S2) és mbn2 hemocita eredetű sejtvonalakon (Levitin és mtsi., 2007; Davis és mtsi., 2011). Munkánk során a szakirodalomban már ismert *in vitro* modellt alkalmaztunk, amelyben az *l(3)mbn-1/TM6Tb* (*lethal(3)malignant blood neoplasm-1*) hemocita túltermelő *Drosophila* törzs harmadik stádiumú lárváiból izoláltunk primer sejteket. Ezeknek a sejteknek a fagocitáló képessége részletesen jellemzett *E. colival* történt stimuláció során (Kurucz és mtsi., 2007). A vérsejtek általi fagocitózist mikroszkópos vizsgálattal figyeltük meg a GFP-*C. albicans*, GFP-CPRI és a GFP-*Cpoch1Δ/Δ* stimuláció hatására. A vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy a primer hemociták képesek bekebelezni a *Candida* sejteket, azonban azt tapasztaltuk, hogy a fagocitózis mérhetőségéhez hosszabb inkubációs idő, 3 óra szükséges (12. ábra). A CPRI és a *Cpoch1Δ/Δ* indukált fagocitózis kvantitatív méréséhez áramlási citometriát alkalmaztunk, emellett vizsgáltuk a fagocitózis következtében a fagoszóma érését pH szenzitív pHrodo™ Red (a festék erősen fluoreszkáló jelet csak alacsony pH-n ad, vagyis a fagoszóma savas környezetében) sejtfal festék felhasználásával. Eredményeink alapján meglehetősen alacsony százalékban (~25%) tapasztaltunk asszociációt a gombasejtek és a vérsejtek között, emellett nem detektáltunk különbséget a referencia törzs és a sejtfal mutáns sejtekkel asszociált hemociták arányában. A pHrodo™ Red festék intenzitása alapján szintén elmondható, hogy a fertőzést követően alacsony (CPRI: ~ 4,5%, *Cpoch1Δ/Δ*: ~7,3%) azoknak a hemocita sejteknek az aránya, amelyeknek a fagoszómájában *Candida* sejt volt detektálható. Ezen belül szignifikánsan nagyobb százalékban figyeltünk meg azonban pHrodo™ Red pozitív hemocita sejteket a *Cpoch1Δ/Δ* törzzsel inkubált mintákban, összehasonlítva a CPRI-vel (13. ábra).



12. ábra. Az *l(3)mbn-1* *Drosophila* lárvából izolált hemociták fagocitózisának vizsgálata. Inkubációs idő 3 óra. GFP: GFP-t expresszáló *Candida* törzsek, kalkofluor fehér (a gomba sejt falban lévő kitinhez kötődik), Phalloidin-TexasRED a hemociták F-aktinjához kötődik. Méretskála: 10 μ m.

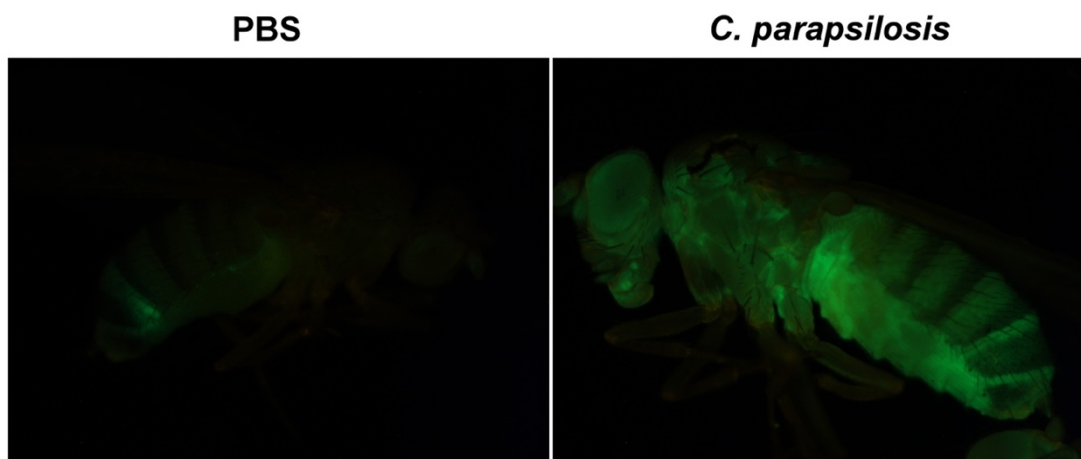


13. ábra. A fagocitózis vizsgálata áramlási citometriával. Inkubációs idő 3 óra. Feltüntetett adatok: átlag \pm standard hiba. CPRI, *C. parapsilosis* CPRI; *Cpoch1 Δ/Δ* , *C. parapsilosis och1 Δ/Δ* . Szignifikancia mértéke: * $p < 0,0332$; (Párosított t-teszt). Ch11, CellMask-DeepRedTM jelölt vérsejtek; Ch02, Alexa Fluor® 488 jelölt *Candida* sejtek; Ch04, pHrodoTM Red pH szenzitív festék intenzitása.

6.1.4. A *D. melanogaster* humorális válaszána vizsgáata a *C. parapsilosis* fertőzést követően

A mikrobiális fertőzés során a PRR-ek által aktivált Toll útvonal az antimikrobiális peptidek termelődéséhez vezet, ezek közül is a Drosomycin és a Metchnikowin (a Metchnikowint szabályozhatja az ImD útvonal is) antifungális hatással is rendelkezik és kimutatták indukciójukat *Candida* fertőzések hatására (Levashina és mtsi., 1995; Levashina és mtsi., 1998; Alarco és mtsi., 2004).

Mivel korábban már számos hasonló kísérletet végeztek *C. albicans*szal, az optimális inkubációs időt (24 óra) a szakirodalmi adatok alapján választottuk (Glittenberg és mtsi., 2011b). Első lépésben a CPRI által indukált Drosomycin termelődést vizsgáltuk a *Drosomycin*-GFP transzgént hordozó *Drosophila* törzs egyedeinek sztereomikroszkópos megfigyelésével. Azt tapasztaltuk, hogy 24 óra elteltével a PBS-sel injektált ecetmuslicához képest a CPRI fertőzött egyedek GFP expressziója emelkedett, ami mutatja az antifungális peptid termelődését a gomba stimulus hatására (14. ábra).

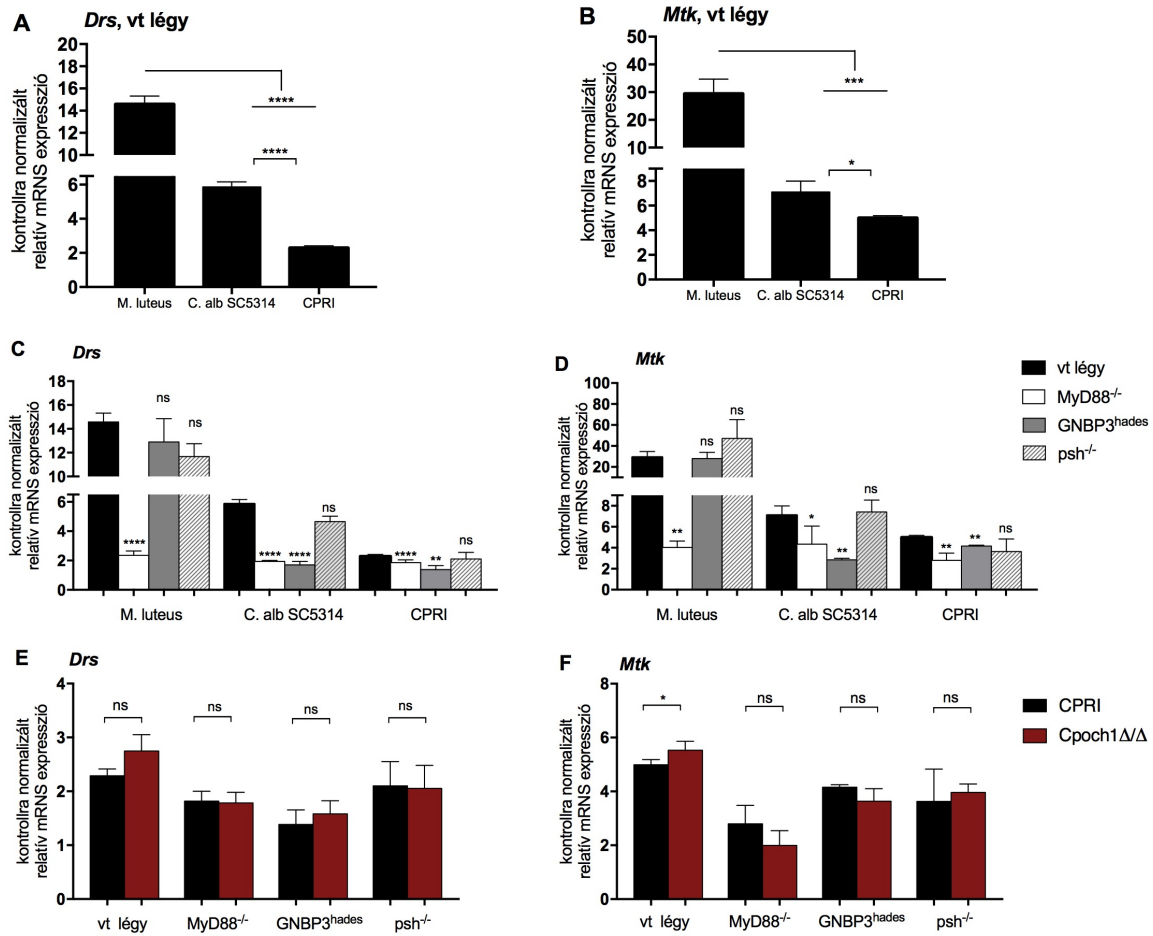


14. ábra. A *C. parapsilosis* indukált *Drosomycin*-GFP kifejeződése a *D. melanogaster*ben. A *Drosomycin*-GFP transzgént hordozó *Drosophila* törzs egyedei 24 óra után a PBS-sel és *C. parapsilosis*szal (CPRI) (2×10^8 sejt/ml) történt fertőzés után.

Kísérleteink során a mikrobiális stimulust követő AMP indukciót RNS kivonás és cDNS szintézist követően valós-idejű PCR-rel is tanulmányoztuk. A vizsgálatokhoz referenciaként a *C. albicans* SC5314 gomba és a *M. luteus* SZMC 0264 baktérium törzset használtuk. A *M. luteus* Gram-pozitív baktériumként indukálja a *Drosophila* Toll útvonalat, azonban a baktérium esetében a GGBP3 receptor és a Persephone hiánya nincs szignifikáns hatással az AMP-k expressziójára (Gottar és mtsi., 2006; Issa és mtsi., 2018). A fertőzéshez 5×10^7 sejt/ml gomba illetve baktérium szuszpenzióval dolgoztunk, ami megfelelőnek bizonyult a CPRI és *C. albicans* esetében az AMP mRNS szint összehasonlításához, emellett a *M. luteus*szal történt inkubáció nem okozta a kísérleti állatok pusztulását.

A szakirodalmi adatoknak megfelelően azt tapasztaltuk, hogy a vt gazdaszervezetben a *Candida* fajok által indukált *Drosomycin* (*Drs*) és *Metchnikowin* (*Mtk*) mRNS szint szignifikánsan alacsonyabb, mint a *M. luteus* indukált mintákban (Quintin és mtsi., 2013). Eredményeink azt is mutatják, hogy a *C. albicans* szignifikánsan magasabb AMP expressziót váltott ki, mint a CPRI (15.A. és 15.B. ábra). A következő lépésben összehasonlítottuk a vt és az immundeficiens légy csoportokban az mRNS szint változását. A vt légyhez viszonyítva a gombával és a baktériummal inkubált *MyD88*^{-/-} csoportok esetében szignifikánsan alacsonyabb mRNS szintet detektáltunk, ami bizonyítja, hogy a jelátviteli fehérje hiányában károsult a *Drs* és *Mtk* expresszió. A vt és *GGBP3*^{hades} között nem detektáltunk különbséget a *M. luteus* által generált AMP-k mRNS expressziójában. Az *M. luteus* injektált *psh*^{-/-} legyekben habár alacsonyabb *Drs* mRNS szintet detektáltunk a vt csoporthoz képest, a különbség nem bizonyult szignifikánsnak, hasonlóan az irodalmi adatokhoz (Issa és mtsi., 2018). A *C. albicans* és CPRI fertőzött vt ecetmuslica csoportokhoz viszonyítva a *GGBP3*^{hades} legyekben szignifikáns csökkenést figyeltünk meg a *Drs* és *Mtk* indukcióban, míg a Persephone hiánya nem volt szignifikáns hatással a gombával stimulált antifungális peptidek mRNS szintjére (15.C. és 15.D. ábra).

Vizsgáltuk, hogy befolyásolja-e az *N*-mannán hiánya a sejtfalban a CPRI indukált AMP-k expresszióját. Azt tapasztaltuk, hogy a vt *D. melanogaster* törzsben a *Cpoch1Δ/Δ* fertőzés magasabb AMP indukciót okozott, ami a *Mtk* esetében szignifikánsnak bizonyult a CPRI-hez viszonyítva (15.E és 15.D. ábra). Ezen felül nem tapasztaltunk különbséget a *MyD88*^{-/-}, a *GGBP3*^{hades} és a *psh*^{-/-} törzsek CPRI és *Cpoch1Δ/Δ* által stimulált AMP-k mRNS szintjében (15.E. és 15.F. ábra).



15. ábra. Az antimikrobiális peptid indukció vizsgálata *D. melanogaster*ben. A vt *D. melanogaster* *Drs* (A) és *Mtk* (B) mRNS szint összehasonlítása *M. luteus*, *C. albicans* és *Cp* vt stimulált mintákban. A *M. luteus*, *C. albicans* és CPRI indukált *Drs* (C) és *Mtk* (D) mRNS szint összehasonlítása a vt, a *MyD88*^{-/-}, a *GGBP3*^{hades} és a *psh*^{-/-} törzsekben. A CPRI és a *Cpoch1Δ/Δ* stimulált *Drs* (E) és *Mtk* (F) mRNS szint a vt, a *MyD88*^{-/-}, a *GGBP3*^{hades} és a *psh*^{-/-} törzsekben. A fertőzéshez felhasznált szuszpenzió: 5×10⁷ sejt/ml. Inkubációs idő 24 óra. Az ábra három független kísérlet eredményeit foglalja össze. Feltüntetett adatok: átlag ± standard hiba. Szignifikancia mértéke: **** p<0,0001; *** p<0,0002; ** p<0,0021; * p<0,0332; ns, nem szignifikáns (Párosított t-teszt).

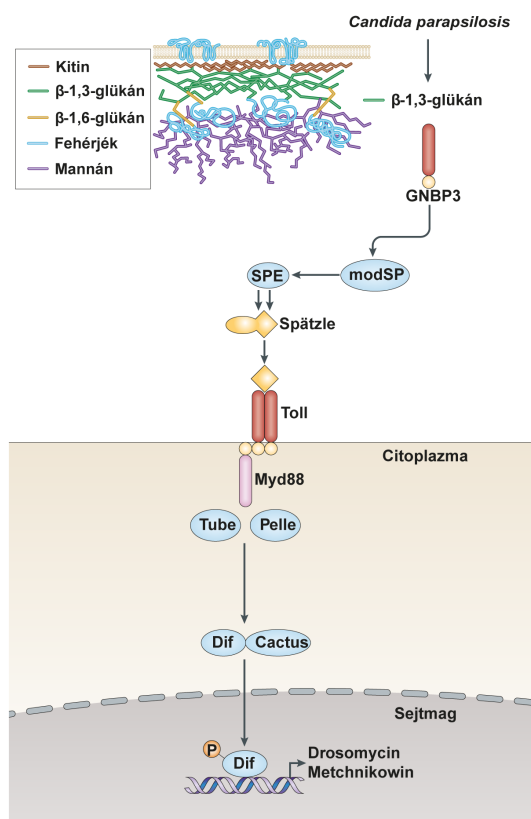
6.1.5. A *C. parapsilosis* fertőzés jellemzése *D. melanogaster* modellben – értékelés

Munkánk során jellemeztük a *C. parapsilosis* patogenitását a *Drosophila* modellben a túlélés, a kolonizáltság, az antimikrobiális peptidek termelődésének és a fagocitózis vizsgálatával. Azt tapasztaltuk, hogy a *MyD88*^{-/-} és a *GNBP3*^{hades} ecetmuslica érzékenységet, míg a *psh*^{-/-} *Drosophila* törzs rezisztenciát mutat a *C. parapsilosis* szemben. A humorális válasz vizsgálata során megfigyeltük, hogy a *C. parapsilosis* indukált *Drs* és *Mtk* mRNS szint szignifikánsan csökkent a *MyD88*^{-/-} és a *GNBP3*^{hades} legyekben, azonban a *psh*^{-/-} csoportban nem találtunk eltérést a vt *Drosophila* törzshöz viszonyítva. Így adataink arra utalnak, hogy a *C. parapsilosis* jelenlétének érzékelését a β -glükán receptor végzi, ami a Toll útvonal aktivációjához vezet (16. ábra). Kísérleteinkben a *psh*^{-/-} *D. melanogaster* törzs rezisztensnek bizonyult a *C. parapsilosis*sal történt stimulációra, ami alapján a Persephone nem érintett a *C. parapsilosis* fertőzés kontrollálásában. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a *C. parapsilosis* által kiváltott immunválasz ebben a rovar modellben a *C. albicans* fertőzéshez hasonlóan alakul ki (Gottar és mtsi., 2006). Emellett a túlélés és az antifungális peptidek indukciója során kapott eredményeink szintén alátámasztják a korábban megfigyelt tendenciát a két faj virulenciáját illetően, azaz a *C. parapsilosis* alacsonyabb fertőzőképességgel rendelkezik a *C. albicans*sal összehasonlítva (Chamilos és mtsi., 2006). A sejtfal mutáns törzsszel történt vizsgálatok során az *N*-mannoziláció hiánya következtében a *C. parapsilosis* csökkent fertőzőképességet mutatott a *MyD88*^{-/-} *D. melanogaster*ben, ami megegyezik a korábban egér modellben tapasztaltakkal (Perez-Garcia és mtsi., 2016). Az irodalomban a *pmr1* génben deléció *C. albicans* törzs, amely mind az *N*- és *O*-mannozilációban mutációt hordoz, hasonlóan csökkent virulenciával rendelkezett ebben a rovar modellben (Glittenberg és mtsi., 2011a; Glittenberg és mtsi., 2011b). Ezzel szintén kimutattuk, hogy a Toll útvonalban deficiens *Drosophila* túlélésének és kolonizáltságának vizsgálata alkalmas a *C. parapsilosis* törzsek virulencia különbségeinek kimutatására.

A humorális válasz elemzése során a *Cpoch1A/A* emelkedett *Drs* és szignifikánsan magasabb *Mtk* indukciót okozott a vad típusú légyben a CPRI-hez viszonyítva, ami utalhat arra, hogy a sejtfal mutációja következtében gyorsabban/hatékonyabban végbemennek a *Drosophila* felismerési mechanizmusok, amelyek az antimikrobiális peptidek termelődéséhez vezetnek. Adataink, miszerint nincs különbség a sejtfal mutáns és a vad típusú *C. parapsilosis* stimulus következtében a *GNBP3*^{hades} légy túlélésében, kolonizáltságában illetve

az antimikrobiális peptidek indukciójában megerősítik, hogy a *Drosophila* β -glükán receptor szerepet játszik a *C. parapsilosis* elleni hatékonyabb immunválasz kialakításában.

Kísérleteinkben az *l(3)mbn-1* lárvából származó vérsejtek alacsony arányú (~25%, 3 óra inkubáció után) fagocitáló képességet mutattak a *Candida* sejtekkel történt inkubáció során. Emellett adataink alapján a hemociták asszociációt mutató és a pHrodo™ Red pozitív populációjának aránya között különbség található. A *C. albicans* esetében a hemocita eredetű sejtvonalakon már 15 per elteltével is detektáltak fagocitáló gazda sejteket (Levitin és mtsi., 2007; Davis és mtsi., 2011), emellett jelenlegi tudásunk szerint az általunk alkalmazott primer sejteken még nem vizsgálták a *Candida* sejtek fagocitózisát. Így eredményeink arra utalhatnak, hogy a lárv hemociták habár képesek kisebb arányban a plazmatocita sejtek által fagocitózissal védekezni a gomba élesztő sejtjeivel szemben, viszont a nagyobb méretű pszeudohifa alakot más celluláris védekező mechanizmus során ártalmatlanítják, mint a hemolimfa koaguláció vagy a melanizáció. Azonban ennek az elméletnek a megerősítéséhez további kísérletek szükségesek és kutatócsoportunk jelenleg is vizsgálja a hemocita és a *Candida* sejtek interakcióját.



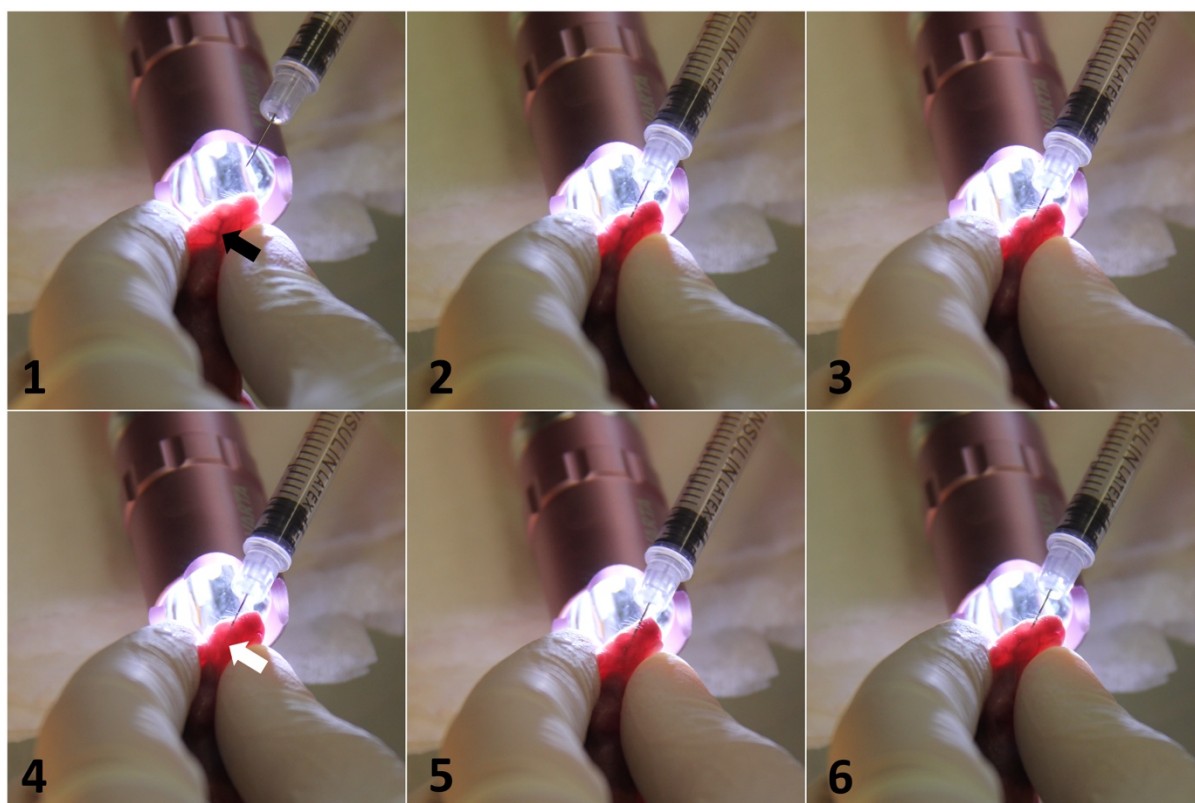
16. ábra. A Toll út vonal szabályozása a *C. parapsilosis* fertőzés során (Gow és mtsi., 2011) és (Buchon és mtsi., 2014) alapján módosítva.

6.2. A *C. parapsilosis* fertőzés jellemzése újszülött egér modellben

Mivel a *Candida* fertőzések gyakran érintenek gyermekeket és újszülötteket, a kutatók korábban már létrehoztak *in vivo* modelleket, hogy tanulmányozzák a fejlődő, éretlen immunrendszerben a kórokozók patogenitását. Ezek a tanulmányok a szisztémás candidiasis modellezéséhez pár napos egereket használtak fel és emésztőszervrendszeri vagy intraperitoneális oltást alkalmaztak a fertőzéshez (Pope és mtsi., 1979; Domer 1988; Tsai és mtsi., 2011). Ezek a modellek azonban tartalmaznak limitáló tényezőket is. A gomba disszeminációja jelentős különbséget mutat a már említett oltási módszerek között. Az egerek emésztőszervrendszeri fertőzése a *C. albicans* sejtek gyors terjedését eredményezte a bélből a májba, azonban más szerveket, például a vesét és a lépét, nem érintett a fertőzés (Pope és mtsi., 1979; Domer 1988). A peritoneális injekció következtében a fertőzés elsősorban a lép kolonizáltságát okozta, amit az oltás módja válthatott ki (Tsai és mtsi., 2011). A kifejlett egereknél a szisztémás candidiasis modellezésének egyik leggyakrabban alkalmazott módszere a farok oldalsó vénáján keresztül történő intravénás fertőzés, mivel erre a injektálási módra azonban nincs lehetőség az újszülött egerek kis testmérete miatt, ezért kidolgoztunk egy intravénás újszülött egér modellt a *C. parapsilosis* virulenciájának vizsgálatára.

6.2.1. Az intravénás fertőzéshez kidolgozott újszülött egér modell bemutatása

Munkánk során 2 napos BALB/c egereket használtunk. Az injektáláshoz egy olyan módszert alkalmaztunk, amit eredetileg hemopoetikus sejtek adoptív transzferére fejlesztettek ki (Billingham és Silvers 1961). A 17. ábra mutatja az intravénás fertőzés folyamatát. A megvilágítása során láthatóvá vált az egér fejének vaszkuláris felépítése és az oltást az állat oldalsó feji vénáján keresztül kiviteleztük. A fertőzést a *C. parapsilosis* CLIB 214 jelű, vad típusú izolátummal végeztük, és kísérleteinkhez két dózist (1×10^7 és 2×10^7 sejt $20 \mu\text{l}$ végtérfogatban) is alkalmaztunk.

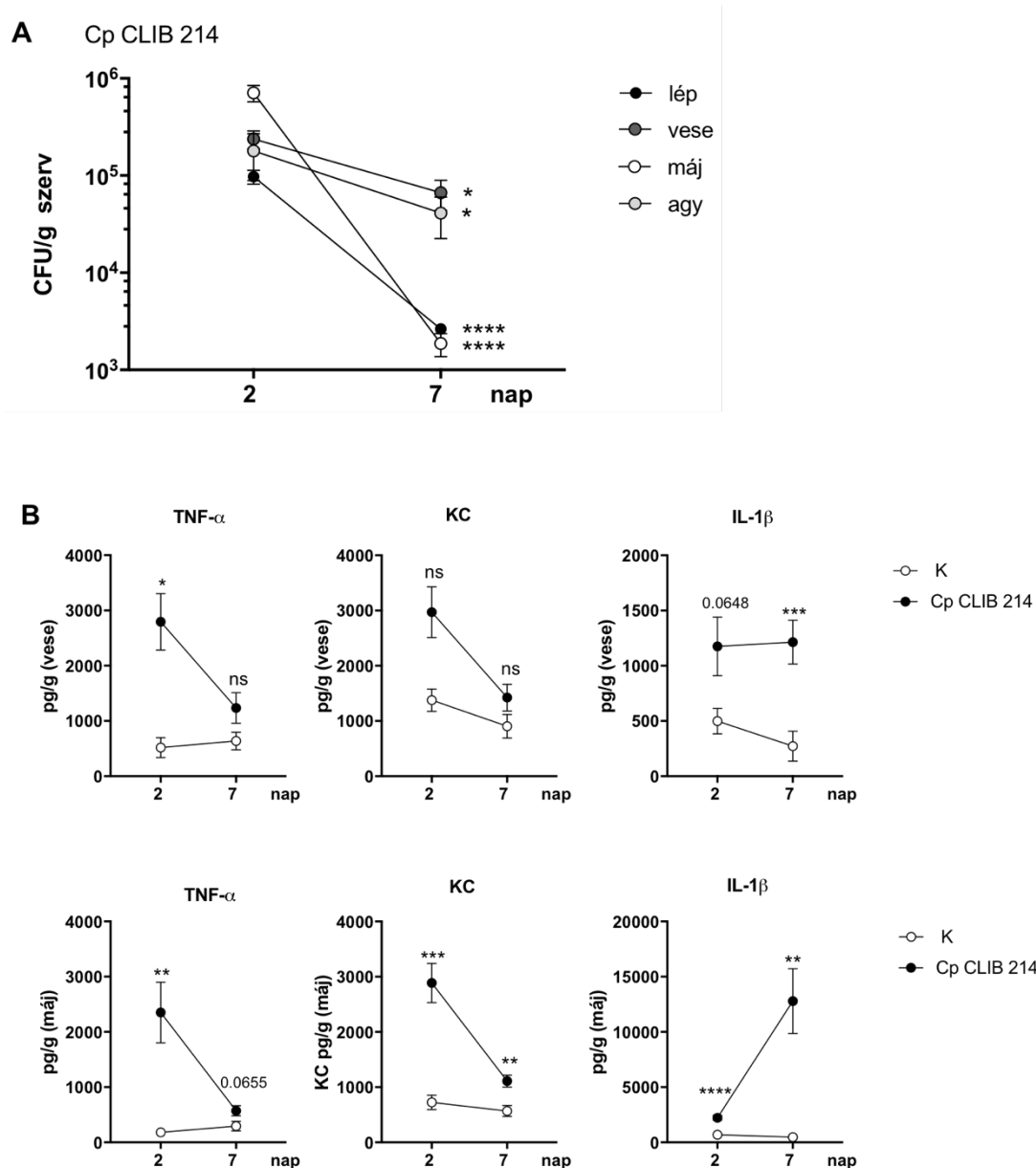


17. ábra. A 2 napos egér intravénás fertőzésének módja. A megvilágítás során látható a feji véna (1. kép, fekete nyíl). A *Candida* szuszpenzió injektálása látható a 2. és 3. képen, illetve ahogyan kitisztul a véna a vértől (4. kép, fehér nyíl). A sikeres injektálás után a vér visszatér a vaszkuláris térbe (5. és 6. kép).

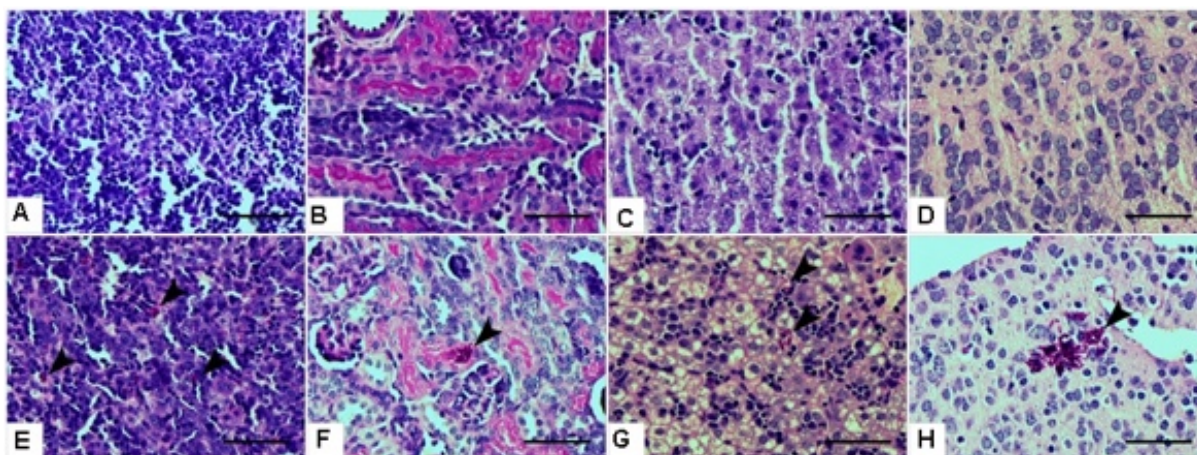
A fertőzés folyamatának monitorozása érdekében, vizsgáltuk a szervek kolonizáltságát 2 és 7 nappal az injektálást követően. Az oltást követő 2. napon nagyobb számú CFU volt tapasztalható a májban a többi szervhez képest, ami mutatja, hogy a fertőzés módja nem eredményezett több CFU-t az agyban, amit a feji vénán keresztül történt injektálás válthatott volna ki (18.A. ábra). A szervek hisztopatológiai elemzése alapján detektálhatóak voltak az élesztő sejtek, ami szintén utal a *C. parapsilosis* fertőzés homogén terjedésére (19. ábra).

A 2 és 7 napos kísérletek adatait összehasonlítva, csökkenő tendenciát figyeltünk meg a szervekből visszanyert telepszámokban. Kisebb számú CFU volt detektálható az agyban és vesében, illetve a lépben és májban figyeltünk meg nagyobb mértékű telepszám csökkenést (18.A. ábra).

Szintén megfigyeltük a *C. parapsilosis* stimulus hatására kialakuló citokin választ az egerek vese és máj homogenizátumából enzim-kötött immunoszorbens próba (ELISA) segítségével. Megállapítottuk, hogy a szisztémás *C. parapsilosis* fertőzés gyulladásos citokinek ($\text{TNF}\alpha$, IL-1 β és KC kemokin) termelődését indukálta, ugyanakkor nem detektáltunk szignifikáns IL-10 szekréciót a szervhomogenizátumokban. A kontrollhoz (PBS-sel injektált állat) képest emelkedett $\text{TNF}\alpha$ koncentrációt mértünk a *C. parapsilosis* fertőzött egerek vese és máj mintáiban (az injektálást követő 2. napon), azonban ezen citokin szintje csökkent 7 nappal a fertőzést követően. A máj KC kemokin szintjének esetében a $\text{TNF}\alpha$ -hoz hasonló tendenciát figyeltünk meg. A kinetika alapján a vizsgált időpontok között növekszik a *C. parapsilosis* indukált IL-1 β citokin szint, ami szignifikáns eltérést mutat a kontrollhoz viszonyítva (18.B. ábra).



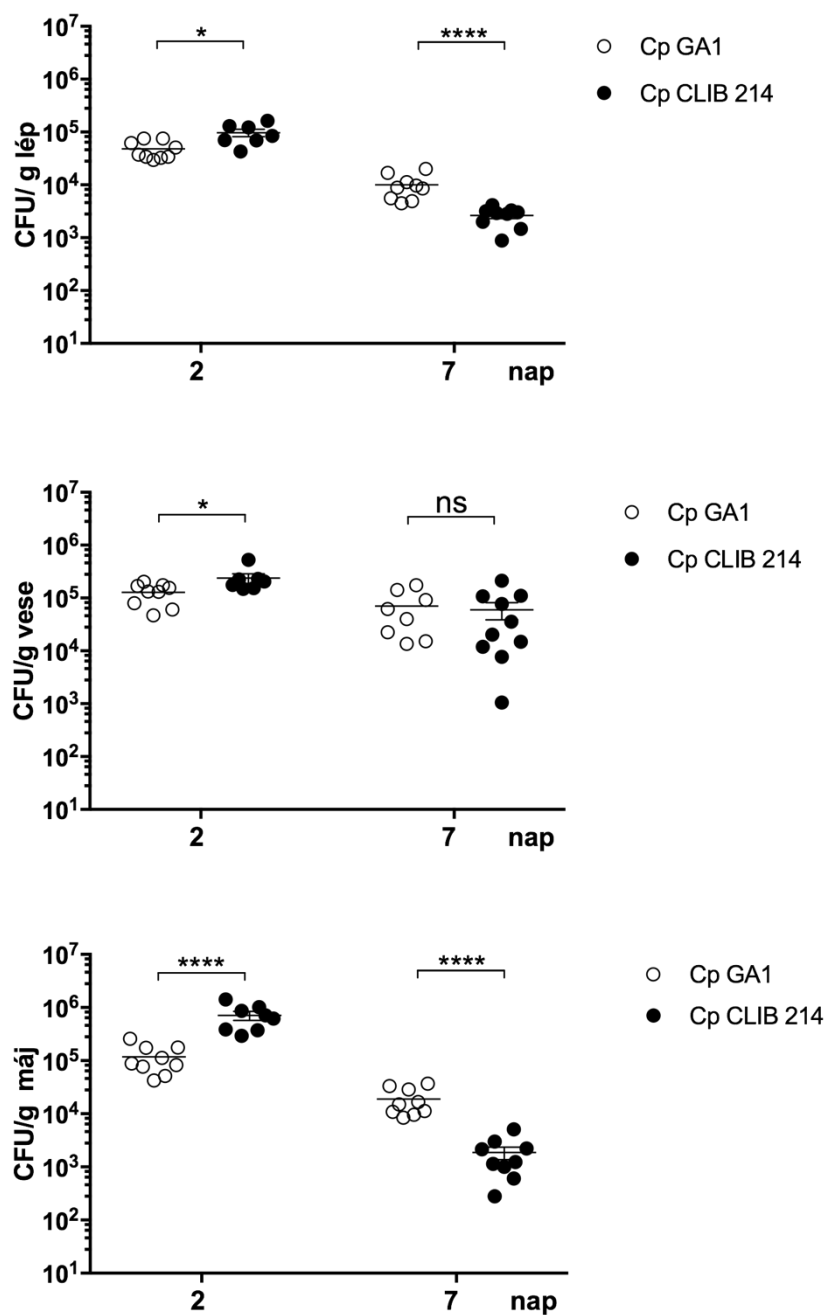
18. ábra. A. Az újszülött BALB/c egerek lép, vese, máj és agyi CFU adatai 2 és 7 nappal az intravénás *C. parapsilosis* CLIB 214 fertőzést követően. Egy kísérlet során legalább 4 egér/csoport fertőzését végeztük 20 μ l 1×10^7 sejtszuszpenzióval. Az eredmények 2 független kísérlet összesített eredményeit mutatják. Feltüntetett adatok: átlag \pm standard hiba (Mann-Whitney teszt). **B.** Citokin adatok a vese és máj homogenizátumokból. Fertőzés dózisa: 1×10^7 sejt/20 μ l. Feltüntetett adatok: K, PBS kontroll, Cp CLIB 214, *C. parapsilosis* CLIB 214; átlag \pm standard hiba. Szignifikancia mértéke: **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,0002$; ** $p < 0,0021$; * $p < 0,0332$; ns, nem szignifikáns (Párosítatlan t-teszt).



19. ábra. A 2 napos egerek szerveinek hisztopatológiai elemzése PAS-festést követően. A hisztopatológiai elemzések 2 nappal az injektálás után készültek. A felső sorban látható képek a kontroll egér szerveit mutatják: lép (A), vese (B), máj (C), agy (D). Az alsó sorban a (2×10^7 sejt/20 μ l) *C. parapsilosis* CLIB 214 törzsszel fertőzött egér szervei: lép (E), vese (F), máj (G), agy (H). A fekete nyilak jelölik a gombasejteket. A szervekben nem tapasztaltunk léziót. Az 1×10^7 sejt/20 μ l dózissal történt fertőzés során nem detektáltunk gomba sejteket a szervekben. Méretskála: 100 μ m.

6.2.2. Az újszülött egér modell alkalmazhatósága a *C. parapsilosis* törzsek virulencia különbségeinek kimutatására

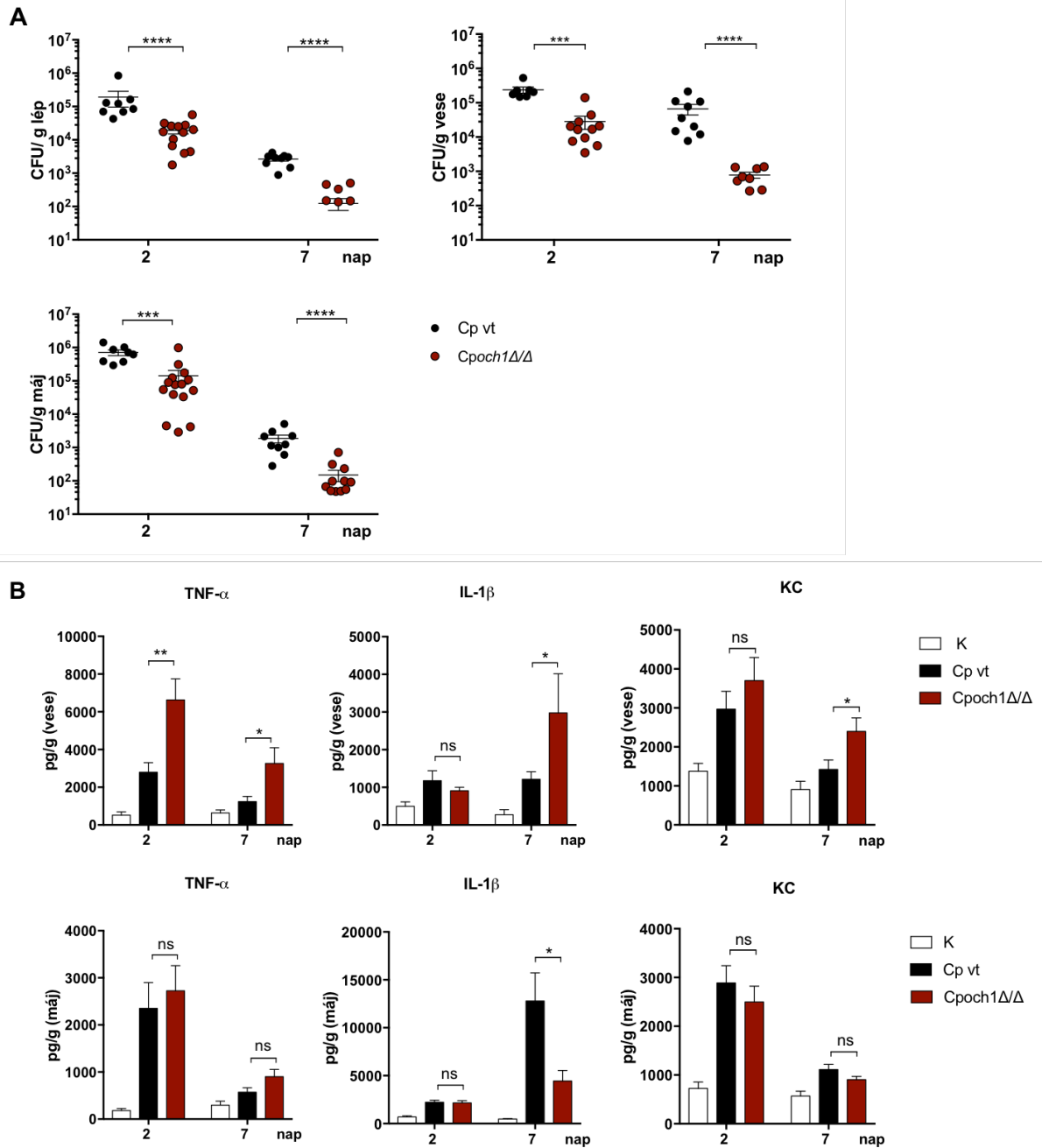
Csoportunk korábbi *in vitro* kísérletei kimutatták, hogy eltérések figyelhetők meg a *C. parapsilosis* két izolátuma, a *C. parapsilosis* CLIB 214 (*Cp* CLIB 214) és a GA1 (*Cp* GA1) által kiváltott makrofág migrációban és a két törzs bekebelezésében (Toth és mtsi., 2015). Munkánk során megfigyeltük az újszülött egerek érzékenységét a két törzsszel történt fertőzés során. Összehasonlítva a szervek kolonizáltságát, 2 nappal a fertőzést követően szignifikánsan több *Cp* CLIB 214 CFU-t detektáltunk a lépben, a vesében és a májban, mint a *Cp* GA1 törzs esetében. Megfigyeltük azonban, hogy a *Cp* CLIB 214 törzset a gazda szervezet hatékonyabban eliminálja: a szervekből visszanyerhető *Cp* CLIB 214 telepszámok alacsonyabbak a *Cp* GA1-hez viszonyítva a 7 napos kísérleteknél (20. ábra). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az újszülött egerek intravénás fertőzésének módja alkalmas a *Candida* törzsek virulencia különbségeinek monitorozására.



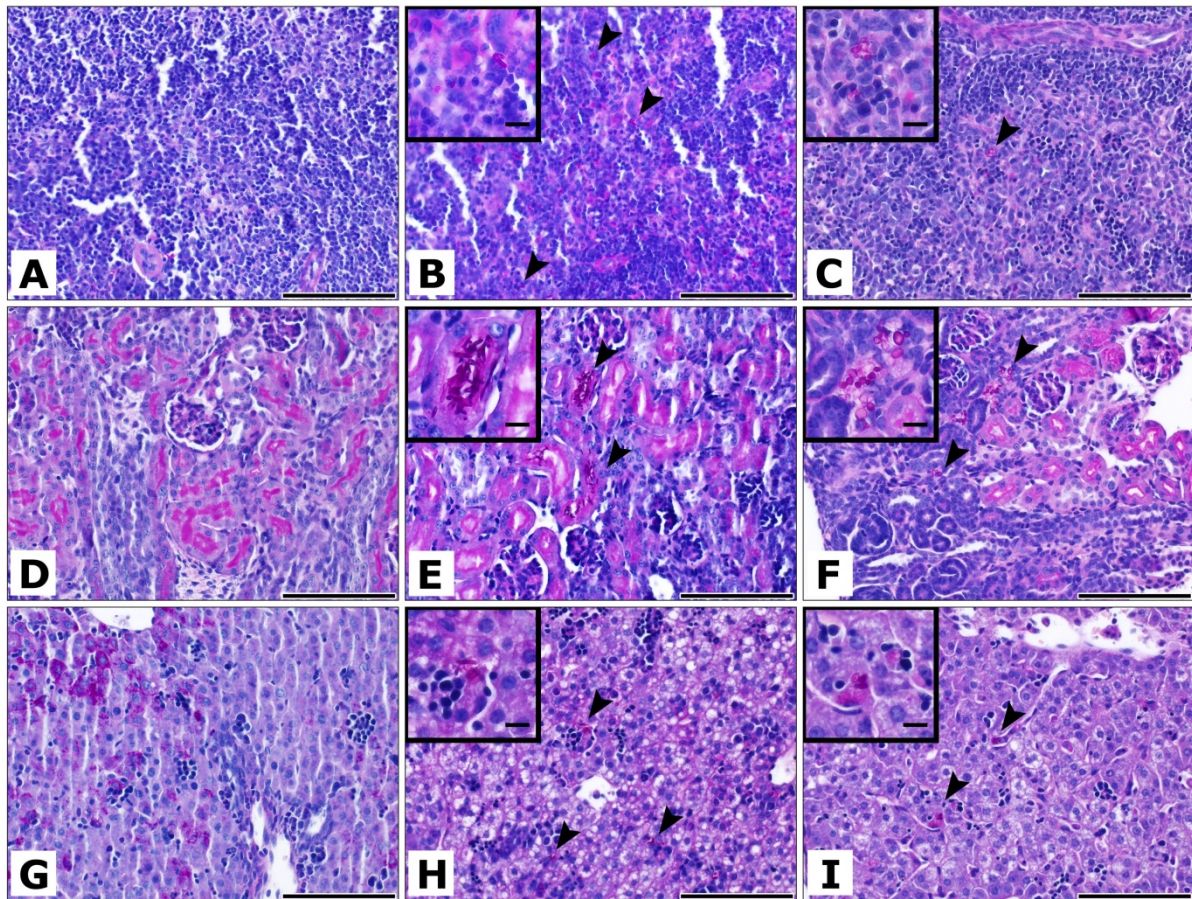
20. ábra. Az újszülött egerek érzékenységének összehasonlítása a *Cp* CLIB 214 és a *Cp* GA1 fertőzőre. Fertőzés dózisa: 1×10^7 sejt/20 μ l. Feltüntetett adatok: átlag \pm standard hiba. Szignifikancia mértéke: **** $p < 0,0001$; * $p < 0,0332$; ns, nem szignifikáns (Mann-Whitney teszt).

6.2.3. A *C. parapsilosis* sejtfal N-mannoziláció szerepének vizsgálata az újszülött egér modellben

Újszülött egér modellben is elvégeztük a vad típusú *C. parapsilosis* (*Cp* vt = *Cp* CLIB 214) és a csökkent virulenciájú, sejtfal mutáns *Cpoch1Δ/Δ* törzs által kiváltott érzékenység összehasonlítását. Kettő és hét nappal a fertőzést követően egyaránt szignifikánsan alacsonyabb számú CFU-t detektáltunk a *Cpoch1Δ/Δ* fertőzött egerek lépében, veséjében és májában a *Cp* vt-hez viszonyítva (21.A. ábra). A gyulladásos citokinek szekréciójának vizsgálatakor eltéréseket tapasztaltunk a vese és a máj homogenizátumokból mért citokinek koncentrációjában. Azt tapasztaltuk, hogy 7 nappal a fertőzést követően az egerek veséjében a *Cpoch1Δ/Δ* szignifikánsan nagyobb TNF α , IL-1 β citokin és KC kemokin termelődést indukált a *Cp* vt-hez képest. Azonban a máj homogenizátumból származó adataink alapján nem detektáltunk eltérést TNF α és KC szekrécióban. Mindemellett megfigyeltük, hogy a veséből származó adatokkal ellentétben, 7 nappal a fertőzés után a májban mért IL-1 β szint szignifikánsan alacsonyabb a *Cpoch1Δ/Δ* stimulus hatására, mint a *Cp* vt esetében (21.B. ábra). A fertőzött egerek szerveinek hisztopatológiai elemzése során detektáltuk a *Cp* vt és a *Cpoch1Δ/Δ* törzs sejtjeit a szervekben, azonban a gomba jelenléte nem okozott látható szöveti eltérést a kontroll egérhez viszonyítva (22. ábra).



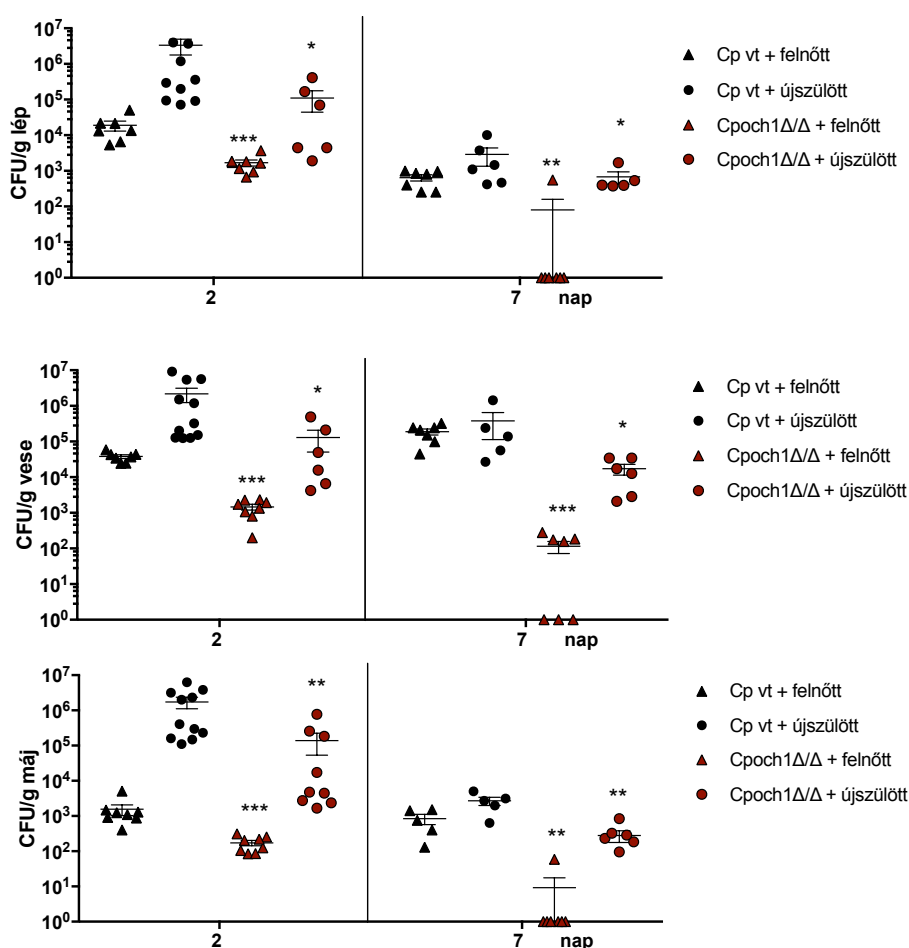
21. ábra. A. Az újszülött BALB/c egerek lép, vese és máj CFU adatai 2 és 7 nappal az intravénás *C. parapsilosis* CLIB 214 (*Cp vt*) és *Cpoch1Δ/Δ* fertőzést követően. Egy kísérlet során legalább 4 egér/csoport fertőzését végeztük 20 μ l végtérfogatú 1×10^7 sejtet tartalmazó szuszpenzióval. Az eredmények 2 független kísérlet eredményeit foglalják össze. **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,0002$ (Mann-Whitney teszt). **B.** Citokin adatok a vese és máj homogenizátumokból az 1×10^7 sejt/20 μ l szuszpenzióval történt fertőzést követően. Feltüntetett adatok: K, PBS kontroll csoport; *Cp vt*, *C. parapsilosis* CLIB 214; *Cpoch1Δ/Δ*, *C. parapsilosis och1Δ/Δ*; átlag \pm standard hiba. Szignifikancia mértéke: ** $p < 0,0021$; * $p < 0,0332$; ns, nem szignifikáns (Párosítatlan t-teszt).



22. ábra A 2 napos egerek szerveinek hisztopatológiai elemzése PAS-festést követően. A hisztopatológiai elemzések 2 nappal az injekálás után készültek. A kontroll egér szervei (PBS-el történt injekálás): lép (A), vese (D), máj (G). A $20\ \mu\text{l}\ 2 \times 10^7$ sejtet tartalmazó *Cp vt* szuszpenzióval fertőzött egér szervei: lép (B), vese (E), máj (H). A *Cpoch1Δ/Δ* fertőzött egerek szervei: lép (C), vese (F), máj (I). A fekete nyilak jelölik a gomba sejteket. A szervekben nem tapasztaltunk léziót. Méretskála: $100\ \mu\text{m}$.

6.2.4. Az újszülött és kifejlett egerek gombafertőzésre mutatott érzékenységének összehasonlítása

Kísérleteink során elvégeztük a BALB/c újszülött és felnőtt egerek *Cp* vt és *Cpoch1Δ/Δ* fertőzésre mutatott érzékenységének összehasonlítását. Adataink alapján szignifikánsan csökkent CFU volt detektálható a *Cpoch1Δ/Δ* fertőzött felnőtt és újszülött egerek lépében, veséjében és májában a *Cp* vt-vel fertőzött egér csoportokhoz viszonyítva. Azt tapasztaltuk, hogy a kifejlett egerekhez képest az újszülött egerek szerveiben még detektálható a *Cpoch1Δ/Δ* 7 nappal a fertőzést követően (23. ábra).



23. ábra. A felnőtt és újszülött BALB/c egerek érzékenysége a *Cp* vt és a *Cpoch1Δ/Δ* fertőzést követően. Fertőzés dózisa: 2×10⁷ sejt/20 μl (újszülött egér) és 2×10⁷ sejt/100 μl (felnőtt egér). Az adatok 2 független kísérlet összesített eredményei. Feltüntetett adatok: átlag ± standard hiba. Szignifikancia mértéke: *** p<0,0002; ** p<0,0021; * p<0,0332 ns, nem szignifikáns összehasonlítva a *Cpoch1Δ/Δ* törzzsel fertőzött egércsoport esetében mért CFU-t az annak megfelelő felnőtt vagy újszülött egerek *Cp* vt fertőzött csoportjával (Mann-Whitney teszt).

6.2.5. A *C. parapsilosis* fertőzés jellemzése újszülött egér modellben - értékelés

Az egerek intravénás fertőzésének módja gyakran alkalmazott és reprodukálható modell a *Candida* törzsek virulenciájának meghatározására (Arendrup és mtsi., 2002). Mivel a *Candida* fertőzés komoly egészségügyi problémát jelent az újszülöttek körében, munkánk során egy alternatív modellt építettünk ki a kórokozók patogenitását célzó *in vivo* vizsgálatokhoz. Eredményeink első részében bemutattuk, hogy a feji vénába történő injekció alkalmas módszer a szisztémás *Candida* fertőzés kiváltására újszülött egerekben. Az egerek szerveiben a gombasejtek egyenletes elterjedését figyeltük meg a CFU meghatározás és a hisztopatológiai analízis során. A temporális véna injekciójának módja nem okozott magasabb kolonizáltságot az agyban a többi szervehez képest, ami alátámasztja a modell megbízhatóságát a disszeminált candidiasis jellemzésére az újszülött egerekben.

Mindemellett bemutattuk a modell alkalmazhatóságát a különböző *C. parapsilosis* törzsek patogénitásának elemzésére. Korábban bebizonyosodott, hogy a faj két különböző izolátuma eltérő celluláris választ vált ki *in vitro* körülmények között egér és humán makrofágokban (Toth, R. és mtsi., 2015). Csoportunk kimutatta, hogy a *Cp* CLIB 214 nagyobb arányú makrofág migrációt indukál, mint a *Cp* GA1 törzs, emellett hosszabb inkubációs időt igényel a fagociták számára a *Cp* CLIB 214 sejtek bekebelezése is. Az eltérő sejtes válaszok a sejtfal szerkezetében vagy összetételében mutakozó potenciális különbségekből adódhatnak (Toth, R. és mtsi., 2015). Az *in vivo* vizsgálataink alapján a két izolátum között különbségek adódtak a fertőzőképességben is. A *Cp* GA1-hez képest, a *Cp* CLIB 214 a vizsgált szervek nagyobb kolonizációját eredményezte a fertőzés korai időpontjában, emellett hatékonyabb eliminációt tapasztaltunk a *Cp* CLIB 214 törzs esetében.

Az újszülött egér modellben is kimutattuk, hogy a *C. parapsilosis* sejtfal *N*-mannozilációja befolyásolja a gazda-patogén kölcsönhatást. Adataink szintén támogatják a sejtfal mutációjának hatására bekövetkező virulencia csökkenést, emellett az *in vivo* citokin válasz eltéréseit. A vad típushoz képest emelkedett TNF α , IL-1 β és KC szekréciót tapasztaltunk a *Cpoch1* Δ/Δ -injektált újszülött egerek veséiben, ami korrelál a korábban humán PBMC-ken végzett kísérletekkel, ahol a mutáns fokozott IL-6, IL-10, TNF α és IL-1 β termelődést váltott ki (Perez-Garcia és mtsi., 2016). Ezzel ellenkezőleg a májból mért citokin válasz eltérő eredményekkel szolgált, mivel a sejtfal mutáns alacsonyabb citokin szekréciót váltott ki a vad típushoz képest. Az irodalomban található példa az eltérő szervekből (lép és vese) mérhető citokin koncentráció különbségeiről (Castillo és mtsi., 2011).

Így a vese és a máj között említett különbségek ellenére, a *Cpoch1Δ/Δ* által stimulált citokin adatok korrelálnak a jelentősen csökkent gombaszámmal. Habár ezek az eredmények felvetik a kérdést, hogy az újszülött és kifejlett egerek között található-e eltérés a *C. parapsilosis* fertőzés által kiváltott citokin termelés indukciójában és az immunsejtek infiltrációjának hatékonyságában.

Munkánk során elvégeztük az újszülött és kifejlett állatok érzékenységének összehasonlítását a *C. parapsilosis* törzsekkel történt fertőzést követően. Azt tapasztaltuk, hogy a kifejlett állatokhoz képest az újszülött egerek nem voltak képesek teljesen eliminálni a *Cpoch1Δ/Δ* sejteket a szervekből 7 nappal a fertőzést követően, ami arra utal, hogy habár a *Cpoch1Δ/Δ* csökkent virulenciával rendelkezik mindkét modellben, az újszülött egerek érzékenyebbek a fertőzésre a kifejlett állatokhoz képest, emellett korábban már bizonyították, hogy az újszülött patkányok intravénás, intraperitoneális, valamint emésztőszervrendszerbe történő *C. parapsilosis* injektálását követően, a *C. parapsilosis* lipáz hiányos törzs esetében alacsonyabbnak bizonyult a gombák szerveket kolonizáló képessége a vad típusú törzzsel szemben (Trofa és mtsi., 2011), így jelenlegi eredményeink alátámasztják, hogy az újszülött egerek intravénás fertőzésének módja lehetővé teszi a közvetlen összehasonlítást a már jól alkalmazott *in vivo* szisztémás candidiasis modellekkel, ezáltal alapot szolgáltat a felnőtt és újszülött immunválasz összehasonlítására jövőbeni kutatások során.

6.3. A szisztémás *C. parapsilosis* fertőzés *in vivo* jellemzése felnőtt egér modellben

Munkánk során fontosnak tartottuk a szisztémás *C. parapsilosis* fertőzés részletes jellemzését felnőtt egér modellben is. Mivel kimutattuk, hogy a sejtfal integritása fontos szerepet tölt be a kórokozó patogenitásában, az *in vivo* karakterizálást egyidejűleg a *Cpoch1Δ/Δ* által kiváltott immunválasz leírásával végeztük el. A vad típusú és a sejtfal mutáns *C. parapsilosis* fertőzés során vizsgáltuk az egerek érzékenységét azáltal, hogy összehasonlítottuk a szervek kolonizáltságát, megfigyeltük a szervekbe történő immunsejt infiltrációt és kiviteleztük a vese homogenizátumokból az *in vivo* citokin profil jellemzését is. Ehhez 12-15 hetes C57BL/6 vad típusú (vt) egeret 100 μl 2×10^7 *C. parapsilosis* CLIB 214 (*Cp* vt) és *Cpoch1Δ/Δ* gombasejttel fertőztünk és az immunválasz kinetikájának megfigyeléséhez a fertőzést követően 1, 3 és 7 nappal hajtottuk végre kísérleteinket.

6.3.1. A vad típusú és a sejtfal mutáns *C. parapsilosis* fertőzés jellemzése

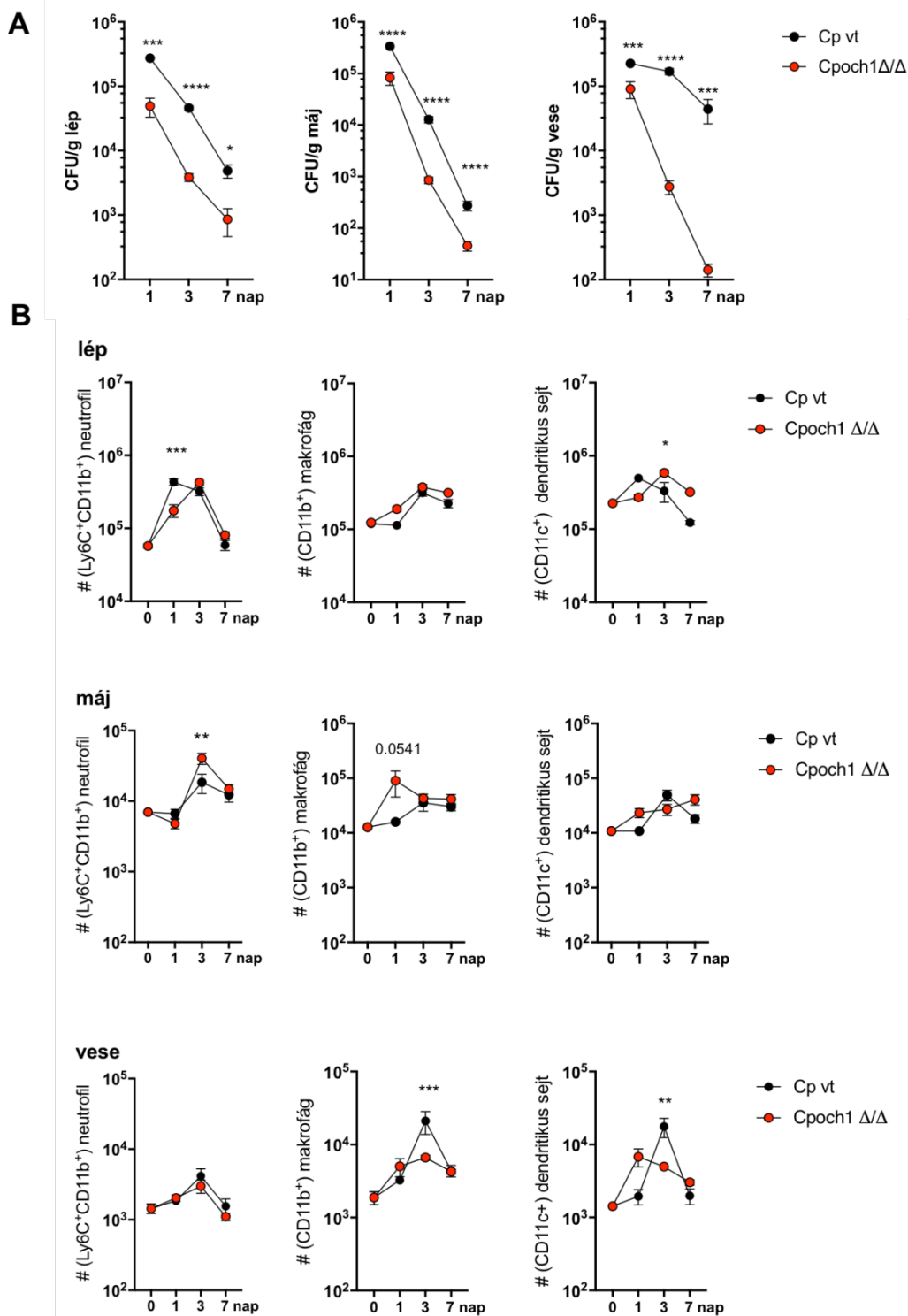
Összehasonlítva a vad típusú és a sejtfal mutáns törzzsel történt fertőzést azt tapasztaltuk, hogy az egerek hatékonyabban ellenállnak a *Cpoch1Δ/Δ* fertőzésnek, ugyanis szignifikánsan kevesebb *Cpoch1Δ/Δ* CFU-t detektáltunk a lépben, a májban és a vesében a *Cp* vt injektált csoporthoz képest (24.A. ábra). Az egerek érzékenységének vizsgálatát elvégeztük a *C. parapsilosis och1Δ+OCH1* reintegrált törzzsel is, amely eredmények a Mellékletek 11.2. pontjában találhatóak.

Munkánk során áramlási citometriával elemeztük a *C. parapsilosis* törzsekkel történt fertőzés hatását a neutrofilek, makrofágok és dendritikus sejtek toborzására. A kísérletek során felállított kinetika alapján azt tapasztaltuk, hogy a *Cp* vt indukálta az immunsejtek beáramlását a fertőzött szervekbe, ami a harmadik napon mutatott nagyobb mértékű immunsejt akkumulációt, majd a neutrofilek, makrofágok és dendritikus sejtek száma folyamatosan csökkent az idő előrehaladtával (24.B. ábra).

Méréseink alapján a *Cp* vt-hez viszonyítva a *Cpoch1Δ/Δ* stimulus eltérő módon indukálta a különböző immunsejtek vándorlását a szervekbe. A lép immunsejtjeit megfigyelve alacsonyabb neutrofil felhalmozódást tapasztaltunk a fertőzés első napján. A makrofágok számában nem, a dendritikus sejtek esetében pedig a fertőzés harmadik napján tapasztaltunk nagyobb infiltrációt a *Cp* vt-hez viszonyítva (24.B. ábra/lép).

A májban a fertőzés első napján detektáltunk nagyobb arányban makrofág populációt, emellett a neutrofil granulociták esetében szignifikánsan nagyobb beáramlást a fertőzést követő 3. napon összehasonlítva a *Cp* vt-vel. A dendritikus sejtek akkumulációjában nem találtunk szignifikáns eltérést a két törzs között (24.B. ábra/máj).

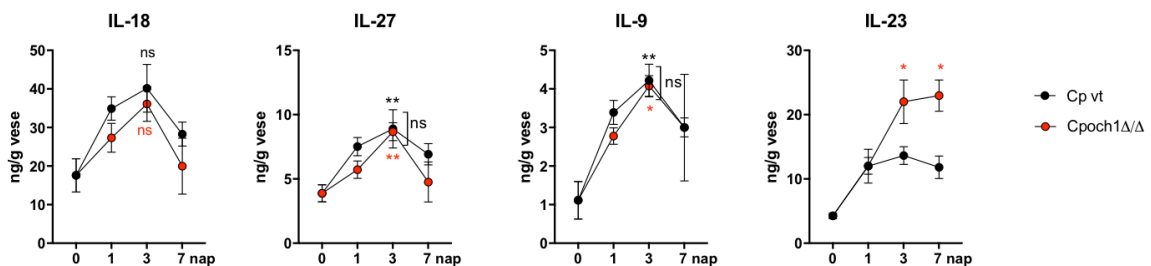
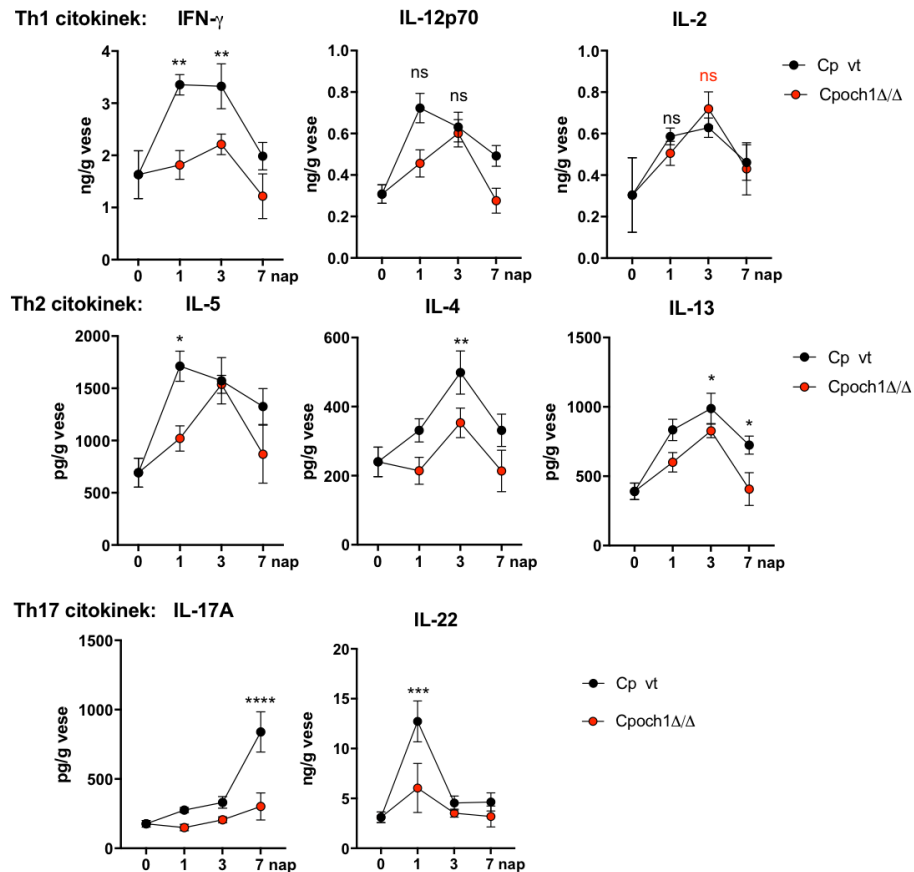
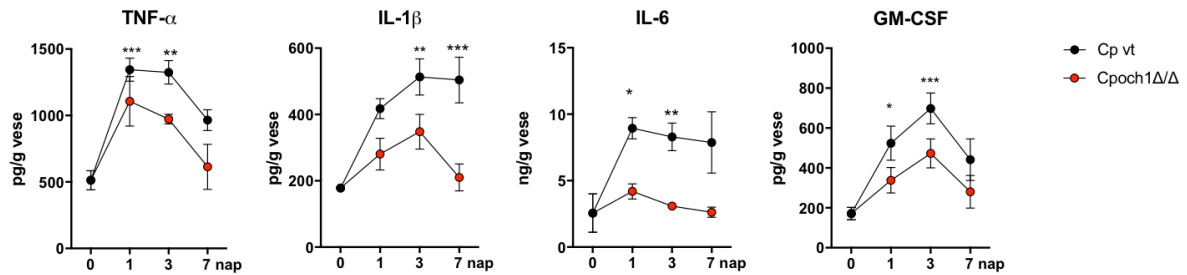
A fertőzést követő első napon nagyobb számú makrofág és dendritikus sejtszámot detektáltunk a *Cpoch1Δ/Δ* fertőzött állatok veséjében, ez az eltérés azonban nem bizonyult szignifikánsnak a *Cp* vt-vel összehasonlítva. Azonban azt tapasztaltuk, hogy a *Cpoch1Δ/Δ* stimulus alacsonyabb makrofág és dendritikus sejt akkumulációt eredményezett a fertőzés utáni 3. és 7. napon összehasonlítva a *Cp* vt által indukált immunsejt kompozícióval (24.B. ábra/vese).



24. A. ábra. A C57BL/6 vad típusú egerek szervkolonizáltságának összehasonlítása. Fertőzés dózisa: 2×10^7 sejt/100 μ l (n=15/csoport). Az ábra 2 független kísérlet eredményeit foglalja össze. Szignifikancia mértéke: **** p<0,0001; *** p<0,0002; * p<0,0332 (Mann-Whitney teszt). **B. ábra. Az immunsejtek infiltrációjának kinetikája.** Feltüntetett adatok: átlag \pm standard hiba, 0. nap a kontroll, 1., 3. és 7. nap a fertőzött egerekből származó adatok. Szignifikancia mértéke: *** p<0,0002; ** p<0,0021; * p<0,0332 (2-ágú ANOVA-Sidak teszt).

A makrofágok és a dendritikus sejtek mintázatfelismerő receptorainak aktivációja a patogének felismerését követően gyors citokin szintézist és szekréciót indukál, ezért kísérleteink során vizsgáltuk a *C. parapsilosis* és a sejtfal mutáns törzs által indukált humorális immunválaszt. Mivel a legnagyobb arányban a vesében detektáltunk eltérést a CFU számban a citokin profil felállítását a vese homogenizátumából kiviteleztük.

A Multiplex ELISA eredmények alapján a kontroll egér csoporthoz viszonyítva (0 nap) a *Cp* vt fertőzés indukálta a $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , IL-6 gyulladásos citokinek és a GM-CSF kemokin mennyiségét (25. ábra). Emellett a kontrollhoz viszonyítva szignifikáns citokin szekréciót tapasztaltunk a Th1 típusú IFN γ , a Th2 típusú IL-5, IL-4, IL-13, a Th17 típusú IL-17A, IL-22, továbbá az IL-27 és az IL-9 citokin esetében. A *Cp* vt által kiváltott IL-12p70, IL-2 (Th1 típusú), IL-18 és IL-23 citokin indukció nem bizonyult szignifikáns eltérésnek a kontrollhoz képest. Megfigyeltük, hogy a humorális válasz indukciója korrelál a CFU és az immunsejt infiltráció esetében tapasztalt kinetikával, ugyanis a citokinek szekréciója a fertőzés 1. és 3. napján bizonyult intenzívebbnek, majd a fertőzés 7. napján a termelődésében csökkenést tapasztaltunk. Azonban a *Cp* vt által indukált IL-17A szint szignifikánsnak bizonyult a kontrollhoz képest a fertőzést követően 7 nappal (25. ábra). A kontroll csoporthoz viszonyítva a *Cpoch1* Δ/Δ fertőzés nem váltott ki szignifikáns $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , IL-6, GM-CSF, IFN γ , IL-12p70, IL-2, IL-5, IL-4, IL-13, IL-17A, IL-22, IL-18 szekréciót, azonban szignifikáns indukciót az IL-27, IL-9 és IL-23 citokinek esetében tapasztaltunk (25. ábra).



25. ábra. Az *in vivo* citokin termelődés összehasonlítása a *Cp vt* és a *Cpoch1Δ/Δ* fertőzött egerek vese homogenizátumából (n=8/csoport). Az ábra 2 független kísérlet eredményeit foglalja össze. Feltüntetett adatok: átlag ± standard hiba, 0. nap: kontroll, 1., 3. és 7. nap a fertőzött egerekből származó adatok. Szignifikancia mértéke: *** p<0,0002; ** p<0,0021; * p<0,0332, ns, nem szignifikáns (fekete csillaggal jelölt a *Cp vt* által indukált szignifikáns citokin termelődés, piros csillaggal jelölt a *Cpoch1Δ/Δ* által indukált szignifikáns citokin termelődés a kontroll csoporthoz viszonyítva (ANOVA-Dunett próba).

6.3.2. A szisztémás *C. parapsilosis* fertőzés *in vivo* jellemzése - értékelés

Munkánk során elvégeztük a *C. parapsilosis* fertőzés jellemzését a C57BL/6 vad típusú felnőtt egér modellben. Megfigyeltük, hogy a *C. parapsilosis* telepszám az idő előrehaladtával folyamatosan csökken a lépben, vesében és májban. Kísérleteinkben vizsgáltuk ezen fertőzött szervekbe történő immunsejtek áramlását és azt tapasztaltuk, hogy a neutrofilek, a makrofágok és a dendritikus sejtek nagyobb számban detektálhatóak a fertőzés 1. és 3. napján, mint a 7. napon. Ezek az adatok korrelálnak a szervekben folyamatosan redukálódó CFU adatokkal is, ami arra utal, hogy a fent említett természetes immunsejtek szerepet játszanak a gomba eliminációjában a gazdaszervezetből.

Az *in vivo* citokin profil alapján azt tapasztaltuk, hogy a TNF α , IL-1 β , IL-6 és GM-CSF termelődése dominál a *C. parapsilosis* fertőzés korai szakaszában (1. és 3. nap), azonban a gyulladásos mediátorok szigorúan szabályozottak az opportunistá patogénnel szemben kialakult válasz során. A *C. parapsilosis* fertőzés korai időpontjaiban (1. és 3. nap) detektáltunk szignifikáns IFN- γ és IL-22 szekréciót, azonban az a tény, hogy a kontrollhoz viszonyítva nincs eltérő IL-12p70 (szerepe van a naív T sejtek Th1 sejtekké differenciálódásának elindításában) és IL-2 citokin termelés arra utal, hogy a fertőzés következtében nem a Th1 válasz dominál (Macatonia és mtsi., 1993). Ezen *C. parapsilosis* által stimulált gyulladásos citokinek a neutrofilek és a makrofágok mozgósítását, ezzel együtt a gombasejtek eliminálását idézhetik elő, ugyanis az IFN- γ részt vesz a fent említett immunsejt populációk aktiválásában és a protektív immunválasz kialakításában *Candida* fertőzések során (Lin, L. és mtsi., 2009). Mindemellett eredményeink azt mutatják, hogy a *C. parapsilosis* a fertőzést követően 7 nappal indukált a kontrollhoz viszonyítva szignifikáns IL-17A (~1000 pg/g) termelődést. Intravénás *C. albicans* fertőzés esetében leírták az intenzív és a fertőzés időpontjaiban folyamatosan emelkedett IL-17A szekréciót (2500 pg/ml) (Huang és mtsi., 2004). Így az *in vivo* citokin termelődés elemzése során nyert adataink megerősítik a csoportunk *in vitro* kísérletei során megfigyelt eredményeket, ahol a *C. parapsilosis*szal stimulált humán mononukleáris sejtek szignifikánsan alacsonyabb IL-17-et termeltek a *C. albicans* fertőzött sejtekhez képest (Toth, A. és mtsi., 2013). Egy korábban megjelent tanulmány szintén vizsgálta, hogy a *C. parapsilosis* komplex tagjai az IFN- γ , IL-17A, TNF α és IL-22 gyulladásos citokinek közül, melyek szekrécióját stimulálják, azonban a kontrollhoz viszonyított erős expressziót csak a TNF α és IL-22 szintjében találtak (Trevino-Rangel Rde és mtsi., 2015). Ez utóbbi tanulmány és csoportunk eredményei közötti eltérés a különböző

izolátumok használatán alapulhat. Adataink szerint a *C. parapsilosis* az intravénás injektálás 3. napjától váltotta ki az IL-4, IL-13 Th2 típusú és az IL-27, IL-9 gyulladáscsökkentő citokinek termelődését. Ezek az adatok szintén megegyeznek a folyamatosan csökkenő CFU adatokkal és arra utalnak, hogy a *C. albicans*szal ellentétben a *C. parapsilosis*, mint stimulus a tolerogén típusú immunválasz kialakulásához vezet *in vivo* körülmények között. Mindemellett kutatócsoportunk célul tűzte ki az adaptív immunrendszer sejtjeinek, ezen belül a regulátoros T-sejtek szerepének tisztázását a *C. parapsilosis* fertőzés szabályozásában. Ezek a kísérletek jelenleg is folyamatban vannak laboratóriumunkban.

A szisztémás *Cpoch1Δ/Δ* törzzsel történt fertőzés során tapasztalt csökkent szerv kolonizáció és az összességében alacsonyabb humorális válasz megerősíti, hogy a sejtfal *N*-mannozilációjának hiányában a *C. parapsilosis* csökkent virulenciával rendelkezik. Habár detektáltunk eltérést a két törzs által indukált immunsejtek számában (a *Cp* vt-hez viszonyítva a *Cpoch1Δ/Δ* fertőzés a lépben szignifikánsan magasabb dendritikus sejt, májban szignifikánsan magasabb neutrofil akkumuláció a fertőzést követő 3. nap, illetve a vese és a máj esetében figyeltünk meg emelkedett számú makrofág és dendritikus sejt populációt a fertőzés után 1 nappal, azonban ezek nem bizonyultak szignifikáns eltérésnek) nem tudtunk specifikus immunsejt típust kijelölni, ami egyértelműen felelős lenne a *Cpoch1Δ/Δ* sejtek hatékony eliminálásáért a szervekből. Erre magyarázatul az szolgálhat egyrésről, hogy az intravénás *C. albicans* fertőzés esetében is kimutatták a szerv specifikus celluláris immunválaszt, ami alapján a vesében későbbi időpontokban figyelhető meg neutrofil beáramlás a léphez és a májhoz képest, emellett a nem fertőzött egerek lépében és májában detektálható leukocita populációk nagyobb arányban tartalmaznak rezidens makrofágokat és dendritikus sejteket a veséhez viszonyítva (Lionakis és mtsi., 2011). Kutatók más csoportjai megfigyelték, hogy a *C. albicans och1Δ/Δ* törzs *in vivo* körülmények között csökkent TNF α és IL-6 termelődést váltott ki a referencia törzshöz képest (Netea és mtsi., 2006), emellett a *C. albicans* sejtfal mutáns törzsek (*pmr1*, az *N*- és *O*-mannánban, és az *mnt1/2*, *O*-mannán deficiens), amelyek szintén csökkent virulenciával rendelkeznek a fertőzés korai időpontjában (12 óra) indukálnak kemokineket (G-CSF, KC, IL-6, MIP-1 α [Macrophage Inflammatory Protein-1 α] és MIP-2), amely mediátorok előidézhetik a leukociták fertőzés helyére történő áramlását, elősegítve a hatékonyabb patogén eliminációt (Castillo és mtsi., 2011). Másrésről csoportunk egér peritoneális és csontvelői eredetű makrofágokon végzett *in vitro* kísérletei alapján azt tapasztaltuk, hogy ezek a gazdasejtek nagyobb mértékű fagocitózist mutatnak a sejtfal mutáns törzzsel szemben, ezen belül is megfigyeltük, hogy egy

fagocita több *Cpoch1Δ/Δ* sejtet képes bekebelezni a referencia törzshöz viszonyítva. Ezek alapján arra lehet következtetni, hogy a *Cpoch1Δ/Δ* nem minden esetben (szervben) generál *in vivo* nagyobb immunsejt infiltrációt és emellett gyulladásos immunválaszt, ugyanis a rezidens immunsejtek a szövetekben képesek elpusztítani a sejtfa mutáns gomba sejtjeit. A citokinek szekréciójának vizsgálatakor azt tapasztaltuk, hogy a *Cpoch1Δ/Δ* törzssel történt fertőzés a kontrollhoz képest nem generált szignifikáns gyulladásos citokin szekréciót, azonban szignifikáns IL-27, IL-9 és IL-23 termelődést váltott ki. Korábbi *C. albicans*sal végzett tanulmányok leírták, hogy az IL-23 citokin gyulladáscsökkentő hatással bír (Wu, Y. és mtsi., 2006), míg az IL-9 hozzájárul az immuntolerancia kialakulásához a nyálkahártyát érintő candidiasis során (Renga és mtsi., 2018).

Az IL-27 citokint elsősorban antigénprezentáló sejtek termelik, emellett erős T-sejt immunmodulátor, amely mind pro- és gyulladáscsökkentő tulajdonságokkal rendelkezik (Goriely és mtsi., 2008; Stumhofer és Hunter 2008). Az IL-27 indukciót egy korábbi tanulmány is kimutatta *C. parapsilosis* fertőzés során, ahol demonstrálták, hogy a patogén fagocitózisa következtében emelkedik az IL-27 szint TLR7/NOD2 (NOD2 receptor a kitin felismeréssel hozható kapcsolatba) aktiváció függő módon (Patin és mtsi., 2016). Csoportunk adatai alapján a vad típusú és a sejtfa mutáns *C. parapsilosis* is indukálja az IL-27 termelődést, azonban egyértelmű különbséget detektáltunk a két törzs által okozott szervkolonizáltságban. Ez az eredmény nem feltétlen zárja ki a TLR7/NOD2 felismerést, azonban arra utal, hogy a *Cpoch1Δ/Δ* felismerésében és a kiváltott immunválaszban elsődlegesen más receptorok játszanak szerepet.

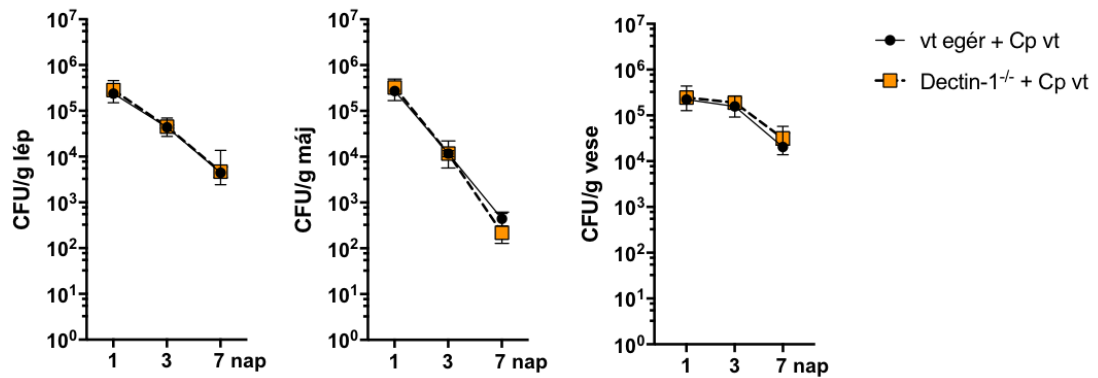
6.4. A Dectin-1 receptor szerepe a szisztémás *C. parapsilosis* fertőzés során

6.4.1. A Dectin-1 receptor szerepe a vad típusú *C. parapsilosis* felismerésében

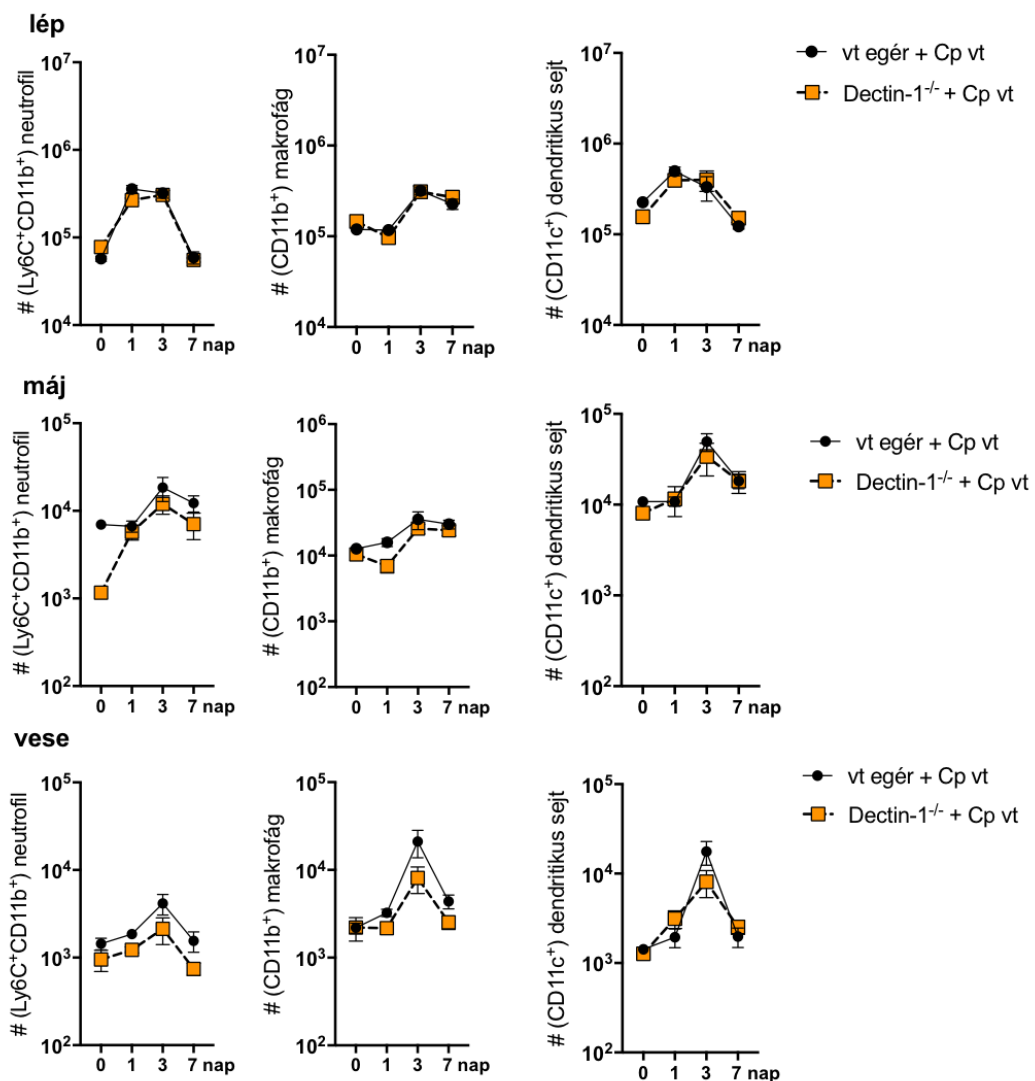
A *Candida* fertőzésekkel foglalkozó tanulmányok kiemelt figyelmet fordítanak a gomba sejtfalban lévő β -glükán és a Dectin-1 receptor interakciójára. Az egereken végzett *in vivo* vizsgálatok kimutatták a Dectin-1 alapvető szerepét szisztémás candidiasis során: a *C. albicans* fertőzés következtében a Dectin-1^{-/-} egerek nem képesek kialakítani a protektív gyulladásos válasz folyamatait és kontrollálni a patogén terjedését a szervezetben, ami végül az egerek mortalitásához vezet (Taylor és mtsi., 2007; Vautier és mtsi., 2012; Marakalala és mtsi., 2013). Eddigi információink korlátozottak a *C. parapsilosis* által indukált immunválaszról, különösen a CLR-ek szerepéről a gomba felismerésében. Ezért kutatásaink során vizsgáltuk a Dectin-1 receptor és a *C. parapsilosis* interakcióját. Ehhez 14-15 hetes C57BL/6 vad típusú (vt) és Dectin-1^{-/-} egeret 100 μ l térfogatú 2×10^7 gombasejttel fertőztünk, majd összehasonlítottuk az egerek érzékenységet és az immunsejtek toborzását.

A lépéből, a májból és a veséből meghatározott gomba telepszám alapján nem találtunk különbséget a vt és a Dectin-1^{-/-} egerek érzékenységeiben a *C. parapsilosis* stimulus hatására (26.A. ábra). Szintén megfigyeltük, hogy a *C. parapsilosis* által kiváltott természetes immunsejtek kompozíciójában nincs különbség a Dectin-1^{-/-} és a vt egerek között (26.B. ábra).

A



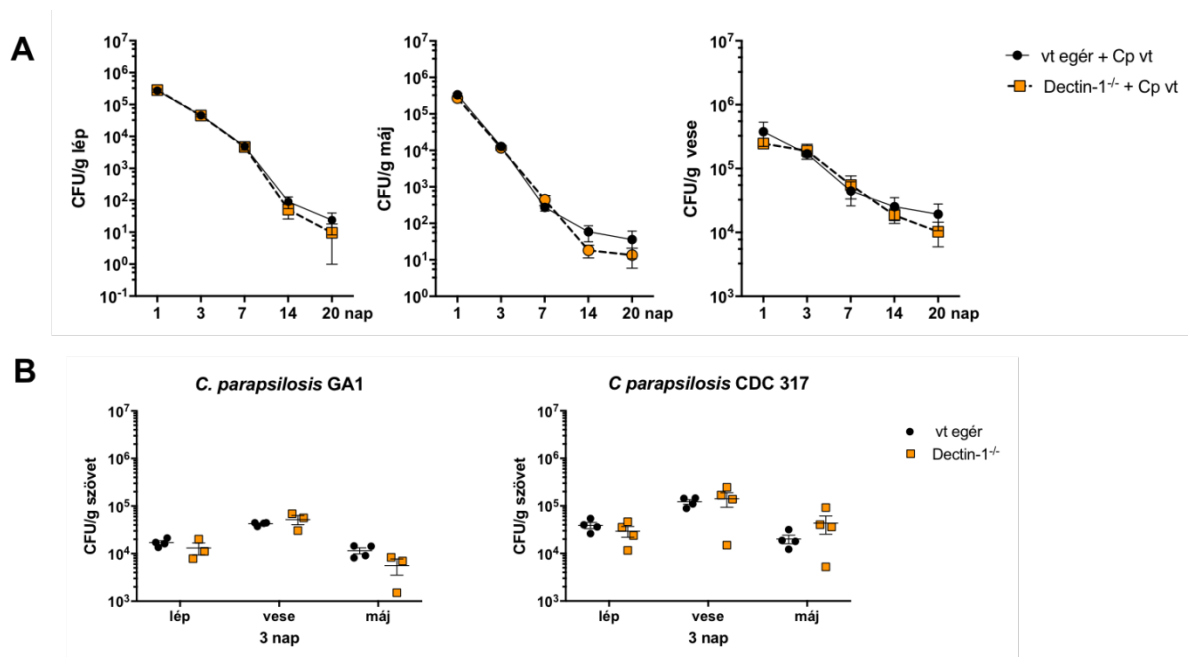
B



26.A. ábra. A vt és a Dectin-1^{-/-} egerek szervkolonizáltságának összehasonlítása a *Cp vt* fertőzés után. Fertőzés dózisa: 2x10⁷ sejt/100 µl (n=10/csoport). Az adatok 2 független kísérlet összesített eredményei. **B. ábra.** A vt és a Dectin-1^{-/-} egerek immunsejt infiltrációjának kinetikája. Feltüntetett adatok: átlag ± standard hiba, 0. nap: PBS kontroll, 1., 3. és 7. nap a fertőzött egerekből származó adatok. *Cp vt*; *C. parapsilosis* CLIB 214.

Ebben a kísérletsorozatban hosszabb inkubációs időket is alkalmaztunk, hogy megfigyeljük hogy a későbbi időpontokban hatással van-e a receptor hiánya a patogén eliminációjára. A 14 és 20 napos inkubációs kísérletek alatt sem detektáltunk eltérést a lép, vese, és máj szövetekből származó *C. parapsilosis* CFU adatokban (27.A. ábra).

Mivel korábbi tanulmányok bizonyították, hogy a *C. albicans* esetében a Dectin-1 által szabályozott protektív immunválasz törzsfüggő, ezért elvégeztük a receptor deficiens egerek injektálását két másik vad típusú *C. parapsilosis* izolátummal (*C. parapsilosis* GA1 és *C. parapsilosis* CDC 317). A szervekből izolált telepszámok alapján nem találtunk különbséget a vt és a Dectin-1^{-/-} állatok érzékenységében a *C. parapsilosis* törzsekkel történt fertőzést követően (27.B. ábra).



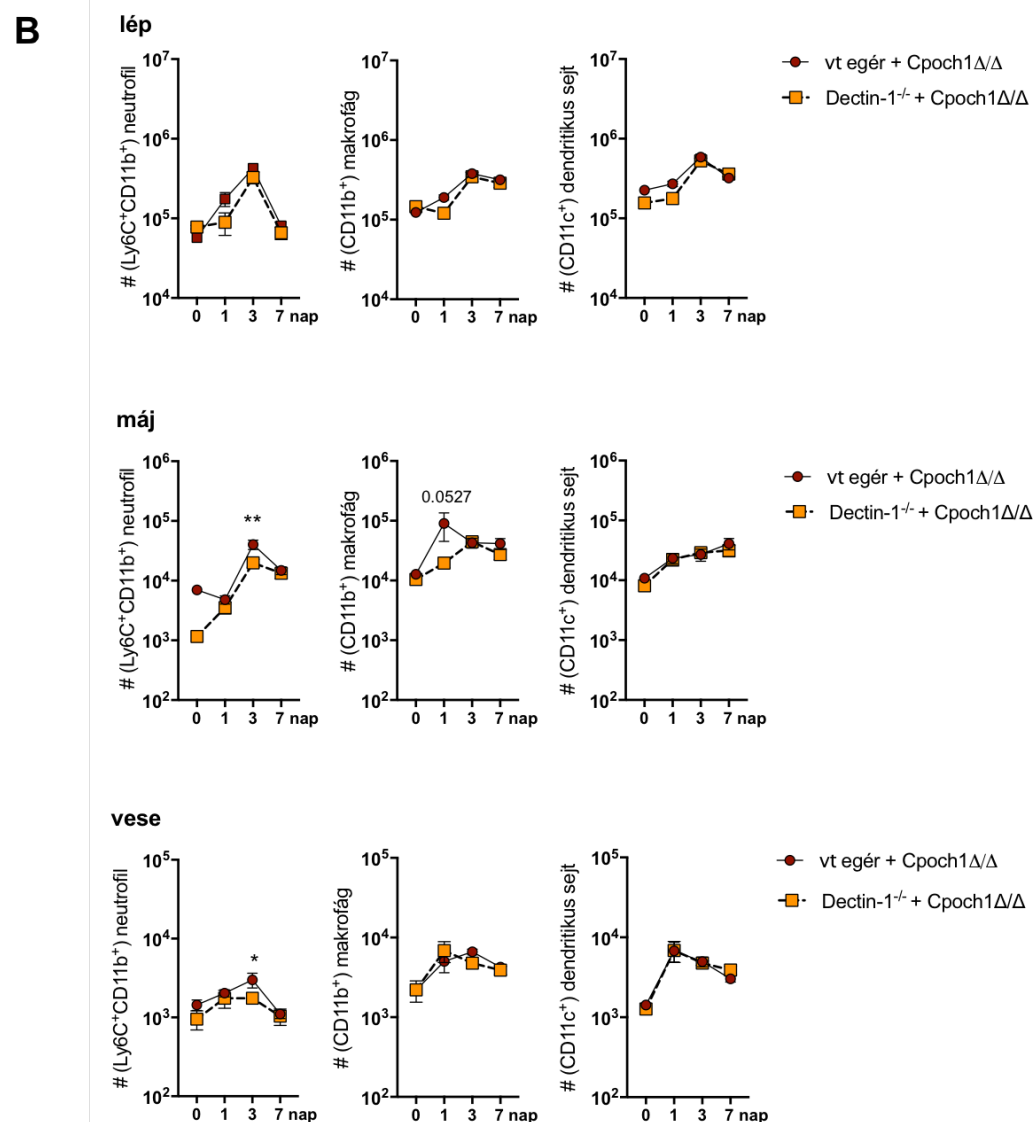
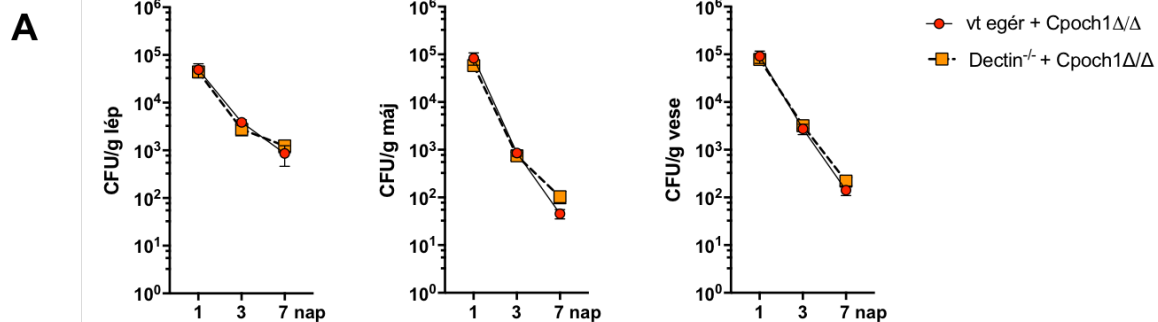
27.A. ábra. A vt és a Dectin-1^{-/-} egerek szervkolonizáltságának összehasonlítása. Fertőzés dózisa: 2×10^7 sejt/100 μ l (n=10/csoport). Az ábra 2 független kísérlet eredményeit foglalja össze. **B. ábra.** A vt és a Dectin-1^{-/-} egerek érzékenységének vizsgálata a *C. parapsilosis* GA1 és a *C. parapsilosis* CDC 317 izolátumokkal történt fertőzést követően (n=4/csoport). Feltüntetett adatok: átlag \pm standard hiba.

6.4.2. A Dectin-1 receptor szerepének vizsgálata a *C. parapsilosis och1Δ/Δ* által indukált immunválaszban

Kísérleteink alapján a sejtfa *N*-mannozilációjának hiányában a *C. parapsilosis* csökkent virulenciával rendelkezik egerek intravénás fertőzését követően. Emellett *in vitro* körülmények között, az *N*-mannán mutáns törzzsel történt inkubáció szignifikánsan magasabb TNF α , IL-1 β , IL-6 és IL-10 citokin szekréciót eredményezett humán PBMC-kben, mint a vad típusú törzs. A receptor blokkolók alkalmazása során kimutatásra került, hogy a *Cpoch1Δ/Δ* indukált magasabb IL-1 β termelés függ a Dectin-1 és TLR4 receptor működésétől ezekben a gazdasejtekben (Perez-Garcia és mtsi., 2016). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az *N*-mannán oldalláncok elfedik a sejtfa belső alkotóelemeit, ezáltal akadályozva a receptorok általi felismerést (Perez-Garcia és mtsi., 2016). Ezért *in vivo* körülmények között vizsgáltuk a Dectin-1 és a *C. parapsilosis* sejtfaiban “hozzáférhetőbb” β -glükán kölcsönhatását.

Eredményeink alapján a Dectin-1 deficiens és a vad típusú egerek hasonló hatékonysággal kontrollálták a *Cpoch1Δ/Δ* sejtek terjedését a lépben, vesében és májban (28.A. ábra.). Az áramlási citometria adatai alapján nem találtunk különbséget az immunsejtek aktivációjában a lépben, és a máj/vese makrofág és dendritikus sejt akkumulációjában. Azonban a *Cpoch1Δ/Δ* stimuláció utáni 3. napon, a vad típusú egerekhez képest a Dectin-1^{-/-} egerek csökkent neutrofil számát figyeltük meg a májban és vesében (28.B. ábra).

A vt és Dectin-1^{-/-} egerek érzékenységének vizsgálatát elvégeztük a *C. parapsilosis och1Δ+OCH1* reintegrált törzzsel is, amely eredmények a Mellékletek 11.3. pontjában találhatóak.



28. ábra. A. ábra. A vt és a *Dectin-1^{-/-}* egerek kolonizáltságának összehasonlítása a *Cpoch1Δ/Δ* fertőzés után (n=10/csoport). Az ábra 2 független kísérlet eredményeit foglalja össze. B. ábra. A vt és *Dectin-1^{-/-}* egerek immunsejt infiltrációjának kinetikája. Feltüntetett adatok: átlag ± standard hiba, 0. nap: PBS kontroll, 1., 3. és 7. nap a fertőzött egerekből származó adatok. Szignifikancia mértéke: ** p<0,0021; * p<0,0332 (2-ágú ANOVA-Sidak teszt).

6.4.3. A Dectin-1 receptor szerepe a szisztémás *C. parapsilosis* fertőzés során - értékelés

Munkánk során *in vivo* körülmények között vizsgáltuk a Dectin-1^{-/-} receptor szerepét a *C. parapsilosis* által kiváltott immunválaszban. Eredményeink alapján nem detektáltunk különbséget a vad típusú és Dectin-1^{-/-} egerek érzékenységiében összehasonlítva a vese, lép és máj CFU adatait, emellett szintén megfigyeltük, hogy a receptor hiánya nincs hatással a szervekben az immunsejtek aktivációjára. Mivel kísérleteinket több *C. parapsilosis* izolátummal is elvégeztük, kijelenthetjük, hogy a *C. parapsilosis* felismerése *in vivo* egér modellben független a Dectin-1 receptortól.

Kísérleteinkben vizsgáltuk, hogy a Dectin-1^{-/-} szerepet játszik-e a *Cpoch1Δ/Δ* fertőzés következtében megfigyelt csökkent virulenciában. Azt tapasztaltuk, hogy a vad típusú és a receptor deficiens állatok ugyanúgy képesek voltak kontrollálni a *Cpoch1Δ/Δ* sejtek disszeminációját, ezt alátámasztva nem detektáltunk különbséget a makrofágok és a dendritikus sejtek toborzásában. Azonban a *Cpoch1Δ/Δ* fertőzött Dectin-1^{-/-} egerek veséjében és májában a fertőzést követő 3. napon szignifikánsan alacsonyabb neutrofil számot figyeltünk meg a vad típusú egér csoporthoz viszonyítva. Ez arra utalhat, hogy a Dectin-1 receptor jelenléte szükséges a neutrofil granulociták hatékony aktivációjához, ennek ellenére a receptor deficiens és vad típusú egerek ugyanúgy képesek voltak eliminálni a *Cpoch1Δ/Δ*-et a szervekből, így arra a következtetésre jutottunk, hogy a neutrofilek nagyobb számú akkumulációja nem szükséges a *Cpoch1Δ/Δ* sejtek elpusztításához a gazdaszervezetből.

Eredményeink alapján *in vivo* egér modellben a sejtfalban jelenlévő β-glükán és a Dectin-1 receptor kapcsolata redundáns szerepet tölt be a *C. parapsilosis* által kiváltott immunválasz kialakításában. Garcia és munkatársai kimutatták, hogy *in vitro* kísérleteikben a *Cpoch1Δ/Δ* által indukált magasabb citokin válasz nem csak a β-glükán/Dectin-1, de az *O*-mannán és TLR4 receptor függő módon alakult ki. Így eredményeink azt sugalmazzák, hogy a *Cpoch1Δ/Δ* fenotípus az *O*-mannán és TLR4 receptor kapcsolatán alapszik (Perez-Garcia és mtsi., 2016). Emellett csoportunk jelenleg is vizsgálja, hogy a Dectin-1 receptor *in vivo* körülmények között részt vesz-e a *C. parapsilosis* törzsek által indukált citokinek szekréciójának szabályozásában.

6.4.4. *C. parapsilosis in vivo* fertőzési modellek eredményeinek értékelése

Laborunk korábbi humán mononukleáris sejteken végzett tanulmányai alapján, a *C. parapsilosis* GA1 izolátum által indukált TNF α , IL-1 β , IL-6 és IL-10 citokinek koncentrációjában csökkenés tapasztalható a Dectin-1 receptorblokkoló alkalmazása következtében, ami utal a receptor szerepére a felismerésben (Toth, A. és mtsi., 2013). Azonban *in vivo* kísérleteink során a Dectin-1 hiánya vagy jelenléte nem volt hatással az egerek érzékenységre és a természetes immunsejtek aktivációjára a vad típusú *C. parapsilosis* törzsekkel szemben. Hasonlóan humán mononukleáris sejteken végzett kísérletek alapján a *Cpoch1 Δ/Δ* magasabb TNF α , IL-1 β , IL-6 és IL-10 termelődést váltott ki a vad típusú *C. parapsilosis*hoz képest (Perez-Garcia és mtsi., 2016), ezzel ellentétben a 14-15 hetes C57BL/6 egerek *Cpoch1 Δ/Δ* törzzsel történt fertőzését követően csökkent citokin szekréciót tapasztaltunk. Így munkánk rávilágít az *in vitro* és *in vivo* rendszerekből származó eredmények különbségeire. Mindemellett az *in vivo* rendszerekben felhasznált modellorganizmusokban nyert eredmények között is felfedezhető ellentét.

Elsősorban a vad típusú *C. parapsilosis*hoz viszonyítva a *Cpoch1 Δ/Δ* -stimulus nagyobb IL-1 β , TNF α , KC termelődést okozott a BALB/c újszülött egér modellben, míg a C57BL/6 vad típusú egerek fertőzése során csökkent humorális választ figyeltünk meg. Így a két *in vivo* modellben tapasztalt citokin és kemokin adatok eltérései a használt genotípusú és fejlettségi állapotú egerek közötti különbségekből eredhetnek. Az újszülöttek körében különösen nagyarányú a *C. parapsilosis* fertőzések előfordulása (Pammi és mtsi., 2013), azonban még nem teljesen tisztázott ennek az immunológiai háttere. A koraszülött csecsemők esetében kimutatták az alacsony neutrofil és monocita sejtszámot, ami fontos szerepet játszhat a szisztémás fertőzések kialakulásának növelésében (Mouzinho és mtsi., 1994). Emellett mononukleáris sejteken végzett kísérletek bizonyítják, hogy a funkcionális PRR-ek aktivitása a gesztációs időszak 33. hetétől növekszik (Kan és mtsi., 2016). Ennek alapján a legkorábbi aktivitást az endoszómában (TLR7, TLR8 és TLR9) és az intracellulárisan (pl. NLR) elhelyezkedő receptorok mutatják, amelyeket az extracelluláris PRR-ek követnek, mint például a TLR1, TLR5 és a Dectin-1 receptor kifejeződése. Ezek a fejlődési stádiumok is fokozhatják a koraszülöttek fertőzésekkel szembeni sebezhetőségét (Kan és mtsi., 2016).

Eredményeink alapján a *C. parapsilosis* indukálta a neutrofilek, makrofágok és dendritikus sejtek infiltrációját és nem okozott Th1 irányú citokin választ a C57BL/6 egerekben. Így feltételezhető, hogy egészséges felnőttekben a természetes immunrendszer

effektor funkciói megfelelően szabályozzák a *C. parapsilosis* terjedését intenzív gyulladásos válasz kialakulása nélkül is, míg a természetes immunrendszer fejlődő állapotának következtében a csecsemők nem tudják korlátozni a *C. parapsilosis* disszeminációját, ami fertőzést eredményezhet. Egy bakteriális szepszist követő összehasonlító elemzés dokumentálta az újszülött egerekben (5-7 napos) az alacsonyabb neutrofil és makrofág számot, emellett a csökkent gyulladásos választ (IL-10, IL-6, TNF α citokinek és MCP-1, MIP-1 α kemokinek) és ROS termelődést a 6-12 hetes állatokhoz képest (Gentile és mtsi., 2014). Így elképzelhető, hogy az effektív neutrofil és makrofág funkció kialakulásához nagyobb arányú humorális válasz generálása szükséges újszülött egerekben, ami magyarázhatja a sejtfal mutáns *C. parapsilosis* esetében tapasztalt nagyobb citokin indukciót és emellett a hatékony eliminációt. Azonban ennek az állításnak a megerősítéséhez további kísérletek szükségesek, amelyekhez megfelelő rendszert jelent az általunk felállított újszülött egér modell.

Az *in vivo* modellekben végzett eredményeink között szintén különbség, hogy adataink alapján a *Drosophila* β -glükán receptor szerepet játszik a *C. parapsilosis* felismerésében, míg egér modellben a Dectin-1 nem járult hozzá az indukált immunválasz szabályozásához. Jelenlegi információink alapján nincs hasonló példa az irodalomban, így ezek a különbségek az emlős és a rovar modell közötti különbségből adódhatnak.

Az alkalmazott modellekben kimutatott gazda-patogén interakció különbségeinek ellenére mindhárom tanulmányozott *in vivo* rendszerben bebizonyosodott, hogy a sejtfal *N*-mannozilációja befolyásolja a *C. parapsilosis* patogenitását és hiányában csökken a fertőzőképesség.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Az invazív *Candida* fertőzések komoly egészségügyi problémát jelentenek napjainkban, amelyek különösen a legyengült immunrendszerű betegeket veszélyeztetik és kezelés nélkül akár halálos kimenetelűek is lehetnek (Lamoth és mtsi., 2018). A *C. albicans* felelős a szisztémás fertőzések többségéért, azonban a megbetegedéseket okozó *Candida* fajok eloszlása megváltozott az elmúlt évtizedekben, ami szerint a nem-*albicans* fajok előfordulási gyakorisága folyamatosan növekszik (Lamoth és mtsi., 2018). Ezen fajok közül kiemelkedik a *C. parapsilosis*, mivel a faj okozta nozokomiális fertőzések esetében a koraszülöttek, valamint az alacsony születési súllyal világra jött újszülöttek a leginkább veszélyeztetett csoport (Pammi és mtsi., 2013; Quindos 2014). Az opportunistá gombafertőzések kialakulásának hátterében álló folyamatokat intenzíven kutatják, e tanulmányok is kiemelt figyelemmel a *C. albicans* patogenitásának meghatározó elemeit vizsgálják. Azonban klinikai jelentősége ellenére keveset tudunk a *C. parapsilosis* által kiváltott immunválaszról.

Kutatócsoportunk ezért célul tűzte ki a *C. parapsilosis*-ra adaptált *in vivo* rendszerek kidolgozását és jellemzését. Mivel korábban bebizonyosodott, hogy a *C. parapsilosis* sejtfal *N*-mannozilációja befolyásolja a gazda-patogén kölcsönhatást (Perez-Garcia és mtsi., 2016), ezért kísérleteink során az *OCH1* génre nézve mutáns és a vad típusú *C. parapsilosis* törzs által kiváltott immunválaszt is részletesen vizsgáltuk.

Munkánk során a következő eredményeket értük el:

1. A *C. parapsilosis* fertőzés jellemzése *D. melanogaster* modellben

A *D. melanogaster* egy olyan alternatív modellszervezet, amelyet gyakran alkalmaznak a természetes immunválasz vizsgálatára, és tulajdonságainak köszönhetően többek között a fertőzések által kiváltott védekező mechanizmusok megfigyelésére is alkalmas. A *Candida* fajok esetében mindeztidáig a *C. albicans* és a *C. glabrata* virulencia faktorait és a veleszületett immunitás aspektusait tanulmányozták. Munkánk során célunk volt annak a vizsgálata, hogy a *D. melanogaster* alkalmas-e a *C. parapsilosis* fertőzések modellezésére.

Kísérleteinkben a rovar gazdaszervezet túlélését, kolonizáltságát, és az antifungális peptidek, mint a Drosomycin és Metchnikowin indukcióját elemeztük a *C. parapsilosis*

patomechanizmus megfigyeléséhez. A *C. parapsilosis* fertőzés következtében a Toll útvonalban deficiens (*MyD88*^{-/-}) és a β -1,3-glükán felismerését végző receptor mutáns *D. melanogaster* törzsek (*GNBP3*^{hades}) csökkent túlélését figyeltünk meg, ami az antimikrobiális peptidek indukciójának zavaraiával párosult. A Persephone szerin proteáz hiányos *ecetmuslica* nem mutatott érzékenységet a *C. parapsilosisszal* szemben, emellett nem tapasztaltunk eltérést a vad típusú legyekhez képest a humorális immunválasz indukciójában sem. Ezen eredményeink alapján arra következtettünk, hogy a *C. parapsilosis* elleni védelemben szerepet játszik a β -1,3-glükán receptor általi felismerés és a Toll útvonal aktiváció, míg a Persephone nem befolyásolja a *C. parapsilosis* fertőzés kimenetelét.

A sejtfa mutáns *C. parapsilosisszal* történő inkubáció a *MyD88*^{-/-} törzs magasabb túlélési arányát és csökkent kolonizáltságát eredményezte a referencia *C. parapsilosis* törzzsel fertőzött *MyD88*^{-/-} csoporttal összehasonlítva, ami alapján megállapítottuk, hogy az *N*-mannoziláció ebben a modellben is befolyásolja a *C. parapsilosis* virulenciáját. Ezzel egyidőben kimutattuk, hogy a *MyD88* deficiens *Drosophila* túlélésének és kolonizáltságának vizsgálata alkalmas rendszerré teszi az *ecetmuslicát* a *C. parapsilosis* törzsek virulencia különbségeinek kimutatására. A *GNBP3*^{hades} *Drosophila* fertőzése során nem tapasztaltunk eltérést a túlélés, a proliferáció és az antimikrobiális peptidek indukciójában a referencia törzs és a sejtfa mutáns *C. parapsilosis* között, ami megerősíti a *GNBP3* szerepét a *C. parapsilosis* sejtekkel szembeni immunválaszban.

2. A szisztémás *C. parapsilosis* fertőzés jellemzése újszülött egér modellben

Munkánk során egy intravénás újszülött egér modellt írunk le a szisztémás *C. parapsilosis* fertőzés tanulmányozására. A 2 napos BALB/c egerek *C. parapsilosisszal* történő oltása után az élesztősejtek homogén terjedését figyeltük meg a különböző szervekben, amit hisztopatológiai vizsgálatokkal is alátámasztottunk. Egy összehasonlító elemzés segítségével bemutattuk, hogy a felállított modell alkalmazható a különböző *C. parapsilosis* törzsek virulenciájának megfigyeléséhez. Eltérést tapasztaltunk a *C. parapsilosis* GA1 és a *C. parapsilosis* CLIB 214 izolátumokkal történő injektálás után a fertőzés kinetikájában. Szintén kimutattuk, hogy a sejtfa mutáns törzs ebben a modellben is csökkent virulenciával rendelkezik és eltérő citokin választ indukál, ami magasabb TNF α , KC és IL-1 β

termelődést eredményezett az egerek veséjében, míg a májból mért citokin adatok szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyultak a referencia törzshöz képest.

Mindemellett összehasonlítottuk az újszülött és a felnőtt állatok érzékenységet a *C. parapsilosis* törzsekkel történő fertőzés után. Megfigyeltük, hogy a kifejlett egerekhez képest az újszülött egerek érzékenyebbek mind a vad típusú mind pedig a sejtfa mutáns törzsszel történt fertőzésre.

3. A vad típusú és a sejtfa mutáns *C. parapsilosis* fertőzés részletes jellemzése és összehasonlítása felnőtt egér modellben

A 12-15 hetes C57BL/6 vad típusú felnőtt egerek fertőzését követően megfigyeltük a *C. parapsilosis* által indukált *in vivo* immunválaszt, emellett vizsgáltuk a sejtfa *N*-mannozilációjának hatását a kiváltott immunfolyamatokra. Megfigyeltük, hogy a sejtfa *N*-mannán oldalláncainak hiányában a *C. parapsilosis* csökkent fertőzőképességgel rendelkezik, ugyanis szignifikánsan alacsonyabb telepszámot detektáltunk a sejtfa mutáns törzsszel fertőzött egerek szerveiben összehasonlítva a vad típusú *C. parapsilosis*szal. Az áramlási citometriai analízisek alapján megállapítottuk, hogy a vad típusú *C. parapsilosis* indukálja a neutrofil granulociták, makrofágok és dendritikus sejtek toborzását, emellett a veséből mért citokin koncentráció alapján azt tapasztaltuk, hogy a fertőzés korai időpontjaiban figyelhető meg $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , IL-6, GM-CSF és IFN- γ termelődés, ami elősegítheti a gombasejtek hatékony eliminációját. A *C. parapsilosis* telepszámok csökkenésével megegyezően gyulladáscsökkentő és az immuntolerancia kialakulásában részt vevő citokinek, IL-4, IL-13, IL-27 és IL-9 szekrécióját tapasztaltuk. Megfigyeltük, hogy a *Cpoch1Δ/Δ* eltérő immunsejt aktivációt okozott a különböző szervekben. Magasabb dendritikus sejt és neutrofil beáramlást tapasztaltunk a lépben és májban, míg szignifikánsan alacsonyabb neutrofil, makrofág és dendritikus sejt számot detektáltunk a vesében a vad típusú *C. parapsilosis*hoz képest. Emellett a *Cpoch1Δ/Δ* a kontrollhoz képest szignifikáns indukciót az IL-27, IL-9 és IL-23 gyulladáscsökkentő citokinek esetében váltott ki. Ezen adatokkal megerősítettük a sejtfa *N*-mannán rétegének immunmoduláló hatását és szerepét a *C. parapsilosis* virulenciájában.

4. A Dectin-1 receptor szerepének vizsgálata *in vivo* egér modellben szisztémás *C. parapsilosis* fertőzés során

Kísérleteink során vizsgáltuk továbbá, hogy a Dectin-1 receptor részt vesz-e a *C. parapsilosis* indukált *in vivo* immunválaszok kialakításában. Megfigyeltük, hogy a fertőzést követően a vad típusú egerekhez képest a Dectin-1 hiánya nem váltott ki szenzitivitást és eltérést az immunsejtek aktivációjában. Ezen eredmények alapján megállapítottuk, hogy a Dectin-1 receptor nem vesz részt a *C. parapsilosis* felismerésében, amit a *C. parapsilosis* CDC 317 és *C. parapsilosis* GA1 izolátumokkal végzett kísérlettel is igazoltunk. Következő lépésként elemeztük, hogy a Dectin-1 hozzájárul-e a *Cpoch1Δ/Δ* fertőzések során tapasztalt csökkent virulenciához. Megfigyeltük, hogy a receptor deficiens egerek ugyanúgy képesek eliminálni a *Cpoch1Δ/Δ* sejteket, mint a vad típusú csoport. Ezt alátámasztva nem detektáltunk eltérést a vad típusú és Dectin-1 hiányos makrofágok és dendritikus sejtek aktivációjában. Azonban a *Cpoch1Δ/Δ* fertőzött Dectin-1^{-/-} egerek veséjében és májában a vad típusú csoporthoz viszonyítva alacsonyabb neutrofil beáramlást figyeltünk meg. Ez arra enged következtetni, hogy a Dectin-1 receptor jelenléte szükséges a neutrofil granulociták hatékony aktivációjához, ennek ellenére a neutrofilek nagyobb számú jelenléte nem szükséges a *Cpoch1Δ/Δ* sejtek hatékonyabb elpusztításáért a gazdaszervezetben. Ezekkel az eredményekkel bizonyítottuk, hogy a Dectin-1 receptor és a sejtfal *N*-mannán réteg hiányában hozzáférhetőbb β -glükán kapcsolata redundáns szerepet tölt be a *C. parapsilosis* által kiváltott immunválaszban *in vivo* egér kísérletek során. Egyéb potenciális receptorok úgy, mint a TLR4 szerepének vizsgálata a *C. parapsilosis* felismerésében jelenleg is folyamatban van laboratóriumunkban.

Összegzőként a következő eredmények eléréséről számolhatunk be:

Jelen dolgozatban három különböző *in vivo* modellrendszerben végeztük el a *C. parapsilosis* által kiváltott fertőzések karakterizálását: egy nem-konvencionális, gerinctelen modellben, a *D. melanogaster*ben, valamint két emlős modellszervezetben, a 2 napos újszülött egér modellben és felnőtt 14-15 hetes egér modellben. Kutatásaink során az opportunistá patogén gomba jelenlétére adott természetes immunválaszt vizsgáltuk. Emellett részletesen elemeztük a *C. parapsilosis* fertőzés során kialakuló celluláris és humorális választ szisztémás candidiasis során. Mindegyik modellben

bizonyítottuk, hogy a *C. parapsilosis* sejtfal integritása fontos szerepet tölt be a patogenitásban. Kísérleteink során megállapítottuk, hogy a *C. albicans*szal ellentétben, a Dectin-1 receptor nem vesz részt a *C. parapsilosis* által kiváltott immunfolyamatok szabályozásában. Eredményeink felhívják a figyelmet a *Candida* fajok által indukált védekezési mechanizmusok különbözőségére és ebből adódóan azok megismerésének fontosságára.

8. SUMMARY

Candida species are opportunistic fungal pathogens causing severe infections in immunocompromised patients (Lamoth et al., 2018). Although *C. albicans* remains the leading cause of invasive candidiasis, the incidence of infections due to non-*albicans* species has significantly increased over the past decades (Lamoth et al., 2018). *C. parapsilosis* is an important opportunistic pathogen, member of the non-*albicans* spp., which is responsible for hospital-acquired infections in neonates and pediatric patients (Quindos 2014). A better and more detailed understanding of how *Candida* spp. evade a human immune attack is of interest and virulence factors of these pathogens are under constant investigation with a special focus on *C. albicans*. Although its clinical importance is increasing, our knowledge of the pathogenesis of *C. parapsilosis* is severely restricted.

Therefore we aimed to develop *in vivo* models to characterize *C. parapsilosis* infections. The cell wall is the immediate contact point between the pathogens and a host, influencing the immune response (Hall and Gow 2013). Here, we examined the role of cell wall integrity in the immune sensing of *C. parapsilosis in vivo*. The role of *N*-linked mannosylation was investigated using the *C. parapsilosis och1Δ/Δ* strain, which displays a severe defect in its *N*-mannan content with elevated β -glucan and chitin levels in the cell wall (Perez-Garcia et al., 2016).

The main results of our studies based on our objectives are as follows:

1. The characterization of *C. parapsilosis* infections in *D. melanogaster*

As an interesting invertebrate model, *D. melanogaster* is suitable to examine the specific steps of innate immune responses against *C. albicans* and *C. glabrata*, as flies deficient in the Toll signaling pathway are sensitive to fungal infections (Quintin et al., 2013). In this study, we used *D. melanogaster* as a model to investigate the pathogenicity of *C. parapsilosis*.

Our results demonstrate, that the Toll pathway in *Drosophila* restrains *C. parapsilosis* proliferation as the Toll pathway mutant, *MyD88^{-/-}* flies succumb to injected *C. parapsilosis*. We found, that however, both the GGBP3 β -glucan receptor and the *Persephone* protease

detection system are required for Toll pathway activation by fungal infections, solely *GNBP3*^{-/-}, and not *psh* mutants are susceptible to the *C. parapsilosis* infection. Also, we observed that *MyD88*^{-/-} and *GNBP3*^{hades} flies showed impaired antimicrobial induction following *C. parapsilosis* stimulation. Therefore, we concluded that *C. parapsilosis* cells are detected by GNBP3 which leads to MyD88 signaling, inducing the Toll antifungal humoral defense. Finally, we found that *N*-mannosylation in the cell wall affected the virulence of *C. parapsilosis* in this model. The *Cpoch1Δ/Δ* challenged *MyD88*^{-/-} flies showed better survival compared to the reference *C. parapsilosis* strain infected group of flies. Therefore, we established a *Drosophila* model to analyze the differences in the virulence of the *C. parapsilosis* strains. Furthermore, we also observed that *GNBP3*^{hades} flies displayed similar sensitivity in survival and fungal burdens to *Cpoch1Δ/Δ* as the reference *C. parapsilosis* strain, which suggests that GNBP3 plays a role in the recognition of the β-1,3-glucan element in the cell wall of this species.

2. Investigation of the virulence of *C. parapsilosis* using a new neonatal mouse model to studying systemic candidiasis

In this study, we describe a novel and conveniently applicable intravenous neonatal mouse model to monitor systemic *C. parapsilosis* infection. Using the currently developed model, we aimed to analyze the pathogenic properties of different *C. parapsilosis* strains. We infected 2 days-old BALB/c mouse pups via the external facial vein with different doses of *C. parapsilosis* strains. Homogenous dissemination of yeast cells was found in the spleen, kidney, liver and brain of infected newborn mice. Colonization of harvested organs was also confirmed by histological examinations. Fungal burdens in newborn mice showed a difference for two isolates of *C. parapsilosis*. *C. parapsilosis* CLIB 214 infection resulted in higher colonization of the spleen, kidney and liver of neonatal mice compared to the *C. parapsilosis* GA1 strain at day 2 after the infection. In a comprehensive study with the adult mice infection, we also presented the attenuated virulence of a *C. parapsilosis* cell wall mutant (*OCH1* null mutant) in this model. Significantly less *Cpoch1Δ/Δ* cells were recovered from the spleen, kidney and liver of newborn mice compared to the wild type strain. When investigating the cytokine response of neonatal mice to *C. parapsilosis* infection, we found elevated TNFα, KC, and IL-1β expression in all organs examined when compared to the

uninfected control. Furthermore, all three measured cytokines showed a significantly elevated expression when newborn mice were infected with *Cpoch1Δ/Δ* cells compared to the wild type strain. This result further supported the inclusion of *OCH1* in *C. parapsilosis* pathogenicity.

3. Detailed characterization and comparison of wild type and cell wall mutant *C. parapsilosis* infection in a mouse model

During this project, our aim was to get deeper insight to how the *N*-mannosilation in the cell wall effects the *C. parapsilosis*-induced immune response. The *Cpoch1Δ/Δ* showed significantly reduced fungal loads in the kidney, liver and spleen of mice compared to those infected with the wild type *C. parapsilosis* strain. Based on the flow cytometric data we found that the wild type *C. parapsilosis* induced the recruitment of neutrophil granulocytes, macrophages and dendritic cells to the infected organs. It has been observed that *Cpoch1Δ/Δ* caused different immune cell activation in the various organs. Higher dendritic cell and neutrophil recruitment were observed in the spleen and liver. While in comparison to the wild type *C. parapsilosis*, a significantly lower neutrophil, macrophage and dendritic cell count was detected in the kidney. During the determination of the cytokine concentration in the kidney, we found that at the early stages of the infection wild type *C. parapsilosis* induced the TNF α , IL-1 β , IL-6, GM-CSF and IFN γ production, which contributes to the effective elimination of the fungal cells from the host. With the decrease in *C. parapsilosis* fungal burdens, we found the secretion of the anti-inflammatory cytokines such as IL-4, IL-13, IL-27 and IL-9, indicating the development of immune tolerance to *C. parapsilosis*. Cytokine measurement from this organ showed the induction of IL-27, IL-9 and IL-23 cytokines induced by *Cpoch1Δ/Δ*. Based on these data, we conclude that due to a defect in the cell wall, *C. parapsilosis* triggers anti-inflammatory immune response in the host, that confirms the immunomodulatory effect of the cell wall *N*-mannan layer and its importance in the virulence.

4. Investigating the role of the Dectin-1 receptor in an *in vivo* mouse model during systemic *C. parapsilosis* infection

Antifungal immunity appears to be mediated primarily by members of the C-type lectin receptor (CLR) family. C-type lectin receptors (CLRs), play critical roles in host defense against *C. albicans* infections (Brown and Crocker 2016). Therefore, in the present study, we aimed to investigate the role of Dectin-1 in *C. parapsilosis* recognition.

Intravenous infection with wild type *C. parapsilosis* cells resulted in similar fungal burdens in the kidney, liver and spleen of both wild type and Dectin-1^{-/-} mice. No differences were observed in the composition of immune cells in the kidney, liver and spleen of wild type and Dectin-1^{-/-} mice after the wild-type *C. parapsilosis* stimuli. Our results demonstrated that loss of *N*-linked mannosylation in the cell wall of *C. parapsilosis* results in significantly decreased virulence. In a previous study, it was demonstrated that loss of proper cell wall *N*-linked mannosylation in *C. parapsilosis* leads to an increased ability to stimulate IL-1 β production and secretion in human mononuclear cells. This IL-1 β production was confirmed to be dependent on engagement of β -1,3-glucan with Dectin-1 and TLR4 with its ligand, most likely *O*-linked mannans (Perez-Garcia et al., 2016). Our purpose was to evaluate whether the presence of Dectin-1 contributes to the reduced virulence of *Cpoch1 Δ/Δ* *in vivo*. According to our data, absence of Dectin-1 did not influence fungal clearance in mice after infection with the less virulent *Cpoch1 Δ/Δ* strain. Interestingly, in Dectin-1^{-/-} mice we detected less effective neutrophil activation in the kidney upon infection with the *Cpoch1 Δ/Δ* strain. However, this phenomenon did not influence the elimination of the *N*-mannan mutant strain.

Based on these results, we conclude that the Dectin-1 receptor is not involved in the immune sensing of *C. parapsilosis*, which was confirmed by studies with two other isolates of *C. parapsilosis*. Furthermore, absence of Dectin-1 receptor in mice did not alter the elimination of *Cpoch1 Δ/Δ* cells. Therefore, our study suggests in contrast with *C. albicans*, the immune response induced by *C. parapsilosis* is independent of Dectin-1 recognition during a systemic infection.

As a summary, we report the following results:

We successfully performed the characterization of *C. parapsilosis* infection *in vivo* using three model systems: a non-conventional invertebrate model, *D. melanogaster*, 2-day old mice pups and 12-15-week old adult mice. In this study, we examined the interaction

between the fungus and innate immunity. In each model we demonstrated that the integrity of *C. parapsilosis* cell wall plays an important role in virulence. In our experiments, we found that, unlike in case of *C. albicans*, the Dectin-1 receptor is not involved in the mediation of *C. parapsilosis* induced immune response. Our results draw attention to different immune defense mechanisms induced by *Candida* species.

This research was supported by GINOP-2.3.2.-15-2016-00015 and GINOP-2.3.3- 15-2016-00006.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Adams, E. L., Rice, P. J., Graves, B., Ensley, H. E., Yu, H. és mtsi. (2008). "Differential high-affinity interaction of dectin-1 with natural or synthetic glucans is dependent upon primary structure and is influenced by polymer chain length and side-chain branching." J Pharmacol Exp Ther **325**(1): 115-123.
2. Alarco, A. M., Marcil, A., Chen, J., Suter, B., Thomas, D. és mtsi. (2004). "Immune-deficient *Drosophila melanogaster*: a model for the innate immune response to human fungal pathogens." J Immunol **172**(9): 5622-5628.
3. Aliaga, S., Clark, R. H., Laughon, M., Walsh, T. J., Hope, W. W. és mtsi. (2014). "Changes in the incidence of candidiasis in neonatal intensive care units." Pediatrics **133**(2): 236-242.
4. Alvarez, Y., Valera, I., Municio, C., Hugo, E., Padron, F. és mtsi. (2010). "Eicosanoids in the innate immune response: TLR and non-TLR routes." Mediators Inflamm **2010**.
5. Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G. L., Metzler, K. D. és Zychlinsky, A. (2012). "Neutrophil function: from mechanisms to disease." Annu Rev Immunol **30**: 459-489.
6. Arendrup, M., Horn, T. és Frimodt-Moller, N. (2002). "In vivo pathogenicity of eight medically relevant *Candida* species in an animal model." Infection **30**(5): 286-291.
7. Ariizumi, K., Shen, G. L., Shikano, S., Xu, S., Ritter, R., 3rd és mtsi. (2000). "Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning." J Biol Chem **275**(26): 20157-20167.
8. Arsenault, A. B. és Bliss, J. M. (2015). "Neonatal Candidiasis: New Insights into an Old Problem at a Unique Host-Pathogen Interface." Curr Fungal Infect Rep **9**(4): 246-252.
9. Bain, J. M., Louw, J., Lewis, L. E., Okai, B., Walls, C. A. és mtsi. (2014). "*Candida albicans* hypha formation and mannan masking of beta-glucan inhibit macrophage phagosome maturation." MBio **5**(6): e01874.
10. Barreto-Bergter, E. és Figueiredo, R. T. (2014). "Fungal glycans and the innate immune recognition." Front Cell Infect Microbiol **4**: 145.
11. Bassetti, M., Garnacho-Montero, J., Calandra, T., Kullberg, B., Dimopoulos, G. és mtsi. (2017). "Intensive care medicine research agenda on invasive fungal infection in critically ill patients." Intensive Care Med **43**(9): 1225-1238.
12. Bassetti, M., Righi, E., Montravers, P. és Cornely, O. A. (2018). "What has changed in the treatment of invasive candidiasis? A look at the past 10 years and ahead." J Antimicrob Chemother **73**(suppl_1): i14-i25.
13. Bates, S., Hughes, H. B., Munro, C. A., Thomas, W. P., Maccallum, D. M. és mtsi. (2006). "Outer chain N-glycans are required for cell wall integrity and virulence of *Candida albicans*." J Biol Chem **281**(1): 90-98.
14. Becker, K. L., Ifrim, D. C., Quintin, J., Netea, M. G. és Van De Veerdonk, F. L. (2015). "Antifungal innate immunity: recognition and inflammatory networks." Semin Immunopathol **37**(2): 107-116.
15. Benedict, K., Richardson, M., Vallabhaneni, S., Jackson, B. R. és Chiller, T. (2017). "Emerging issues, challenges, and changing epidemiology of fungal disease outbreaks." Lancet Infect Dis **17**(12): e403-e411.
16. Benjamin, D. K., Jr., Hudak, M. L., Duara, S., Randolph, D. A., Bidegain, M. és mtsi. (2014). "Effect of fluconazole prophylaxis on candidiasis and mortality in premature infants: a randomized clinical trial." JAMA **311**(17): 1742-1749.

17. Bertini, A., De Bernardis, F., Hensgens, L. A., Sandini, S., Senesi, S. és mtsi. (2013). "Comparison of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* adhesive properties and pathogenicity." Int J Med Microbiol **303**(2): 98-103.
18. Billingham, R. E. és Silvers, W. K. (1961). "Quantitative studies on the ability of cells of different origins to induce tolerance of skin homografts and cause runt disease in neonatal mice." J Exp Zool **146**: 113-129.
19. Bourgeois, C., Majer, O., Frohner, I. E., Lesiak-Markowicz, I., Hildering, K. S. és mtsi. (2011). "Conventional dendritic cells mount a type I IFN response against *Candida* spp. requiring novel phagosomal TLR7-mediated IFN-beta signaling." J Immunol **186**(5): 3104-3112.
20. Brown, G. D. (2006). "Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor." Nat Rev Immunol **6**(1): 33-43.
21. Brown, G. D. és Crocker, P. R. (2016). "Lectin Receptors Expressed on Myeloid Cells." Microbiol Spectr **4**(5).
22. Brown, G. D., Denning, D. W., Gow, N. A., Levitz, S. M., Netea, M. G. és mtsi. (2012). "Hidden killers: human fungal infections." Sci Transl Med **4**(165): 165rv113.
23. Brown, G. D. és Gordon, S. (2005). "Immune recognition of fungal beta-glucans." Cell Microbiol **7**(4): 471-479.
24. Brown, J., O'callaghan, C. A., Marshall, A. S., Gilbert, R. J., Siebold, C. és mtsi. (2007). "Structure of the fungal beta-glucan-binding immune receptor dectin-1: implications for function." Protein Sci **16**(6): 1042-1052.
25. Brunetti, G., Visconti, V., Ghezzi, M. C., Giordano, A. és Raponi, G. (2017). "The Correlation Between Biofilm Production and Catheter-Related Bloodstream Infections Sustained by *Candida*. A Case Control Study." Adv Exp Med Biol **973**: 89-98.
26. Buchon, N., Poidevin, M., Kwon, H. M., Guillou, A., Sottas, V. és mtsi. (2009). "A single modular serine protease integrates signals from pattern-recognition receptors upstream of the Drosophila Toll pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(30): 12442-12447.
27. Buchon, N., Silverman, N. és Cherry, S. (2014). "Immunity in Drosophila melanogaster--from microbial recognition to whole-organism physiology." Nat Rev Immunol **14**(12): 796-810.
28. Butler, G., Rasmussen, M. D., Lin, M. F., Santos, M. A., Sakthikumar, S. és mtsi. (2009). "Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes." Nature **459**(7247): 657-662.
29. Cambi, A., Gijzen, K., De Vries L, J., Torensma, R., Joosten, B. és mtsi. (2003). "The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells." Eur J Immunol **33**(2): 532-538.
30. Cambi, A., Netea, M. G., Mora-Montes, H. M., Gow, N. A., Hato, S. V. és mtsi. (2008). "Dendritic cell interaction with *Candida albicans* critically depends on N-linked mannan." J Biol Chem **283**(29): 20590-20599.
31. Casadevall, A. és Pirofski, L. A. (2003). "The damage-response framework of microbial pathogenesis." Nat Rev Microbiol **1**(1): 17-24.
32. Castillo, L., Maccallum, D. M., Brown, A. J., Gow, N. A. és Odds, F. C. (2011). "Differential regulation of kidney and spleen cytokine responses in mice challenged with pathology-standardized doses of *Candida albicans* mannosylation mutants." Infect Immun **79**(1): 146-152.

33. Chamilos, G., Lionakis, M. S., Lewis, R. E. és Kontoyiannis, D. P. (2007). "Role of mini-host models in the study of medically important fungi." Lancet Infect Dis **7**(1): 42-55.
34. Chamilos, G., Lionakis, M. S., Lewis, R. E., Lopez-Ribot, J. L., Saville, S. P. és mtsi. (2006). "*Drosophila melanogaster* as a facile model for large-scale studies of virulence mechanisms and antifungal drug efficacy in *Candida* species." J Infect Dis **193**(7): 1014-1022.
35. Chapman, B., Slavin, M., Marriott, D., Halliday, C., Kidd, S. és mtsi. (2017). "Changing epidemiology of candidaemia in Australia." J Antimicrob Chemother **72**(4): 1270.
36. Cheng, S. C., Quintin, J., Cramer, R. A., Shepardson, K. M., Saeed, S. és mtsi. (2014). "mTOR- and HIF-1 α -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity." Science **345**(6204): 1250684.
37. Chowdhary, A., Sharma, C. és Meis, J. F. (2017). "*Candida auris*: A rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally." PLoS Pathog **13**(5): e1006290.
38. Clerihew, L., Lamagni, T. L., Brocklehurst, P. és Mcguire, W. (2007). "*Candida parapsilosis* infection in very low birthweight infants." Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed **92**(2): F127-129.
39. Dambuza, I. M., Levitz, S. M., Netea, M. G. és Brown, G. D. (2017). "Fungal Recognition and Host Defense Mechanisms." Microbiol Spectr **5**(4).
40. Daniel, H. M., Lachance, M. A. és Kurtzman, C. P. (2014). "On the reclassification of species assigned to *Candida* and other anamorphic ascomycetous yeast genera based on phylogenetic circumscription." Antonie Van Leeuwenhoek **106**(1): 67-84.
41. Davis, M. M., Alvarez, F. J., Ryman, K., Holm, A. A., Ljungdahl, P. O. és mtsi. (2011). "Wild-type *Drosophila melanogaster* as a model host to analyze nitrogen source dependent virulence of *Candida albicans*." PLoS One **6**(11): e27434.
42. De Jesus, M., Rodriguez, A. E., Yagita, H., Ostroff, G. R. és Mantis, N. J. (2015). "Sampling of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* by Langerin-positive dendritic cells in mouse Peyer's patches." Immunol Lett **168**(1): 64-72.
43. De Jong, M. A., Vriend, L. E., Theelen, B., Taylor, M. E., Fluitsma, D. és mtsi. (2010). "C-type lectin Langerin is a beta-glucan receptor on human Langerhans cells that recognizes opportunistic and pathogenic fungi." Mol Immunol **47**(6): 1216-1225.
44. Del Fresno, C., Soulat, D., Roth, S., Blazek, K., Udalova, I. és mtsi. (2013). "Interferon-beta production via Dectin-1-Syk-IRF5 signaling in dendritic cells is crucial for immunity to *C. albicans*." Immunity **38**(6): 1176-1186.
45. Dennehy, K. M., Ferwerda, G., Faro-Trindade, I., Pyz, E., Willment, J. A. és mtsi. (2008). "Syk kinase is required for collaborative cytokine production induced through Dectin-1 and Toll-like receptors." Eur J Immunol **38**(2): 500-506.
46. Diaz-Jimenez, D. F., Mora-Montes, H. M., Hernandez-Cervantes, A., Luna-Arias, J. P., Gow, N. A. és mtsi. (2012). "Biochemical characterization of recombinant *Candida albicans* mannosyltransferases Mnt1, Mnt2 and Mnt5 reveals new functions in O- and N-mannan biosynthesis." Biochem Biophys Res Commun **419**(1): 77-82.
47. Doi, A. M., Pignatari, A. C., Edmond, M. B., Marra, A. R., Camargo, L. F. és mtsi. (2016). "Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program." PLoS One **11**(1): e0146909.

48. Domer, J. E. (1988). "Intragastric colonization of infant mice with *Candida albicans* induces systemic immunity demonstrable upon challenge as adults." J Infect Dis **157**(5): 950-958.
49. Drummond, R. A., Gaffen, S. L., Hise, A. G. és Brown, G. D. (2014). "Innate Defense against Fungal Pathogens." Cold Spring Harb Perspect Med **5**(6).
50. Dunic, J., Dabelic, S. és Fogel, M. (2006). "Galectin-3: an open-ended story." Biochim Biophys Acta **1760**(4): 616-635.
51. Dunkler, A., Walther, A., Specht, C. A. és Wendland, J. (2005). "*Candida albicans* CHT3 encodes the functional homolog of the Cts1 chitinase of *Saccharomyces cerevisiae*." Fungal Genet Biol **42**(11): 935-947.
52. Estrada-Mata, E., Navarro-Arias, M. J., Perez-Garcia, L. A., Mellado-Mojica, E., Lopez, M. G. és mtsi. (2015). "Members of the *Candida parapsilosis* Complex and *Candida albicans* are Differentially Recognized by Human Peripheral Blood Mononuclear Cells." Front Microbiol **6**: 1527.
53. Fauvarque, M. O. és Williams, M. J. (2011). "Drosophila cellular immunity: a story of migration and adhesion." J Cell Sci **124**(Pt 9): 1373-1382.
54. Ferrandon, D., Imler, J. L. és Hoffmann, J. A. (2004). "Sensing infection in *Drosophila*: Toll and beyond." Semin Immunol **16**(1): 43-53.
55. Ferrandon, D., Jung, A. C., Cricqui, M., Lemaitre, B., Uttenweiler-Joseph, S. és mtsi. (1998). "A drosomycin-GFP reporter transgene reveals a local immune response in *Drosophila* that is not dependent on the Toll pathway." EMBO J **17**(5): 1217-1227.
56. Ferwerda, B., Ferwerda, G., Plantinga, T. S., Willment, J. A., Van Spruiel, A. B. és mtsi. (2009). "Human dectin-1 deficiency and mucocutaneous fungal infections." N Engl J Med **361**(18): 1760-1767.
57. Ferwerda, G., Meyer-Wentrup, F., Kullberg, B. J., Netea, M. G. és Adema, G. J. (2008). "Dectin-1 synergizes with TLR2 and TLR4 for cytokine production in human primary monocytes and macrophages." Cell Microbiol **10**(10): 2058-2066.
58. Foster, N., Symes, C., Barton, R. és Hobson, R. (2007). "Rapid identification of *Candida glabrata* in *Candida* bloodstream infections." J Med Microbiol **56**(Pt 12): 1639-1643.
59. Frenkel, M., Mandelblat, M., Alastruey-Izquierdo, A., Mendlovic, S., Semis, R. és mtsi. (2016). "Pathogenicity of *Candida albicans* isolates from bloodstream and mucosal candidiasis assessed in mice and *Galleria mellonella*." J Mycol Med **26**(1): 1-8.
60. Gacser, A., Salomon, S. és Schafer, W. (2005). "Direct transformation of a clinical isolate of *Candida parapsilosis* using a dominant selection marker." FEMS Microbiol Lett **245**(1): 117-121.
61. Gacser, A., Schafer, W., Nosanchuk, J. S., Salomon, S. és Nosanchuk, J. D. (2007a). "Virulence of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in reconstituted human tissue models." Fungal Genet Biol **44**(12): 1336-1341.
62. Gacser, A., Stehr, F., Kroger, C., Kredics, L., Schafer, W. és mtsi. (2007b). "Lipase 8 affects the pathogenesis of *Candida albicans*." Infect Immun **75**(10): 4710-4718.
63. Gales, A., Conduche, A., Bernad, J., Lefevre, L., Olganier, D. és mtsi. (2010). "PPARgamma controls Dectin-1 expression required for host antifungal defense against *Candida albicans*." PLoS Pathog **6**(1): e1000714.

64. Gantner, B. N., Simmons, R. M., Canavera, S. J., Akira, S. és Underhill, D. M. (2003). "Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2." J Exp Med **197**(9): 1107-1117.
65. Gasparoto, T. H., Tessarolli, V., Garlet, T. P., Torres, S. A., Garlet, G. P. és mtsi. (2010). "Absence of functional TLR4 impairs response of macrophages after *Candida albicans* infection." Med Mycol **48**(8): 1009-1017.
66. Gauglitz, G. G., Callenberg, H., Weindl, G. és Korting, H. C. (2012). "Host defence against *Candida albicans* and the role of pattern-recognition receptors." Acta Derm Venereol **92**(3): 291-298.
67. Gentile, L. F., Nacionales, D. C., Lopez, M. C., Vanzant, E., Cuenca, A. és mtsi. (2014). "Protective immunity and defects in the neonatal and elderly immune response to sepsis." J Immunol **192**(7): 3156-3165.
68. Gillum, A. M., Tsay, E. Y. és 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**(2): 179-182.
69. Glittenberg, M. T., Kounatidis, I., Christensen, D., Kostov, M., Kimber, S. és mtsi. (2011a). "Pathogen and host factors are needed to provoke a systemic host response to gastrointestinal infection of *Drosophila* larvae by *Candida albicans*." Dis Model Mech **4**(4): 515-525.
70. Glittenberg, M. T., Silas, S., Maccallum, D. M., Gow, N. A. és Ligoxygakis, P. (2011b). "Wild-type *Drosophila melanogaster* as an alternative model system for investigating the pathogenicity of *Candida albicans*." Dis Model Mech **4**(4): 504-514.
71. Gobert, V., Gottar, M., Matskevich, A. A., Rutschmann, S., Royet, J. és mtsi. (2003). "Dual activation of the *Drosophila* toll pathway by two pattern recognition receptors." Science **302**(5653): 2126-2130.
72. Goodridge, H. S. és Underhill, D. M. (2008). "Fungal Recognition by TLR2 and Dectin-1." Handb Exp Pharmacol(183): 87-109.
73. Goriely, S., Neurath, M. F. és Goldman, M. (2008). "How microorganisms tip the balance between interleukin-12 family members." Nat Rev Immunol **8**(1): 81-86.
74. Gottar, M., Gobert, V., Matskevich, A. A., Reichhart, J. M., Wang, C. és mtsi. (2006). "Dual detection of fungal infections in *Drosophila* via recognition of glucans and sensing of virulence factors." Cell **127**(7): 1425-1437.
75. Gow, N. A. és Netea, M. G. (2016). "Medical mycology and fungal immunology: new research perspectives addressing a major world health challenge." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **371**(1709).
76. Gow, N. A., Van De Veerdonk, F. L., Brown, A. J. és Netea, M. G. (2011). "*Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization." Nat Rev Microbiol **10**(2): 112-122.
77. Gow, N. a. R., Latge, J. P. és Munro, C. A. (2017). "The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function." Microbiol Spectr **5**(3).
78. Gringhuis, S. I., Den Dunnen, J., Litjens, M., Van Der Vlist, M., Wevers, B. és mtsi. (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.
79. Gringhuis, S. I., Wevers, B. A., Kaptein, T. M., Van Capel, T. M., Theelen, B. és mtsi. (2011). "Selective C-Rel activation via Malt1 controls anti-fungal T(H)-17 immunity by dectin-1 and dectin-2." PLoS Pathog **7**(1): e1001259.
80. Gross, O., Gewies, A., Finger, K., Schafer, M., Sparwasser, T. és mtsi. (2006). "Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity." Nature **442**(7103): 651-656.

81. Guinea, J. (2014). "Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia." Clin Microbiol Infect **20 Suppl 6**: 5-10.
82. Hall, R. A. és Gow, N. A. (2013). "Mannosylation in *Candida albicans*: role in cell wall function and immune recognition." Mol Microbiol **90**(6): 1147-1161.
83. Hays, C., Duhamel, C., Cattoir, V. és Bonhomme, J. (2011). "Rapid and accurate identification of species belonging to the *Candida parapsilosis* complex by real-time PCR and melting curve analysis." J Med Microbiol **60**(Pt 4): 477-480.
84. Heinsbroek, S. E., Taylor, P. R., Martinez, F. O., Martinez-Pomares, L., Brown, G. D. és mtsi. (2008). "Stage-specific sampling by pattern recognition receptors during *Candida albicans* phagocytosis." PLoS Pathog **4**(11): e1000218.
85. Hetru, C. és Hoffmann, J. A. (2009). "NF-kappaB in the immune response of *Drosophila*." Cold Spring Harb Perspect Biol **1**(6): a000232.
86. Hidron, A. I., Edwards, J. R., Patel, J., Horan, T. C., Sievert, D. M. és mtsi. (2008). "NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007." Infect Control Hosp Epidemiol **29**(11): 996-1011.
87. Higa, M. (2008). "[Clinical epidemiology of fungal infection in diabetes]." Nihon Rinsho **66**(12): 2239-2244.
88. Holland, L. M., Schroder, M. S., Turner, S. A., Taff, H., Andes, D. és mtsi. (2014). "Comparative phenotypic analysis of the major fungal pathogens *Candida parapsilosis* and *Candida albicans*." PLoS Pathog **10**(9): e1004365.
89. Holmskov, U., Malhotra, R., Sim, R. B. és Jensenius, J. C. (1994). "Collectins: collagenous C-type lectins of the innate immune defense system." Immunol Today **15**(2): 67-74.
90. Honti, V., Csordas, G., Kurucz, E., Markus, R. és Ando, I. (2014). "The cell-mediated immunity of *Drosophila melanogaster*: hemocyte lineages, immune compartments, microanatomy and regulation." Dev Comp Immunol **42**(1): 47-56.
91. Horvath, P., Nosanchuk, J. D., Hamari, Z., Vagvolgyi, C. és Gacser, A. (2012). "The identification of gene duplication and the role of secreted aspartyl proteinase 1 in *Candida parapsilosis* virulence." J Infect Dis **205**(6): 923-933.
92. Hoyer, L. L. (2001). "The ALS gene family of *Candida albicans*." Trends Microbiol **9**(4): 176-180.
93. Huang, W., Na, L., Fidel, P. L. és Schwarzenberger, P. (2004). "Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice." J Infect Dis **190**(3): 624-631.
94. Hwang, G., Liu, Y., Kim, D., Li, Y., Krysan, D. J. és mtsi. (2017). "*Candida albicans* mannans mediate *Streptococcus mutans* exoenzyme GtfB binding to modulate cross-kingdom biofilm development in vivo." PLoS Pathog **13**(6): e1006407.
95. Ifrim, D. C., Bain, J. M., Reid, D. M., Oosting, M., Verschuere, I. és mtsi. (2014). "Role of Dectin-2 for host defense against systemic infection with *Candida glabrata*." Infect Immun **82**(3): 1064-1073.
96. Ifrim, D. C., Quintin, J., Courjol, F., Verschuere, I., Van Krieken, J. H. és mtsi. (2016). "The Role of Dectin-2 for Host Defense Against Disseminated Candidiasis." J Interferon Cytokine Res **36**(4): 267-276.
97. Ip, W. K. és Lau, Y. L. (2004). "Role of mannose-binding lectin in the innate defense against *Candida albicans*: enhancement of complement activation, but lack of opsonic function, in phagocytosis by human dendritic cells." J Infect Dis **190**(3): 632-640.

98. Issa, N., Guillaumot, N., Lauret, E., Matt, N., Schaeffer-Reiss, C. és mtsi. (2018). "The Circulating Protease Persephone Is an Immune Sensor for Microbial Proteolytic Activities Upstream of the *Drosophila* Toll Pathway." Mol Cell **69**(4): 539-550 e536.
99. Jacobsen, I. D. és Hube, B. (2017). "Candida albicans morphology: still in focus." Expert Rev Anti Infect Ther **15**(4): 327-330.
100. Jaeger, M., Van Der Lee, R., Cheng, S. C., Johnson, M. D., Kumar, V. és mtsi. (2015). "The RIG-I-like helicase receptor MDA5 (IFIH1) is involved in the host defense against *Candida* infections." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **34**(5): 963-974.
101. Janeway, C. A., Jr. (1989). "Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **54 Pt 1**: 1-13.
102. Jouault, T., Ibata-Ombetta, S., Takeuchi, O., Trinel, P. A., Sacchetti, P. és mtsi. (2003). "*Candida albicans* phospholipomannan is sensed through toll-like receptors." J Infect Dis **188**(1): 165-172.
103. Kan, B., Razzaghian, H. R. és Lavoie, P. M. (2016). "An Immunological Perspective on Neonatal Sepsis." Trends Mol Med **22**(4): 290-302.
104. Kashem, S. W., Igyarto, B. Z., Gerami-Nejad, M., Kumamoto, Y., Mohammed, J. A. és mtsi. (2015). "*Candida albicans* morphology and dendritic cell subsets determine T helper cell differentiation." Immunity **42**(2): 356-366.
105. Kawasaki, T. és Kawai, T. (2014). "Toll-like receptor signaling pathways." Front Immunol **5**: 461.
106. Klis, F. M., De Groot, P. és Hellingwerf, K. (2001). "Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*." Med Mycol **39 Suppl 1**: 1-8.
107. Koga-Ito, C. Y., Komiyama, E. Y., Martins, C. A., Vasconcellos, T. C., Jorge, A. O. és mtsi. (2011). "Experimental systemic virulence of oral *Candida dubliniensis* isolates in comparison with *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida krusei*." Mycoses **54**(5): e278-285.
108. Konrad, L., Becker, G., Schmidt, A., Klockner, T., Kaufer-Stillger, G. és mtsi. (1994). "Cloning, structure, cellular localization, and possible function of the tumor suppressor gene lethal(3)malignant blood neoplasm-1 of *Drosophila melanogaster*." Dev Biol **163**(1): 98-111.
109. Kuhn, D. M., Mikhherjee, P. K., Clark, T. A., Pujol, C., Chandra, J. és mtsi. (2004). "*Candida parapsilosis* characterization in an outbreak setting." Emerg Infect Dis **10**(6): 1074-1081.
110. Kullberg, B. J. és Arendrup, M. C. (2015). "Invasive Candidiasis." N Engl J Med **373**(15): 1445-1456.
111. Kumar, H., Kawai, T. és Akira, S. (2011). "Pathogen recognition by the innate immune system." Int Rev Immunol **30**(1): 16-34.
112. Kurucz, E., Markus, R., Zsamboki, J., Folkl-Medzihradzky, K., Darula, Z. és mtsi. (2007). "Nimrod, a putative phagocytosis receptor with EGF repeats in *Drosophila* plasmatocytes." Curr Biol **17**(7): 649-654.
113. Lackey, E., Vipulanandan, G., Childers, D. S. és Kadosh, D. (2013). "Comparative evolution of morphological regulatory functions in *Candida* species." Eukaryot Cell **12**(10): 1356-1368.
114. Laffey, S. F. és Butler, G. (2005). "Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*." Microbiology **151**(Pt 4): 1073-1081.
115. Lamothe, F., Lockhart, S. R., Berkow, E. L. és Calandra, T. (2018). "Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis." J Antimicrob Chemother **73**(suppl_1): i4-i13.

116. Lastauskiene, E., Cepulyte, J., Girkontaite, I. és Zinkeviciene, A. (2015). "Phenotypic switching of *Candida guilliermondii* is associated with pseudohyphae formation and antifungal resistance." Mycopathologia **179**(3-4): 205-211.
117. Lee, S. J., Zheng, N. Y., Clavijo, M. és Nussenzweig, M. C. (2003). "Normal host defense during systemic candidiasis in mannose receptor-deficient mice." Infect Immun **71**(1): 437-445.
118. Leibundgut-Landmann, S., Gross, O., Robinson, M. J., Osorio, F., Slack, E. C. és mtsi. (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.
119. Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M. és 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.
120. Levashina, E. A., Ohresser, S., Bulet, P., Reichhart, J. M., Hetru, C. és mtsi. (1995). "Metchnikowin, a novel immune-inducible proline-rich peptide from *Drosophila* with antibacterial and antifungal properties." Eur J Biochem **233**(2): 694-700.
121. Levashina, E. A., Ohresser, S., Lemaitre, B. és Imler, J. L. (1998). "Two distinct pathways can control expression of the gene encoding the *Drosophila* antimicrobial peptide metchnikowin." J Mol Biol **278**(3): 515-527.
122. Levitin, A., Marcil, A., Tettweiler, G., Laforest, M. J., Oberholzer, U. és mtsi. (2007). "*Drosophila melanogaster* Thor and response to *Candida albicans* infection." Eukaryot Cell **6**(4): 658-663.
123. Li, X., Utomo, A., Cullere, X., Choi, M. M., Milner, D. A., Jr. és mtsi. (2011). "The beta-glucan receptor Dectin-1 activates the integrin Mac-1 in neutrophils via Vav protein signaling to promote *Candida albicans* clearance." Cell Host Microbe **10**(6): 603-615.
124. Liang, S. C., Tan, X. Y., Luxenberg, D. P., Karim, R., Dunussi-Joannopoulos, K. és mtsi. (2006). "Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides." J Exp Med **203**(10): 2271-2279.
125. Ligoxygakis, P., Pelte, N., Hoffmann, J. A. és Reichhart, J. M. (2002). "Activation of *Drosophila* Toll during fungal infection by a blood serine protease." Science **297**(5578): 114-116.
126. Lillegard, J. B., Sim, R. B., Thorkildson, P., Gates, M. A. és Kozel, T. R. (2006). "Recognition of *Candida albicans* by mannan-binding lectin in vitro and in vivo." J Infect Dis **193**(11): 1589-1597.
127. Lima-Neto, R. G., Beltrao, E. I., Oliveira, P. C. és Neves, R. P. (2011). "Adherence of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* to epithelial cells correlates with fungal cell surface carbohydrates." Mycoses **54**(1): 23-29.
128. Lin, D., Wu, L. C., Rinaldi, M. G. és Lehmann, P. F. (1995). "Three distinct genotypes within *Candida parapsilosis* from clinical sources." J Clin Microbiol **33**(7): 1815-1821.
129. Lin, L., Ibrahim, A. S., Xu, X., Farber, J. M., Avanesian, V. és mtsi. (2009). "Th1-Th17 cells mediate protective adaptive immunity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* infection in mice." PLoS Pathog **5**(12): e1000703.
130. Linden, J. R., De Paepe, M. E., Laforce-Nesbitt, S. S. és Bliss, J. M. (2013a). "Galectin-3 plays an important role in protection against disseminated candidiasis." Med Mycol **51**(6): 641-651.

131. Linden, J. R., Kunkel, D., Laforce-Nesbitt, S. S. és 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.
132. Lionakis, M. S., Lim, J. K., Lee, C. C. és Murphy, P. M. (2011). "Organ-specific innate immune responses in a mouse model of invasive candidiasis." J Innate Immun **3**(2): 180-199.
133. Livak, K. J. és 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.
134. Lo, H. J., Kohler, J. R., Didomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A. és mtsi. (1997). "Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent." Cell **90**(5): 939-949.
135. Lockhart, S. R., Etienne, K. A., Vallabhaneni, S., Farooqi, J., Chowdhary, A. és mtsi. (2017). "Simultaneous Emergence of Multidrug-Resistant *Candida auris* on 3 Continents Confirmed by Whole-Genome Sequencing and Epidemiological Analyses." Clin Infect Dis **64**(2): 134-140.
136. Lockhart, S. R., Messer, S. A., Pfaller, M. A. és Diekema, D. J. (2008). "Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in comparison to the closely related species *Candida parapsilosis*." J Clin Microbiol **46**(8): 2659-2664.
137. Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D. és Xia, B. (2012). "CD4(+)T cells: differentiation and functions." Clin Dev Immunol **2012**: 925135.
138. Macatonia, S. E., Hsieh, C. S., Murphy, K. M. és O'garra, A. (1993). "Dendritic cells and macrophages are required for Th1 development of CD4+ T cells from alpha beta TCR transgenic mice: IL-12 substitution for macrophages to stimulate IFN-gamma production is IFN-gamma-dependent." Int Immunol **5**(9): 1119-1128.
139. Marakalala, M. J., Vautier, S., Potrykus, J., Walker, L. A., Shepardson, K. M. és mtsi. (2013). "Differential adaptation of *Candida albicans* *in vivo* modulates immune recognition by dectin-1." PLoS Pathog **9**(4): e1003315.
140. Marquis, M., Lewandowski, D., Dugas, V., Aumont, F., Senechal, S. és mtsi. (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.
141. Massey, S. E., Moura, G., Beltrao, P., Almeida, R., Garey, J. R. és mtsi. (2003). "Comparative evolutionary genomics unveils the molecular mechanism of reassignment of the CTG codon in *Candida* spp." Genome Res **13**(4): 544-557.
142. Matskevich, A. A., Quintin, J. és Ferrandon, D. (2010). "The *Drosophila* PRR GNBP3 assembles effector complexes involved in antifungal defenses independently of its Toll-pathway activation function." Eur J Immunol **40**(5): 1244-1254.
143. Mccarty, T. P. és Pappas, P. G. (2016). "Invasive Candidiasis." Infect Dis Clin North Am **30**(1): 103-124.
144. McCormick, A., Heesemann, L., Wagener, J., Marcos, V., Hartl, D. és mtsi. (2010). "NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*." Microbes Infect **12**(12-13): 928-936.
145. Mencacci, A., Perruccio, K., Bacci, A., Cenci, E., Benedetti, R. és mtsi. (2001). "Defective antifungal T-helper 1 (TH1) immunity in a murine model of allogeneic T-cell-depleted bone marrow transplantation and its restoration by treatment with TH2 cytokine antagonists." Blood **97**(5): 1483-1490.

146. Menegazzi, R., Decleva, E. és Dri, P. (2012). "Killing by neutrophil extracellular traps: fact or folklore?" Blood **119**(5): 1214-1216.
147. Mesa-Arango, A. C., Forastiero, A., Bernal-Martinez, L., Cuenca-Estrella, M., Mellado, E. és mtsi. (2013). "The non-mammalian host *Galleria mellonella* can be used to study the virulence of the fungal pathogen *Candida tropicalis* and the efficacy of antifungal drugs during infection by this pathogenic yeast." Med Mycol **51**(5): 461-472.
148. Monod, M. és Borg-Von, Z. M. (2002). "Secreted aspartic proteases as virulence factors of *Candida* species." Biol Chem **383**(7-8): 1087-1093.
149. Mora-Montes, H. M., Bates, S., Netea, M. G., Castillo, L., Brand, A. és mtsi. (2010). "A multifunctional mannosyltransferase family in *Candida albicans* determines cell wall mannan structure and host-fungus interactions." J Biol Chem **285**(16): 12087-12095.
150. Mora-Montes, H. M., Ponce-Noyola, P., Villagomez-Castro, J. C., Gow, N. A., Flores-Carreón, A. és mtsi. (2009). "Protein glycosylation in *Candida*." Future Microbiol **4**(9): 1167-1183.
151. Mosmann, T. R. és Coffman, R. L. (1989). "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties." Annu Rev Immunol **7**: 145-173.
152. Mouzinho, A., Rosenfeld, C. R., Sanchez, P. J. és Risser, R. (1994). "Revised reference ranges for circulating neutrophils in very-low-birth-weight neonates." Pediatrics **94**(1): 76-82.
153. Nedovic, B., Posteraro, B., Leoncini, E., Ruggeri, A., Amore, R. és mtsi. (2014). "Mannose-binding lectin codon 54 gene polymorphism and vulvovaginal candidiasis: a systematic review and meta-analysis." Biomed Res Int **2014**: 738298.
154. Nemeth, T., Toth, A., Szenzenstein, J., Horvath, P., Nosanchuk, J. D. és mtsi. (2013). "Characterization of virulence properties in the *C. parapsilosis* sensu lato species." PLoS One **8**(7): e68704.
155. Netea, M. G., Brown, G. D., Kullberg, B. J. és 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.
156. Netea, M. G., Gow, N. A., Joosten, L. A., Verschuere, I., Van Der Meer, J. W. és mtsi. (2010). "Variable recognition of *Candida albicans* strains by TLR4 and lectin recognition receptors." Med Mycol **48**(7): 897-903.
157. Netea, M. G., Gow, N. A., Munro, C. A., Bates, S., Collins, C. és mtsi. (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.
158. Netea, M. G., Joosten, L. A., Van Der Meer, J. W., Kullberg, B. J. és Van De Veerdonk, F. L. (2015). "Immune defence against *Candida* fungal infections." Nat Rev Immunol **15**(10): 630-642.
159. Netea, M. G., Suttmüller, R., Hermann, C., Van Der Graaf, C. A., Van Der Meer, J. W. és mtsi. (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.
160. Nguyen, N. H., Suh, S. O. és Blackwell, M. (2007). "Five novel *Candida* species in insect-associated yeast clades isolated from Neuroptera and other insects." Mycologia **99**(6): 842-858.

161. Nobile, C. J., Nett, J. E., Andes, D. R. és Mitchell, A. P. (2006). "Function of *Candida albicans* adhesin Hwp1 in biofilm formation." Eukaryot Cell **5**(10): 1604-1610.
162. Nosek, J., Holesova, Z., Kosa, P., Gacser, A. és Tomaska, L. (2009). "Biology and genetics of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*." Curr Genet **55**(5): 497-509.
163. Pammi, M., Holland, L., Butler, G., Gacser, A. és 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.
164. Patin, E. C., Jones, A. V., Thompson, A., Clement, M., Liao, C. T. és mtsi. (2016). "IL-27 Induced by Select *Candida* spp. via TLR7/NOD2 Signaling and IFN-beta Production Inhibits Fungal Clearance." J Immunol **197**(1): 208-221.
165. Pereira, E., Figueira, C., Aguiar, N., Vasconcelos, R., Vasconcelos, S. és mtsi. (2013). "Microbiological and mycological beach sand quality in a volcanic environment: Madeira archipelago, Portugal." Sci Total Environ **461-462**: 469-479.
166. Perez-Garcia, L. A., Csonka, K., Flores-Carreón, A., Estrada-Mata, E., Mellado-Mojica, E. és mtsi. (2016). "Role of Protein Glycosylation in *Candida parapsilosis* Cell Wall Integrity and Host Interaction." Front Microbiol **7**: 306.
167. Pfaller, M. A., Andes, D. R., Diekema, D. J., Horn, D. L., Reboli, A. C. és mtsi. (2014). "Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-albicans species of *Candida* in 2,496 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) registry 2004-2008." PLoS One **9**(7): e101510.
168. Pfaller, M. A. és Diekema, D. J. (2007). "Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem." Clin Microbiol Rev **20**(1): 133-163.
169. Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Gibbs, D. L., Newell, V. A., Nagy, E. és mtsi. (2008). "*Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005." J Clin Microbiol **46**(2): 515-521.
170. Plato, A., Willment, J. A. és 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.
171. Pope, L. M., Cole, G. T., Guentzel, M. N. és Berry, L. J. (1979). "Systemic and gastrointestinal candidiasis of infant mice after intragastric challenge." Infect Immun **25**(2): 702-707.
172. Prysacz, L. P., Nemeth, T., Gacser, A. és Gabaldon, T. (2013). "Unexpected genomic variability in clinical and environmental strains of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*." Genome Biol Evol **5**(12): 2382-2392.
173. Pukkila-Worley, R., Feinbaum, R. L., Mcewan, D. L., Conery, A. L. és Ausubel, F. M. (2014). "The evolutionarily conserved mediator subunit MDT-15/MED15 links protective innate immune responses and xenobiotic detoxification." PLoS Pathog **10**(5): e1004143.
174. Qian, Q., Jutila, M. A., Van Rooijen, N. és Cutler, J. E. (1994). "Elimination of mouse splenic macrophages correlates with increased susceptibility to experimental disseminated candidiasis." J Immunol **152**(10): 5000-5008.
175. Qin, Y., Zhang, L., Xu, Z., Zhang, J., Jiang, Y. Y. és mtsi. (2016). "Innate immune cell response upon *Candida albicans* infection." Virulence **7**(5): 512-526.
176. Quindós, G. (2014). "Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face." Rev Iberoam Micol **31**(1): 42-48.

177. Quintin, J., Asmar, J., Matskevich, A. A., Lafarge, M. C. és Ferrandon, D. (2013). "The *Drosophila* Toll pathway controls but does not clear *Candida glabrata* infections." J Immunol **190**(6): 2818-2827.
178. Quintin, J., Cheng, S. C., Van Der Meer, J. W. és Netea, M. G. (2014). "Innate immune memory: towards a better understanding of host defense mechanisms." Curr Opin Immunol **29**: 1-7.
179. Quintin, J., Saeed, S., Martens, J. H. A., Giamarellos-Bourboulis, E. J., Ifrim, D. C. és mtsi. (2012). "*Candida albicans* infection affords protection against reinfection via functional reprogramming of monocytes." Cell Host Microbe **12**(2): 223-232.
180. Ramirez-Ortiz, Z. G. és Means, T. K. (2012). "The role of dendritic cells in the innate recognition of pathogenic fungi (*A. fumigatus*, *C. neoformans* and *C. albicans*)." Virulence **3**(7): 635-646.
181. Reales-Calderon, J. A., Aguilera-Montilla, N., Corbi, A. L., Molero, G. és Gil, C. (2014). "Proteomic characterization of human proinflammatory M1 and anti-inflammatory M2 macrophages and their response to *Candida albicans*." Proteomics **14**(12): 1503-1518.
182. Reid, D. M., Montoya, M., Taylor, P. R., Borrow, P., Gordon, S. és mtsi. (2004). "Expression of the beta-glucan receptor, Dectin-1, on murine leukocytes in situ correlates with its function in pathogen recognition and reveals potential roles in leukocyte interactions." J Leukoc Biol **76**(1): 86-94.
183. Renga, G., Moretti, S., Oikonomou, V., Borghi, M., Zelante, T. és mtsi. (2018). "IL-9 and Mast Cells Are Key Players of *Candida albicans* Commensalism and Pathogenesis in the Gut." Cell Rep **23**(6): 1767-1778.
184. Romani, L. (2011). "Immunity to fungal infections." Nat Rev Immunol **11**(4): 275-288.
185. Rubin-Bejerano, I., Abeijon, C., Magnelli, P., Grisafi, P. és Fink, G. R. (2007). "Phagocytosis by human neutrophils is stimulated by a unique fungal cell wall component." Cell Host Microbe **2**(1): 55-67.
186. Saiman, L., Ludington, E., Dawson, J. D., Patterson, J. E., Rangel-Frausto, S. és mtsi. (2001). "Risk factors for *Candida* species colonization of neonatal intensive care unit patients." Pediatr Infect Dis J **20**(12): 1119-1124.
187. Salazar, F. és Brown, G. D. (2018). "Antifungal Innate Immunity: A Perspective from the Last 10 Years." J Innate Immun: 1-25.
188. Sandovsky-Losica, H., Barr-Nea, L. és Segal, E. (1992). "Fatal systemic candidiasis of gastrointestinal origin: an experimental model in mice compromised by anti-cancer treatment." J Med Vet Mycol **30**(3): 219-231.
189. Sato, M., Tsuchiya, H., Akagiri, M., Fujiwara, S., Fujii, T. és mtsi. (1994). "Growth inhibitory properties of chalcones to *Candida*." Letters in Applied Microbiology **18**(1): 53-55.
190. Segal, E. és Frenkel, M. (2018). "Experimental in Vivo Models of Candidiasis." J Fungi (Basel) **4**(1).
191. Semis, R., Mendlovic, S., Polacheck, I. és Segal, E. (2011). "Activity of an Intralipid formulation of nystatin in murine systemic candidiasis." Int J Antimicrob Agents **38**(4): 336-340.
192. Shibasaki, S., Ishii, Y., Kubo, T., Kogure, M., Asai, S. és mtsi. (1991). "Effect of 9-amino-2,3,5,6,7,8-hexahydro-1H-cyclopenta-(b)-quinoline monohydrate hydrochloride (NIK-247) on cholinergic enzyme activity in rats." Pharmacol Biochem Behav **39**(2): 499-502.

193. Shibata, N., Ikuta, K., Imai, T., Satoh, Y., Satoh, R. és mtsi. (1995). "Existence of branched side chains in the cell wall mannan of pathogenic yeast, *Candida albicans*. Structure-antigenicity relationship between the cell wall mannans of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*." *J Biol Chem* **270**(3): 1113-1122.
194. Shibata, N., Suzuki, A., Kobayashi, H. és Okawa, Y. (2007). "Chemical structure of the cell-wall mannan of *Candida albicans* serotype A and its difference in yeast and hyphal forms." *Biochem J* **404**(3): 365-372.
195. Silva, R. F. (2010). "Chapter 8: Fungal infections in immunocompromised patients." *J Bras Pneumol* **36**(1): 142-147.
196. Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D. W. és mtsi. (2012). "*Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance." *FEMS Microbiol Rev* **36**(2): 288-305.
197. Slack, E. C., Robinson, M. J., Hernanz-Falcon, P., Brown, G. D., Williams, D. L. és mtsi. (2007). "Syk-dependent ERK activation regulates IL-2 and IL-10 production by DC stimulated with zymosan." *Eur J Immunol* **37**(6): 1600-1612.
198. Smeekeens, S. P., Van De Veerdonk, F. L., Kullberg, B. J. és Netea, M. G. (2013). "Genetic susceptibility to *Candida* infections." *EMBO Mol Med* **5**(6): 805-813.
199. Snarr, B. D., Qureshi, S. T. és Sheppard, D. C. (2017). "Immune Recognition of Fungal Polysaccharides." *J Fungi (Basel)* **3**(3).
200. Stuart, L. M. és Ezekowitz, R. A. (2008). "Phagocytosis and comparative innate immunity: learning on the fly." *Nat Rev Immunol* **8**(2): 131-141.
201. Stumhofer, J. S. és Hunter, C. A. (2008). "Advances in understanding the anti-inflammatory properties of IL-27." *Immunol Lett* **117**(2): 123-130.
202. Suram, S., Brown, G. D., Ghosh, M., Gordon, S., Loper, R. és mtsi. (2006). "Regulation of cytosolic phospholipase A2 activation and cyclooxygenase 2 expression in macrophages by the beta-glucan receptor." *J Biol Chem* **281**(9): 5506-5514.
203. Tam, J. M., Mansour, M. K., Khan, N. S., Seward, M., Puranam, S. és mtsi. (2014). "Dectin-1-dependent LC3 recruitment to phagosomes enhances fungicidal activity in macrophages." *J Infect Dis* **210**(11): 1844-1854.
204. Tang, J., Lin, G., Langdon, W. Y., Tao, L. és Zhang, J. (2018). "Regulation of C-Type Lectin Receptor-Mediated Antifungal Immunity." *Front Immunol* **9**: 123.
205. Tauszig-Delamasure, S., Bilak, H., Capovilla, M., Hoffmann, J. A. és Imler, J. L. (2002). "*Drosophila* MyD88 is required for the response to fungal and Gram-positive bacterial infections." *Nat Immunol* **3**(1): 91-97.
206. Tavanti, A., Davidson, A. D., Gow, N. A., Maiden, M. C. és 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.
207. Taylor, P. R., Brown, G. D., Reid, D. M., Willment, J. A., Martinez-Pomares, L. és mtsi. (2002). "The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages." *J Immunol* **169**(7): 3876-3882.
208. Taylor, P. R., Tsoni, S. V., Willment, J. A., Dennehy, K. M., Rosas, M. és mtsi. (2007). "Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection." *Nat Immunol* **8**(1): 31-38.
209. Thompson, D. S., Carlisle, P. L. és Kadosh, D. (2011). "Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species." *Eukaryot Cell* **10**(9): 1173-1182.

210. Timpel, C., Strahl-Bolsinger, S., Ziegelbauer, K. és Ernst, J. F. (1998). "Multiple functions of Pmt1p-mediated protein O-mannosylation in the fungal pathogen *Candida albicans*." J Biol Chem **273**(33): 20837-20846.
211. Tóth, A. (2016). "Az opportunista humán patogén *Candida parapsilosis* élesztőgomba elleni természetes és adaptív immunválasz vizsgálata".
212. Toth, A., Csonka, K., Jacobs, C., Vagvolgyi, C., Nosanchuk, J. D. és mtsi. (2013). "*Candida albicans* and *Candida parapsilosis* induce different T-cell responses in human peripheral blood mononuclear cells." J Infect Dis **208**(4): 690-698.
213. Toth, R., Alonso, M. F., Bain, J. M., Vagvolgyi, C., Erwig, L. P. és mtsi. (2015). "Different *Candida parapsilosis* clinical isolates and lipase deficient strain trigger an altered cellular immune response." Front Microbiol **6**: 1102.
214. Toth, R., Toth, A., Vagvolgyi, C. és Gacser, A. (2017). "*Candida parapsilosis* Secreted Lipase as an Important Virulence Factor." Curr Protein Pept Sci **18**(10): 1043-1049.
215. Trevino-Rangel Rde, J., Gonzalez, G. M., Martinez-Castilla, A. M., Garcia-Juarez, J., Robledo-Leal, E. R. és mtsi. (2015). "*Candida parapsilosis* complex induces local inflammatory cytokines in immunocompetent mice." Med Mycol **53**(6): 612-621.
216. Trofa, D., Gacser, A. és Nosanchuk, J. D. (2008). "*Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen." Clin Microbiol Rev **21**(4): 606-625.
217. Trofa, D., Soghier, L., Long, C., Nosanchuk, J. D., Gacser, A. és mtsi. (2011). "A rat model of neonatal candidiasis demonstrates the importance of lipases as virulence factors for *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*." Mycopathologia **172**(3): 169-178.
218. Tsai, N. Y., Laforce-Nesbitt, S. S., Tucker, R. és Bliss, J. M. (2011). "A murine model for disseminated candidiasis in neonates." Pediatr Res **69**(3): 189-193.
219. Ueno, K., Okawara, A., Yamagoe, S., Naka, T., Umeyama, T. és mtsi. (2013). "The mannan of *Candida albicans* lacking beta-1,2-linked oligomannosides increases the production of inflammatory cytokines by dendritic cells." Med Mycol **51**(4): 385-395.
220. Valanne, S., Wang, J. H. és Ramet, M. (2011). "The *Drosophila* Toll signaling pathway." J Immunol **186**(2): 649-656.
221. Vallabhaneni, S., Mody, R. K., Walker, T. és Chiller, T. (2016). "The Global Burden of Fungal Diseases." Infect Dis Clin North Am **30**(1): 1-11.
222. Van De Veerdonk, F. L., Joosten, L. A., Devesa, I., Mora-Montes, H. M., Kanneganti, T. D. és mtsi. (2009). "Bypassing pathogen-induced inflammasome activation for the regulation of interleukin-1beta production by the fungal pathogen *Candida albicans*." J Infect Dis **199**(7): 1087-1096.
223. Van De Veerdonk, F. L. és Netea, M. G. (2010). "T-cell Subsets and Antifungal Host Defenses." Curr Fungal Infect Rep **4**(4): 238-243.
224. Vautier, S., Drummond, R. A., Redelinguys, P., Murray, G. I., Maccallum, D. M. és mtsi. (2012). "Dectin-1 is not required for controlling *Candida albicans* colonization of the gastrointestinal tract." Infect Immun **80**(12): 4216-4222.
225. Vazquez-Torres, A., Jones-Carson, J., Wagner, R. D., Warner, T. és Balish, E. (1999). "Early resistance of interleukin-10 knockout mice to acute systemic candidiasis." Infect Immun **67**(2): 670-674.
226. Villamon, E., Gozalbo, D., Roig, P., O'connor, J. E., Fradelizi, D. és mtsi. (2004). "Toll-like receptor-2 is essential in murine defenses against *Candida albicans* infections." Microbes Infect **6**(1): 1-7.

227. Wagener, J., Malireddi, R. K., Lenardon, M. D., Koberle, M., Vautier, S. és mtsi. (2014). "Fungal chitin dampens inflammation through IL-10 induction mediated by NOD2 and TLR9 activation." PLoS Pathog **10**(4): e1004050.
228. Walsh, T. J. és Gamaletsou, M. N. (2013). "Treatment of fungal disease in the setting of neutropenia." Hematology Am Soc Hematol Educ Program **2013**: 423-427.
229. Wells, C. A., Salvage-Jones, J. A., Li, X., Hitchens, K., Butcher, S. és mtsi. (2008). "The macrophage-inducible C-type lectin, mincle, is an essential component of the innate immune response to *Candida albicans*." J Immunol **180**(11): 7404-7413.
230. West, L., Lowman, D. W., Mora-Montes, H. M., Grubb, S., Murdoch, C. és mtsi. (2013). "Differential virulence of *Candida glabrata* glycosylation mutants." J Biol Chem **288**(30): 22006-22018.
231. Williams, D. W., Jordan, R. P., Wei, X. Q., Alves, C. T., Wise, M. P. és mtsi. (2013). "Interactions of *Candida albicans* with host epithelial surfaces." J Oral Microbiol **5**.
232. Wu, S. Y., Huang, J. H., Chen, W. Y., Chan, Y. C., Lin, C. H. és mtsi. (2017). "Cell Intrinsic Galectin-3 Attenuates Neutrophil ROS-Dependent Killing of *Candida* by Modulating CR3 Downstream Syk Activation." Front Immunol **8**: 48.
233. Wu, Y., Tan, Z., Liu, Z., Xia, D. és Li, J. (2006). "Local IL-23 expression in murine vaginal candidiasis and its relationship with infection and immune status." J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci **26**(2): 245-247.
234. Yapar, N. (2014). "Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis." Ther Clin Risk Manag **10**: 95-105.
235. Zaoutis, T. E., Heydon, K., Localio, R., Walsh, T. J. és Feudtner, C. (2007). "Outcomes attributable to neonatal candidiasis." Clin Infect Dis **44**(9): 1187-1193.
236. Zelensky, A. N. és Gready, J. E. (2005). "The C-type lectin-like domain superfamily." FEBS J **272**(24): 6179-6217.
237. Zhang, S. Q., Zou, Z., Shen, H., Shen, S. S., Miao, Q. és mtsi. (2016). "Mnn10 Maintains Pathogenicity in *Candida albicans* by Extending alpha-1,6-Mannose Backbone to Evade Host Dectin-1 Mediated Antifungal Immunity." PLoS Pathog **12**(5): e1005617.
238. Zhu, L. L., Zhao, X. Q., Jiang, C., You, Y., Chen, X. P. és mtsi. (2013). "C-type lectin receptors Dectin-3 and Dectin-2 form a heterodimeric pattern-recognition receptor for host defense against fungal infection." Immunity **39**(2): 324-334.

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, Prof. Dr. Gácsér Attilának, amiért az elmúlt években irányította, támogatta és a tudomány iránti szeretetével motiválta munkámat. Szeretném megköszönni, hogy az évek során az általa létrehozott, nemzetközileg is elismert, magas színvonalú kutatócsoport tagja lehettem.

Köszönettel tartozom a témavezetőm által irányított kutatócsoport minden volt és jelenlegi tagjának: Dr. Németh Tibornak, Dr. Horváth Péternek, Dr. Grózer Zsuzsannának, Szenzenstein Juditnak, Dr. Tóth Renátának, Papp Csabának, Zajta Eriknek, Dr. Luis Antonio Pérez García-nak, Tanmoy Chakraborty-nak, Dhirendra N. Singh-nek, Vadovics Máténak, Pál Sárának, Bohner Flórának, Takács Tamásnak, Drabbant Gergőnek, Kocsis Katicának, Halmos Emesének, Csikós Máténak, Horváth Mártonnak és Tasi Zsoltnak, amiért egy igazán remek, összetartó és lelkes csapat része lehettem. Továbbá szeretném megköszönni Dr. Hamari Zsuzsannának, Bokor Eszternek és Ámon Juditnak is a labor kellemes légkörét.

Kollégáim közül külön is szeretném megköszönni a segítségét Dr. Tóth Adélnek, aki különösen PhD munkám kezdetén látott el rengeteg elméleti és szakmai tanáccsal; Dr. Németh Tibornak, aki rengeteg gyakorlati tanáccsal látott el; Papp Csabának, a laboros munka vidám hangulatáért; Dr. Tóth Renátának, aki a kísérletek során nyújtott segítő kezet, illetve Szenzenstein Juditnak, aki számtalan alkalommal segített technikai kérdésekben az évek folyamán.

Külön köszönettel tartozom Zajta Eriknek a szakmai tapasztalat- és eszmecserék mellett a barátságáért is.

Szeretném megköszönni Dr. Vizler Csabának és Dr. Marton Annamáriának az egérkísérletek során nyújtott gyakorlati segítségüket.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Ilse Denise Jacobsen-nek, amiért három hónapot csoportjában tölthettem Németországban, a Hans Knöll Institute-ban. Szintén köszönöm Dr. Bianca Schulze-nak a Dectin-1 egérkísérletek során nyújtott szakmai segítséget.

Hálával tartozom Dr. Sinka Ritának a *D. melanogaster* kísérletek során nyújtott rengeteg tanácsért, útmutatásért és segítségért. Szeretném megköszönni Bodroginé Török

Anikónak és Hajdúné Tóth Melindának a Genetika Tanszéken végzett kísérletekben nyújtott segítséget.

Köszönöm Dr. Kurucz Évának, hogy biztosította a kísérleteinkhez a *l(3)mbn-1/TM6Tb D. melanogaster* törzset.

Köszönetet szeretnék mondani továbbá Lele Máriának és Deákné Kulcsár Melindának a sok technikai segítségért; Dr. Palágyi Andrásnénak, Kreisch Istvánnének, Szőnyi Jánosnének és Lengyel Boglárkának a munkámmal kapcsolatos gazdasági ügyek intézéséért; valamint a 301. labor és a Mikrobiológiai Tanszék valamennyi dolgozójának segítőkészségükért.

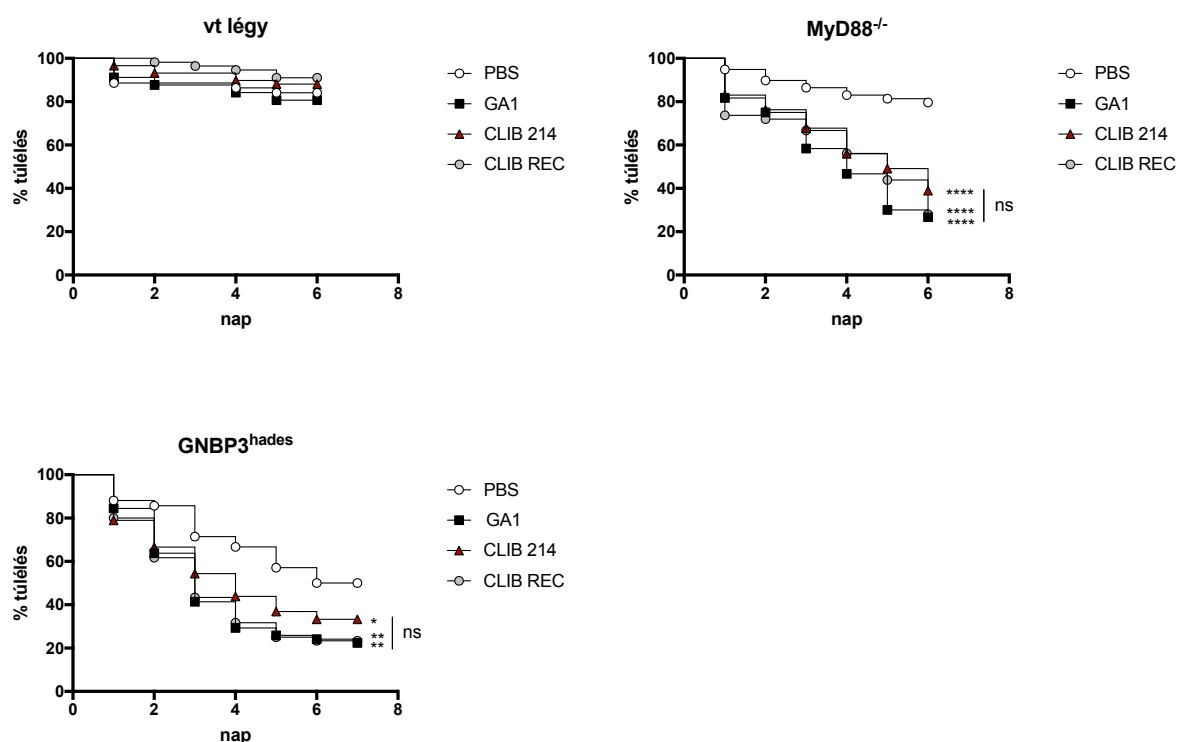
A legtöbb köszönet és hála a családomat, szüleimet és testvéreimet illeti, amiért mindvégig mellettem álltak és szeretetteljesen támogattak. Külön hálával tartozom szüleimnek, akik áldozatos munkájukkal lehetővé tették, hogy tanulmányaimat folytathassam az általam választott területen, és szeretettel biztattak.

Jelen kutatás megvalósítása a GINOP-2.3.2.-15-2016-00015 és a GINOP-2.3.3- 15-2016-00006 azonosító számú kiemelt projektek keretében zajlott.

11. MELLÉKLETEK

11.1. A *D. melanogaster* érzékenységének vizsgálata a *C. parapsilosis* GA1, a *C. parapsilosis* CLIB 214 és a *C. parapsilosis* CPRI fertőzést követően

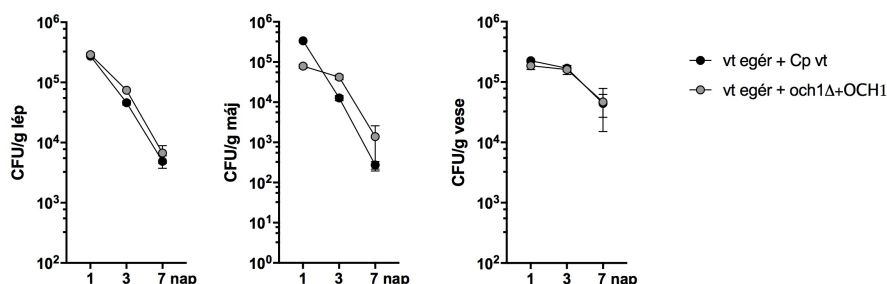
Kísérleteink során nem detektáltunk különbséget a *C. parapsilosis* GA1, a *C. parapsilosis* CLIB 214 és a *C. parapsilosis* CPRI fertőzött *MyD88*^{-/-} és *GNBP3*^{hades} legyek túlélésében összehasonlítva a három törzzsel történt fertőzést.



29. ábra. A *D. melanogaster* túlélésének vizsgálata *C. parapsilosis* törzsekkel történt fertőzést követően. A vt, *MyD88*^{-/-} és *GNBP3*^{-/-} legyek túlélését a *C. parapsilosis* törzsekkel (2×10^7 sejt/ml) történt fertőzést követően 6 napig monitoroztuk. Az ábra egy kísérlet eredményeit foglalja össze százalékos arányban megadva. Feltüntetett adatok: PBS, PBS-sel injektált kontroll csoport; GA1, *C. parapsilosis* GA1; CLIB 214, *C. parapsilosis* CLIB 214; CLIB REC, *C. parapsilosis* CPRI. Szignifikancia mértéke: **** $p < 0,0001$; ** $p < 0,0029$; * $p < 0,0332$; ns, nem szignifikáns (Mantel-Cox teszt).

11.2. A 12-15 hetes C57BL/6 egerek érzékenységének összehasonlítása a *C. parapsilosis* CLIB 214 és a *C. parapsilosis och1Δ+OCH1* fertőzésre

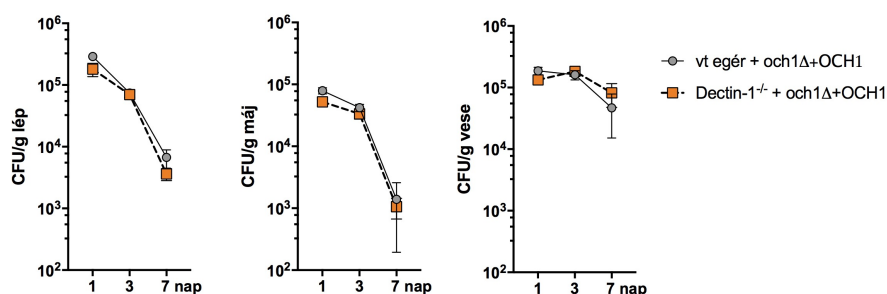
A kísérlet során nem detektáltunk különbséget a lép és a vese kolonizáltságában a *Cp* vt és a *C. parapsilosis och1Δ+OCH1* reintegrált törzzsel fertőzött vad típusú egerek között, viszont eltérést figyeltünk meg a máj kolonizáltságában a két törzzsel történt fertőzés során (30. ábra).



30. ábra. A C57BL/6 vad típusú egerek szervkolonizáltságának összehasonlítása. Fertőzés dózisa: 2×10^7 sejt/100 μ l (n=5/csoport a R.I. fertőzés esetében, n=15 a *Cp* vt fertőzés esetében). Feltüntetett adatok: átlag \pm standard hiba. *Cp* vt; vad típusú *C. parapsilosis* CLIB 214, *och1Δ+OCH1*; *C. parapsilosis och1Δ+OCH1*.

11.3. A 14-15 hetes C57BL/6 és Dectin-1^{-/-} egerek érzékenységének összehasonlítása a *C. parapsilosis och1Δ+OCH1* fertőzést követően

Kísérleteink során nem detektáltunk különbséget a vt és Dectin-1^{-/-} egerek érzékenységében a *C. parapsilosis och1Δ+OCH1* fertőzést követően (31. ábra).



31. ábra. A C57BL/6 vad típusú és Dectin-1^{-/-} egerek szervkolonizáltságának összehasonlítása. Fertőzés dózisa: 2×10^7 sejt/100 μ l (n=5/csoport). Feltüntetett adatok: átlag \pm standard hiba. *Cp* vt; vad típusú *C. parapsilosis* CLIB 214, *och1Δ+OCH1*, *C. parapsilosis och1Δ+OCH1*.

12. TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

MTMT azonosító: 10036990

Tézis alapjául szolgáló közlemények:

Csonka, K, Vadovics, M, Marton, A, Vagvolgyi, C, Zajta, E, Toth, A, Toth, R, Vizler, C, Tiszlavicz, L, Mora-Montes, HM, Gacser, A (2017). "Investigation of OCH1 in the virulence of *Candida parapsilosis* using a new neonatal mouse model." *Frontiers in Microbiology* 8: 1197. *IF*: 4,019

Pérez-García, LA, **Csonka, K**, Flores-Carreón, A, Estrada-Mata, E, Mellado-Mojica, E, Németh, T, López-Ramírez, LA, Toth, R, López, MG, Vizler, C, Marton, A, Tóth, A, Nosanchuk, JD, Gácser, A, Mora-Montes, HM (2016). "Role of protein glycosylation in *Candida parapsilosis* cell wall integrity and host interaction" *Front. Microbiol.* 8(7):306. *IF*: 4,076

További referált folyóiratban megjelent közlemények:

Toth, A, Zajta, E, **Csonka, K**, Vágvolgyi, C, Netea, MG, Gácser, A (2017) "Specific pathways mediating inflammasome activation by *Candida parapsilosis*." *Sci. Rep.* 22(7):43129. *IF*: 4,122

Navarro-Arias, MJ, Defosse, TA, Dementhon, K, **Csonka, K**, Mellado-Mojica, E, Dias Valério, A, González-Hernández, RJ, Courdavault, V, Clastre, M, Hernández, NV, Pérez-García, LA, Singh, DK, Vizler, C, Gácser, A, Almeida, RS, Noël, T, López, MG, Papon, N, Mora-Montes, H (2016). "Disruption of protein mannosylation affects *Candida guilliermondii* cell wall, immune sensing, and virulence." *Front. Microbiol.* 2(7):1951. *IF*: 4,076

Estrada-Mata, E, Navarro-Arias, MJ, Pérez-García, LA, Mellado-Mojica, E, López, MG, **Csonka, K**, Gacser, A, Mora-Montes, HM (2016). "Members of the *Candida parapsilosis* Complex and *Candida albicans* are Differentially Recognized by Human Peripheral Blood Mononuclear Cells." *Front Microbiol.* 13;6:1527. *IF*: 4,076

Toth, A, Nemeth, T, **Csonka, K**, Horvath, P, Vagvolgyi, C, Vizler, C, Nosanchuk, J D, Gacser, A (2014). "Secreted *Candida parapsilosis* lipase modulates the immune response of primary human macrophages." *Virulence* 5(4): 555-562. *IF*: 3,319

Toth, A, **Csonka, K**, Jacobs, C, Vagvolgyi, C, Nosanchuk, J D, Netea, M G, Gacser, A (2013). "*Candida albicans* and *Candida parapsilosis* induce different T-cell responses in human peripheral blood mononuclear cells." *J Infect Dis* 208(4): 690-698. *IF*: 5,778

Összesített IF: **29,466**