

***CURVULARIA LUNATA* INTERAKCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA A
TERMÉSZETES IMMUNVÁLASZ SEJTJEIVEL**

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

TÓTH ESZTER JUDIT

TÉMAVEZETŐK

DR. PAPP TAMÁS, EGYETEMI DOCENS

PROF. DR. VÁGVÖLGYI CSABA, EGYETEMI TANÁR

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR

MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK

2019

Tartalomjegyzék

1	Rövidítések jegyzéke.....	5
2	Bevezetés.....	7
3	Irodalmi áttekintés.....	8
3.1	A <i>Curvularia</i> nemzetség általános jellemzése.....	8
3.1	A felbukkanó gombafertőzések jelentősége	9
3.2	A <i>Curvularia</i> fajok által okozott fertőzések általános jellemzése és epidemiológiája	11
3.2.1	Felszíni fertőzések.....	11
3.2.2	Légutakat érintő megbetegedések	11
3.2.3	Központi idegrendszeri megbetegedések	12
3.2.4	Disszeminált és invazív fertőzések	12
3.3	A <i>Curvularia</i> fajok patogenitása.....	13
3.4	A <i>Curvularia lunata</i> lehetséges virulencia faktorai.....	13
3.4.1	A melanin szerepe a patogenezisben.....	14
3.4.2	A haloperoxidáz enzimek jellemzése és szerepe.....	15
3.5	Az <i>A. fumigatus</i> általános jellemzése és az általa okozott megbetegedések	18
3.6	A gombák elleni természetes immunválasz – effektor sejtek.....	18
3.6.1	Monociták.....	19
3.6.1.1	A monociták szerepe a patogén fonalas gombák elleni védekezésben	21
3.6.2	Makrofágok	21
3.6.2.1	A makrofágok szerepe a patogén fonalas gombák elleni védekezésben	22
3.6.3	Neutrofil granulociták	23
3.6.3.1	A neutrofil granulociták szerepe a patogén fonalas gombák elleni védekezésben	26
3.7	A THP-1 sejtvonal – a monocita-makrofág sejtek modellrendszere	28
3.8	A neutrofil granulociták modellrendszerei	29
4	Célkitűzések	30
5	Anyagok és módszerek.....	31
5.1	Az alkalmazott gombatörzsek: tenyésztés, spóraszuszpenzió készítése.....	31

5.2	Alkalmazott sejt kultúrák.....	31
5.3	Alkalmazott tápközegek, oldatok, reagensek és pufferek.....	31
5.4	Gombatorzsek tenyésztése, konídium-szuszpenzió készítése	32
5.4.1	Tenyésztés szilárd táptalajon.....	32
5.4.2	Tenyésztés folyékony tápoldatban, H ₂ O ₂ indukció.....	33
5.5	Sejtvonalak tenyésztése, primer sejtek izolálása	33
5.5.1	THP-1 sejtvonal tenyésztése és differenciáltatása.....	33
5.5.2	Primer neutrofil granulociták izolálása	33
5.6	Kísérleti módszerek	34
5.6.1	Humán szérum izolálás	34
5.6.2	Fertőzési körülmények	34
5.6.3	Fagocitózis vizsgálat	35
5.6.4	Enzimhez kapcsolt immunoszorbens vizsgálatok (ELISA)	35
5.6.5	Gomba életképesség meghatározás	36
5.6.6	Mieloperoxidáz (MPO) aktivitás mérése	37
5.6.7	Reaktív oxigéngyökök (ROS) mérése.....	37
5.6.8	NET képzés vizsgálata	37
5.6.9	Az extracelluláris pH meghatározása	38
5.6.10	A melanin tisztítása és vizsgálata.....	38
5.6.11	RNS izolálás, cDNS szintézis és kvantitatív valós idejű reverz transzkripció (qRT) PCR analízis.....	39
5.7	Statisztikai analízis	41
5.8	<i>In silico</i> szekvencia elemzés	41
6	Eredmények és értékelésük	42
6.1	Monociták válasza <i>Curvularia</i> izolátumokra	42
6.1.1	A THP-1 sejtek <i>C. lunata</i> konídiumokra adott válasza.....	42
6.1.2	A THP-1 sejtek <i>Curvularia</i> hifákra adott válasza	47
6.2	Makrofágok válasza <i>Curvularia</i> izolátumokra	55
6.3	Neutrofil granulociták válasza <i>Curvularia lunata</i> -ra.....	57
6.3.1	A melanin, mint antioxidáns jelenléte	64
6.3.2	Az extracelluláris környezet savasodása	64

7	Összefoglalás.....	66
8	Summary	69
9	Irodalomjegyzék.....	72
10	Köszönetnyilvánítás	86
11	Mellékletek.....	87

1 Rövidítések jegyzéke

$\Delta^1\text{O}_2$	szinglet oxigén
BSA	marha szérum albumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CARD	caspase-recruitment domain
CD	differenciációs klaszter (<i>cluster of differentiation</i>)
CGD	krónikus granulomatózus betegség (<i>chronic granulomatous disease</i>)
CLR	C-típusú lektin receptor
CPO	<i>C. inaequalis</i> nem-hem kloroperoxidázát
CR	komplement receptor (complement receptor)
DHN	dihidroxinaftalén
DMSO	dimetil-szulfoxid
DOPA	o-dihidroxifenilalanin
ELISA	enzimkött immunoszorbens próba (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
GPCR	G-protein kapcsolt receptor
H_2O_2	hidrogén peroxid
HLADRA	HLA II osztályú hisztokompatibilitási antigén, DR alfa lánc
HOCl	hipoklórossav
HPO	haloperoxidáz
IL	interleukin
LPS	lipopoliszacharid
MHC	fő hisztokompatibilitási komplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
MPO	mieloperoxidáz
MTT	3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólium-bromid
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NET	neutrofil extracelluláris csapda (<i>neutrophil extracellular trap</i>)
NF κ B	nukleáris faktor κ B
NLR	NOD-like receptor (NOD-szerű receptor)
NLRC3	NLR család CARD domént tartalmazó fehérje 3 (<i>NLR family CARD domain-containing protein 3</i>)
NOD	nukleotid oligomerizációs domén

O ₂ ⁻	szuperoxid gyök
OD	optikai denzitás
PAP2	2-es típusú foszfatidil-sav foszfatáz
PBS	foszfát pufferelt sóoldat (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	polimeráz láncreakció (<i>polimerase chain reaction</i>)
PMA	forbol-mirisztíl-acetát
PTFE	poli(tetrafluoroetilén)
qRT-PCR	kvantitatív valós-idejű polimeráz láncreakció
ROS	reaktív oxigén fajták (<i>reactive oxygen species</i>)
RPMI 1640	sejttenyésztése alkalmas komplex tápoldat elnevezése (<i>Roswell Park Memorial Institute</i>)
Th	segítő T-sejt (<i>T helper</i>)
THP-1	humán monocita-szerű sejtvonal elnevezése (<i>Tohoku Hospital Pediatrics-1</i>)
TLR	Toll-szerű receptor (<i>Toll-like receptor</i>)
TNF-α	tumor nekrozis faktor α

2 Bevezetés

Az opportunistá patogén gombák által okozott fertőzések száma évről évre nő, az *Aspergillus* nemzetség tagjai mellett új fajok is felbukkannak, amely fajok által okozott megbetegedések kezelése megfelelő szakirodalmi adatok és tapasztalat hiányában nehézkes, gyakran csak műtéti úton lehetséges. Az immunszuppresszált betegek különösen kitéttek az opportunistá patogének általi fertőzéseknek, amelyek halálozási aránya ezekben az esetekben igen magas. Az immunszuppresszió számos modern orvostudományi eljárásnál nélkülözhetetlen (pl. transzplantáció, rákos megbetegedések), ezért e területek fejlődésével a társadalom veszélyeztetett rétege is bővül.

A fent említetteknek megfelelően, az utóbbi években megnőtt a nem-*Aspergillus* opportunistá humánpatogén fonalas gombák vizsgálatával foglalkozó tanulmányok száma. Ezen csoportba tartoznak a *Curvularia* fajok, amelyek egyéb melanizált gombákhoz hasonlóan úgynevezett feohifomikózisok kialakítására képesek. A betegség egészséges emberekben főképp lokális fertőzésként jelenik meg, azonban immunszuppresszált betegekben invazív szisztémás mikózis is kialakulhat.

A *Curvularia* fajok által okozott megbetegedések immunológiai hátteréről, a felismerési mechanizmusokról, a kiváltott immunválaszról kevés információ áll rendelkezésünkre, ezért jelen dolgozat célja a *Curvularia* izolátumokkal, elsősorban a *C. lunata*-val szembeni immunválasz vizsgálata. A dolgozatban három, a veleszületett immunitáshoz tartozó sejtcsoport, a monociták, a makrofágok és a neutrofil granulociták interakcióját vizsgáltuk a gombatorzsekkal és összevetettük azt az *A. fumigatus* esetében tapasztalt adatokkal.

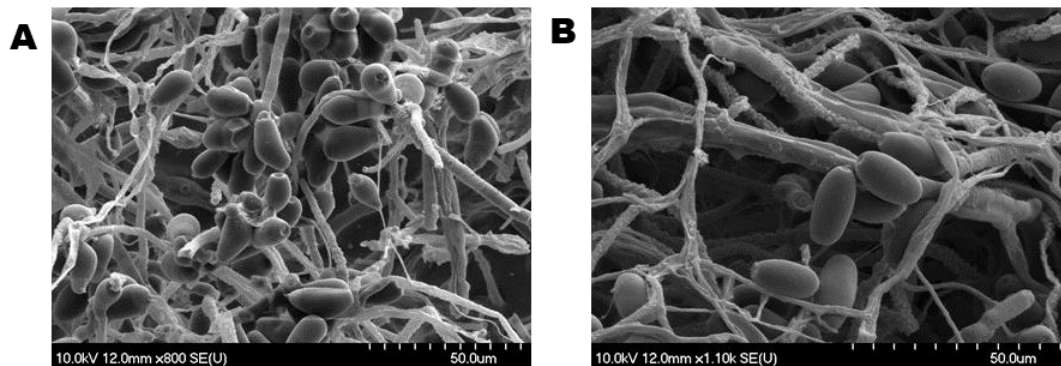
A *Curvularia* fajok erősen melanizált konídiumokkal és hifákkal rendelkeznek. A melanin virulenciában betöltött szerepét más fajok esetében már vizsgálták, azonban az eredmények alapján a pigment fajonként eltérő mértékben befolyásolja a megbetegítő képességet és a gazdaszervezetben belüli túlélést. Kísérleteink során a melanin-bioszintézis gátlásával modelleztük a melanin fagocitózist és monocita érést befolyásoló szerepét.

3 Irodalmi áttekintés

3.1 A *Curvularia* nemzetség általános jellemzése

A *Curvularia* nemzetség a Pleosporaceae családba (Ascomycota, Pleosporales) sorolható, melynek nevezéktana és taxonómiája a közeli rokon *Bipolaris* nemzetséggel együtt zavaros és gyakran változott. 1999-ben Berbee és munkatársai (1999) ITS (a magi riboszómális RNS kódoló régió köztes átíródó szekvenciája), 5.8S rRNS és *gpd* (glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz) szekvenciák alapján a teleomorf *Cochliobolus* nemzetség anamorf alakjait két csoportba osztotta. Eszerint az 1. csoport tartalmazta az erősen növénypatogén fajokat, melyek jellegzetes szaporító képlete a nagy, „kenu” alakú konídium. Ezen fajok mindegyike a *Bipolaris* nemzetségbe tartozott. A 2. csoport genetikailag és morfológiailag is diverzebb volt, a *Bipolaris* és a *Curvularia* nemzetségbe sorolt anamorf fajok egyaránt tartoztak ide. Ezek konídiuma általában rövid, egyenes vagy hajlott. A 2. csoportra már ezen vizsgálat alapján javasolták az egységes *Curvularia* elnevezést. Később Manamgoda és munkatársai (2012) részletesebb molekuláris filogenetikai vizsgálata is ugyanerre az eredményre vezetett. Így jelenleg az 1. csoportra a *Bipolaris*, a 2. csoportra a *Curvularia* nemzetségneveket alkalmazzák. Humánpatogén törzsek csak a 2. csoportban, tehát a *Curvularia* nemzetségben találhatók (da Cunha és mtsi. 2013, Madrid és mtsi. 2014). Ennek ellenére a klinikai feljegyzésekben gyakran még mindig *Bipolaris*-ként azonosítják a fertőzésből származó *Curvularia* izolátumokat.

A *Curvularia* nemzetség jelenleg körülbelül 80 fajt foglal magába. A lassan növeő telepek sötétén pigmentáltak, barna vagy szürkés színűek, lehetnek vattaszerűek vagy lapítottak. A konídiumok szeptáltak, egyenesek vagy hajlottak, utóbbi esetben az egyik sejt megnagyobbodása okozza a jellegzetes görbületet, melyről a nemzetség a nevét is nyerte. Erősen melanizáltak, méretük fajonként eltérő, hosszuk 16-41 μm , szélességük 5-12 μm közötti (1. ábra) (Kusai és mtsi. 2016).



1. ábra: *C. lunata* (A) és *C. hawaiiensis* (B) konídiumok és hifák pásztázó elektronmikroszkópos felvétele.

A nemzetség tagjai alapvetően szaprotrófok, gyakran előfordulnak a talajban, növényi anyagokon vagy trágyában (Madrid és mtsi. 2014). Emellett fontos növénypatogének, melyek főképp a Poaceae család tagjait fertőzik, különösen a kukoricát, a búzát és a rizst, amivel gazdasági károkat okozhatnak. Egyes fajok opportunista humánpatogénként is számon tartottak (Manamgoda és mtsi. 2011), ezen fajok által okozott megbetegedések a felbukkanó gombafertőzések közé sorolhatók (Arif és Perfect 2017).

3.1 A felbukkanó gombafertőzések jelentősége

A felbukkanó gombafertőzések a nem *Aspergillus fumigatus*-hoz vagy *Candida albicans*-hoz köthető mikózisokat foglalják magukba (Pfaller és Diekema 2004). A fonalas gombák között a *Mucorales* rend képviselői, például a *Lichtheimia*, *Rhizomucor* és *Mucor* nemzetségek egyes tagjai, a *Fusarium*, a *Scedosporium* és a *Trichoderma* fajok, valamint a melanizált gombák csoportja, amelybe például a *Cladophialophora*, *Alternaria* vagy *Curvularia* fajok is tartoznak, felelősek a fertőzések kialakításáért (Arif és Perfect 2017).

Az ilyen jellegű fertőzések száma évről évre nő. Ennek háttérében az immunszuppresszált betegek számának növekedése állhat (Nagy és mtsi. 2004, Arif és Perfect 2017), de a fertőzések esélyét növeli a hosszantartó kórházi ápolás (Groll és Walsh 2001, Badiie és mtsi. 2011), vagy olyan civilizációs betegségek is, mint a cukorbetegség (Poradzka és mtsi. 2013). A molekuláris diagnosztika fejlődésének és elterjedésének köszönhetően pontosabb képet kaptunk ezen gombák előfordulásáról, valamint a klinikumban korábban nem diagnosztizált gombafertőzések is kimutathatóvá váltak. Mindez azonban nem feltétlenül jelenti azt, hogy eddig ezek a fajok nem voltak jelen tényleges

patogénként (Roilides 2016). Mivel ezek a gombák gyakran előfordulnak a környezetben, a növekvő esetszám mögött környezeti tényezők is állhatnak: a globális felmelegedés miatti klímaváltozás befolyásolhatja a gombák elterjedését, ezáltal a gombára nézve korábban nem jellemző területeken is leírnak fertőzéseket (Raffa és mtsi. 2012, Debourgogne és mtsi. 2016). Ezzel összefüggésben az egyre gyakoribb természeti katasztrófák is kockázatot jelentenek a mikózisok megjelenésében (Benedict és Park 2014).

Ezeknél a fertőzéseknél a diagnózis felállítása nehézséget okoz, hiszen az általános képalkotó eljárások és vérvizsgálatok (például β -D-glükán teszt) alapján még nemzetség szinten sem határozható meg a fertőző ágens, valamint nem áll rendelkezésre a gyakoribb esetszámú gombákra már kifejlesztett egyszerű szerológiai vagy antigén teszt. Általában szükséges az izolátumok tenyésztése és mikroszkópos vizsgálata, valamint a molekuláris módszerekkel történő fajmeghatározás (Wong és Revankar 2016, Arif és Perfect 2017).

A kezelések egy részénél a műtéti beavatkozás jelenti a megoldást, amellyel a fertőzött szöveteket eltávolítják, emellett általánosan használnak gombaellenes szerekkel végzett kezelést is. Az ezek iránti érzékenység akár az egy nemzetséghez tartozó fajok között is nagyban eltérhet. Sok esetben hiányzik az egységes kezelési javaslat, főképp a kis esetszámú fertőzések esetében (Arif és Perfect 2017).

Ez különösen igaz a melanizált gombák csoportjára, amelyek a spórák belégzésével vagy percután sérülés során kerülnek a szervezetbe. Ezen gombák patogenitási mechanizmusa nagyrészt ismeretlen. (Wong és Revankar 2016).

A melanizált gombák több mint 150 faja és 70 nemzetsége hozható összefüggésbe humán megbetegedésekkel (Revankar és Sutton 2010), amelyeket 3 fő csoportba oszthatunk (McGinnis 1983, Nagy és mtsi. 2004): (I) feohifomikózis, amikor melanizált gombahifa, élesztőszerű sejtek vagy pseudohifák találhatók a szövetekben és szklerotikus sejtek nélküli léziók jelentkeznek a fertőzött szövetben, (II) kromoblasztomikózis, mely krónikus, lokális kután vagy szubkután fertőzés, szemölcsszerű léziók és szklerotikus testek jellemzik, (III) eumikotikus micetóma, amely mélyszöveti fertőzéseket foglal magába, jellemzően micélium-aggregátumokat tartalmazó granulomokkal.

3.2 A *Curvularia* fajok által okozott fertőzések általános jellemzése és epidemiológiája

A *Curvularia* fajok úgynevezett „curvulariózist” okoznak, amely a feohifomikózisok közé sorolható. Klinikai megjelenése függ a fertőzés helyétől és a beteg immunállapotától. A legtöbb opportunistá patogénhez hasonlóan ezen fajok esetében is az opportunistá jelleg a szisztémás mikózisok kialakítására vonatkozik, hiszen lokális fertőzést egészséges emberekben is okoznak. Felszíni fertőzéseket (keratitisz, kután, szubkután fertőzések) és allergiás megbetegedéseket okoznak leggyakrabban, de ezek mellett a tüdőt vagy a központi idegrendszert érintő és disszeminált fertőzéseket is leírtak (Revankar 2007). A *Curvularia* fertőzések földrajzi elterjedése a trópusi, szubtrópusi területeken a leggyakoribb, de kisebb esetszámban a mérsékelt övezetben is előfordulnak.

3.2.1 Felszíni fertőzések

A *Curvularia* fajok által leggyakrabban okozott felszíni fertőzések a szemet érintik. A keratitiszes esetek legnagyobb része Indiából származik, de az Egyesült Államokban, Nepálban, Thaiföldön is írtak le ilyen fertőzéseket (Krizsán és mtsi. 2015). A bőrt érintő felszíni fertőzések előfordulnak például az Egyesült Államokban (Moody és mtsi. 2012), Japánban (Yanagihara és mtsi. 2010) vagy Ausztráliában (Torda és Jones 1997), amely utóbbi esetben nekrotizáló fertőzést figyeltek meg. A fertőzéseket általában sérülés előzi meg, amely utat nyit a gomba bejutásához.

3.2.2 Légutakat érintő megbetegedések

A légutakat érintő megbetegedések közül a *Curvularia* fajok leggyakrabban szinuszitist (orrmelléküreg-gyulladás) okoznak. Invazív (Viola és Sutton 2010) és nem-invazív (Chapurin és mtsi. 2016, Cavanna és mtsi. 2014) formára is találunk példát az esetleírások között. Az invazív fertőzés kialakulása nem függ immunszuppressziótól. A nem-invazív szinuszitisz leggyakoribb megjelenési formája *Curvularia* fajok esetében az allergiás gombás rinoszinuszitisz, amelyek közül a legtöbb esetet az Egyesült Államokban diagnosztizálták (Krizsán és mtsi. 2015), de például Katarból (Taj-Aldeen és mtsi. 2004), Franciaországból (Ambrosetti és mtsi. 2006), Olaszországból (Posteraro és mtsi. 2010) és Indiából (Chowdhary és mtsi. 2011) is származnak esetleírások.

Az allergia kialakításában fontos szerepe van a gomba által termelt allergén molekuláknak. Ezen molekulák kutatása nem csak az allergiás folyamatok megértése szempontjából lehet fontos, hanem immunterápiás kezelésekben is felhasználhatóak lehetnek. *C. lunata* esetében fő allergénekként azonosították a Cur l 1 (szerin proteáz), Cur l 2 (enoláz) és Cur l 3 (citokróm-c) fehérjéket. A Cur l 3 fehérjével és annak epitóp peptideivel egér modellben sikeres immunterápiát is végeztek (Sharma és mtsi. 2011).

A tüdőt érintő elsődleges fertőzések között leggyakrabban allergiás bronchopulmonáris mikózishoz kapcsolhatók ezek a fajok. A szinusztitiszhez hasonlóan a fertőzés ezen megjelenési formája is az Egyesült Államokban és Ausztráliában gyakoribb (Chowdhary és mtsi. 2014, Landaeta és mtsi. 2017, Noda Milla és mtsi. 2015).

3.2.3 Központi idegrendszeri megbetegedések

A *Curvularia* fajok központi idegrendszeri fertőzést is okozhatnak, mely leggyakrabban másodlagos fertőzésként alakul ki, például krónikus szinusztitiszből (Viola és Sutton 2010, Gadgil és mtsi. 2013). Ezt a fertőzési formát is leírták már immunkompetens egyéneknél is (Carter és Boudreaux 2004). Az esetleírások az Egyesült Államokból származnak.

3.2.4 Disszeminált és invazív fertőzések

A disszeminált fertőzések kialakulása során, mint ahogy egyéb gombás fertőzéseknél is, kockázati tényezőt jelent az immunszuppresszált állapot, vagy bármilyen, a szervezet védelmi vonalait érintő elégtelenség. A szakirodalomban találunk példát immunszuppresszált betegben után fertőzésből kialakult disszeminált fertőzésre (Balla és mtsi. 2016), de a vérképzőszervi rendellenesség (Chang és mtsi. 2018) vagy a kiterjedt égési sérülés (Beckett és mtsi. 2017) is növeli a fertőzés esélyét. Immunkompetens egyénben is volt példa disszeminált fertőzésre, amely a vesét és agyat érintette (Frank s mtsi. 2016). A fent említett esetleírásokból az látható, hogy ezek a fertőzések leggyakrabban az Egyesült Államokban fordultak elő, de problémát okoztak Ausztráliában és Japánban is.

3.3 A *Curvularia* fajok patogenitása

A *Curvularia* fajok növényekkel kapcsolatos patogenitásával számos kutatás foglalkozott (Gao és mtsi. 2013, Gao és mtsi. 2014, Liu és mtsi. 2016, Gao és Chen 2017b), azonban az emberi megbetegedések vonatkozásában inkább csak eseteleírások állnak a rendelkezésünkre és a patogenitási folyamatról keveset tudunk.

Emlős modellen végzett korai vizsgálatok főleg annak bizonyítására szolgáltak, hogy a fajok képesek a fertőzésre (Whitcomb és mtsi. 1981, Altire-Werber és Edberg 1985). Egy későbbi tanulmány is beszámolt arról, hogy a humán szervezetből izolált törzsekkel fertőzött egészséges és immunszuppresszált állatok szerveiben a gomba kimutatható (Vishnoi és mtsi. 2005). Egér modellben végzett vizsgálatok azt mutatták, hogy az immunszuppresszált állatok fertőzése magas mortalitást eredményezett, továbbá a gomba elsődlegesen a tüdőt és a vesét kolonizálta (Paredes és mtsi. 2013). Azonban magáról a fertőzési folyamatról vagy a virulenciafaktorokról nem áll rendelkezésünkre információ.

Mivel egészséges emberekben a *Curvularia* törzsek leggyakrabban allergiás megbetegedésekkel hozhatók összefüggésbe, az allergének meghatározására is irányultak kutatások, amelyek során azonosították például a korábban már említett Cur I fehérjét (Gupta és mtsi. 2004, Sharma és mtsi. 2011) és az alkohol dehidrogenázt is (Nair és mtsi. 2011).

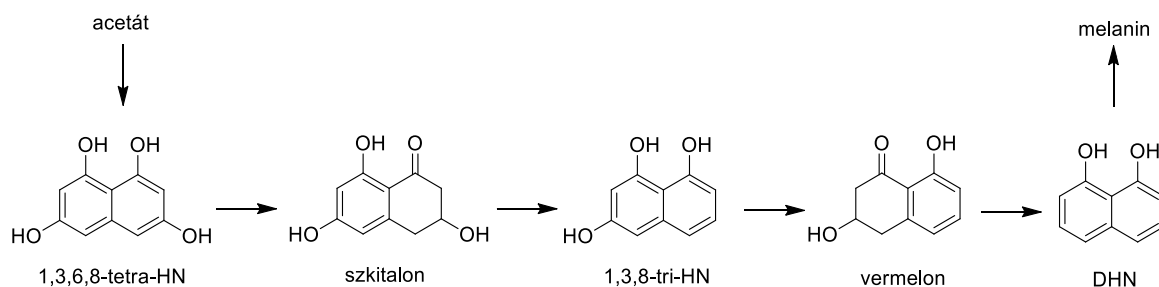
3.4 A *Curvularia lunata* lehetséges virulencia faktorai

A humán fertőzésekhez köthető virulenciafaktorokról nincs adatunk, azonban a gombafaj számos, a növények fertőzésében szerepet játszó virulenciafaktorát azonosították. Ide tartozik például a nem gazda specifikus furanoid toxin (Liu és mtsi. 2009) és a melanin bioszintézise (Xu és mtsi. 2007), amely szintetikus útvonalakban a *brn1* gén által kódolt enzim szerepet játszik (Liu és mtsi. 2011). Virulenciafaktorként azonosították például a *clm1* (Wang és Chen 2011) és *clk1* (Gao és mtsi. 2013) gének által kódolt mitogén aktivált protein kinázokat (MAPK), a CIPKS18 poliketid szintázt (Gao és Chen 2017a) vagy a ClVeIB velvet fehérjét (Gao és mtsi. 2017).

3.4.1 A melanin szerepe a patogenezisben

A melaninok a pigmentek egy diverz csoportját alkotják, amelyek fenolos vegyületek hidroxilációjával és polimerizációjával jönnek létre. Szintézisük alapján három fő csoportot különböztetünk meg: i) a fekete vagy barna eumelaninok, amelyek szintézise során a tirozin ciklizációjával o-dihydroxifenilalanin (DOPA) és dopakinon keletkezik és ezek további ciklizációs lépéseken mennek keresztül, ii) a pirosas színű feomelaninok, amelyek szintézise az eumelaninokéhoz hasonló, azonban a DOPA ebben az esetben ciszteinizálódik, valamint iii) az allomelaninok, amelyek di- vagy tetrahydroxinaftalén molekulák oxidációjával és polimerizációjával keletkeznek a pentaketid útvonalon (2. ábra) változatos színű polimereket hozva létre (Plonka és Grabacka 2006).

A *C. lunata* dihydroxinaftalén (DHN) melanint szintetizál, amely a konídiumokban és a hifákban is megtalálható (Lanisnik és Wheeler 2003), míg az *A. fumigatus* DHN-melanin és az ugyancsak az allomelaninok közé sorolható piomelanin szintézisére képes, amely csak a konídiumok falában halmozódik fel (Heinekamp és mtsi. 2012). A DHN-melanin bioszintetikus útvonala kémiai gátló például triciklazollal vagy Pyroquilon-nal (Wheeler és Klich 1995). A ticiklazol kis koncentrációban (1 µg/ml) gátolja az 1,3,8-tri-HN vermelonná történő átalakítását, magasabb koncentrációban (10 µg/ml) az 1,3,6,8-tetra-HN redukcióját is (Tokousbalides és Sisler 1979).



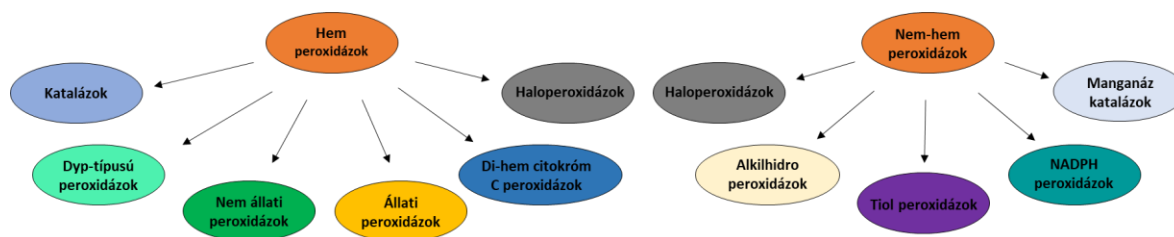
2. ábra: A *C. lunata* és az *A. fumigatus* által is termelt DHN-melanin szintézisének útvonala. HN: hidroxinaftalén; DHN: dihydroxinaftalén

A mikroorganizmusok esetében a melaninok számos funkciót elláthatnak. Környezeti hatásokkal szemben hatékony védelmet nyújthatnak: a melanizált *Sporothrix schenckii* konídiumai az UV besugárzással szemben ellenállóbbak, mint a nem melanizált konídiumok (Romero-Martinez és mtsi. 2000).

A pigmentek virulenciafaktorként betöltött szerepét több organizmusnál is vizsgálták. Wang és munkatársai (1995) kísérleteiben a *Cryptococcus neoformans* esetében a melanin hiánya virulencia csökkenést eredményezett, a melanizált törzsek ellenállóbbak voltak az oxigén és nitrogén gyökökkel szemben, valamint a pigment a fagocitózis gátlásában is szerepet játszott. A melanin antioxidáns kapacitását egyéb melanizált gombák, pl. *Exophiala dermatitidis* és *Alternaria alternata*, esetében is bizonyították (Jacobson és mtsi. 1995). A melanin hidrogén-peroxid (H_2O_2) és hipoklórossav (HOCl) semlegesítő hatását például *A. nidulans* esetében is igazolták (de Cassia és Pombeiro-Sponchiado 2005). Az *E. dermatitidis* által termelt melanin a neutrofil granulociták fagocitózisát vagy oxidatív folyamatait nem befolyásolta, azonban szerepet játszott a fagolizozómán belüli túlélésben (Schnitzler és mtsi. 1999). *C. neoformans* és *Histoplasma capsulatum* esetében a melanin csökkentette az amfotericin B-vel és kaszpofunginnal szembeni érzékenységet (van Duin és mtsi. 2002). A melanin azonban nem csak a túlélést segítheti, hanem a felismerés célpontja is lehet. Az *A. fumigatus* spórafalában található melanint a mieloid sejtek MelLec receptora képes felismerni, amely szerepet játszik a gombaellenes folyamatok indukciójában (Stappers és mtsi. 2018).

3.4.2 A haloperoxidáz enzimek jellemzése és szerepe

A peroxidáz enzimek majdnem minden élőlényben megtalálhatók, oxidatív reakciókat katalizálnak, amelyekhez elektron akceptorként különböző peroxidokat használnak fel. Lehetnek hem és nem-hem fehérjék. A főbb csoportokat a 3. ábra szemlélteti. A hem peroxidázok többsége két nagyobb családba sorolható, az egyikbe főleg növényekben, baktériumokban és gombákban előforduló enzimek tartoznak, a másikban főleg állati peroxidázok találhatók. Ezen kívül 4 kisebb családot is elkülönítenek, ezek a katalázok, a di-hem citokróm C peroxidázok, a Dyp-típusú peroxidázok és a hem-haloperoxidázok. A nem-hem peroxidázok öt független családba sorolhatók, melyek közül az egyik a haloperoxidázok csoportja (Koua és mtsi. 2009).

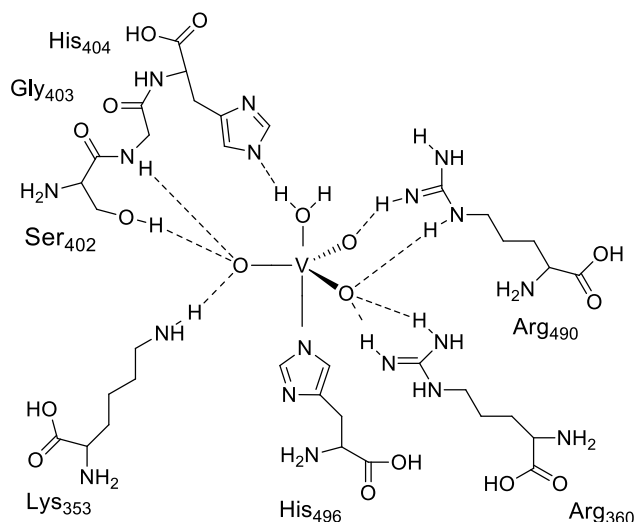


3. ábra: A peroxidázok főbb csoportjai (Koua et al. 2009).

A haloperoxidázok halidok oxidációját végzik hidrogén peroxid felhasználásával (Butler 1998). Az enzimek tartalmazhatnak fémiont az aktív centrumban, amely lehet hem-csoport vagy vanádium, de fémion nélküli aktív centrummal is rendelkezhetnek. A három csoport kismértékű szekvencia-homológiát mutat (Conesa és mtsi. 2002).

A vanádium haloperoxidázok egy vanadát iont tartalmaznak a fémion centrumban és az általuk oxidált legelektronegatívabb ion alapján csoportosíthatók. A kloroperoxidázok (CPO) klorid, bromid és jodid ionokat is képesek felhasználni, míg a bromoperoxidázok csak bromid és jodid ionokat (Winter és Moore 2009). Gombák esetében a vanádium kloroperoxidázoknak a növényi sejttel bontásában tulajdonítanak szerepet. Az enzimek lignocellulóz oxidációjával elősegítik a gomba növényi sejtbe történő bejutását, ezáltal virulenciafaktorként számontartottak (Butler és mtsi. 2001, Wever és Hemrika 2001).

A *C. lunata*-val közeli rokon *C. inaequalis* nem-hem kloroperoxidázát (CPO) 1987-ben írták le először (Liu és mtsi. 1987), majd van Schijndel és munkatársai (1993) vanádium kloroperoxidázként azonosították. Az enzim monomer szerkezetű, a központi egység két 4 darab α -hélixből álló kötegbe rendeződik a harmadlagos szerkezetben (Messerschmidt és Wever 1996). A vanadát-ion a His⁴⁹⁶ aminosav nitrogén atomjához, valamint négy nem fehérje eredetű oxigén atomhoz kötődik trigonális bipiramis szerkezetben (Messerschmidt és mtsi. 1997), a negatív töltést az Arg³⁶⁰ aminosav kompenzálja (Macedo-Ribeiro és mtsi. 1999). A kötőhelyet a 4. ábra illusztrálja.



4. ábra: A *C. inaequalis* kloroperoxidáz vanádium kötőhelye. (Winter and Moore 2009)

A katalitikus aktivitásért a His⁴⁰⁴ aminosav felelős. A halid kötését valószínűleg a Phe³⁹⁷ és Trp³⁵⁰ végzik (Hasan és mtsi. 2006). Ezen haloperoxidáz esetében a kataláz aktivitás nem volt kimutatható (Fernández-Fueyo és mtsi. 2015), ami általánosan elmondható a vanádium kloroperoxidázokról (Renirie és mtsi. 2009).

A gomba hem peroxidázok egy protopofirin IX (hem *b*) kofaktort tartalmaznak. A hem csoport egy N-terminális és C-terminális helix között helyezkedik el (Conesa és mtsi. 2002). Ezek a haloperoxidázok általában rendelkeznek kataláz aktivitással (Renirie és mtsi. 2009, Sun és mtsi. 1994).

A fémion mentes haloperoxidázok szerkezetét például *Pseudomonas fluorescens*, *Streptomyces aureofaciens* és *Streptomyces lividans* esetében vizsgálták. A *S. aureofaciens* kloroperoxidáza az észteráz/lipáz enzimek nagyobb csoportjába tartozik (Hecht és mtsi. 1994). A *P. fluorescens* és *S. lividans* kloroperoxidázok specifikus halid kötőhelye valószínűleg hiányzik (Hofmann és mtsi. 1998).

A gomba haloperoxidázok virulenciában betöltött szerepét humán patogének esetében még nem vizsgálták, viszont mivel az enzimek maguk is szerepet játszanak reaktív oxigéngyökök termelésében, jelenlétük a gombában feltételezi a ROS-okkal szembeni hatékony védelmi mechanizmus meglétét. Néhány haloperoxidáz kataláz aktivitással is rendelkezik, a H₂O₂ semlegesítésében is szerepet játszhatnak.

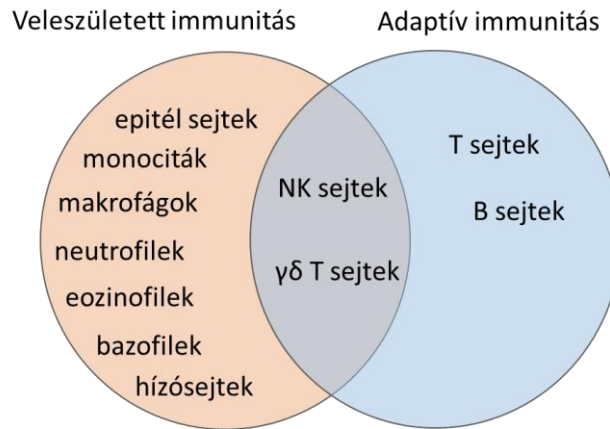
3.5 Az *A. fumigatus* általános jellemzése és az általa okozott megbetegedések

Az *A. fumigatus* az *Aspergillus* nemzetség *Fumigati* szekciójába tartozó szaprotróf fonalas gomba, amelynek természetes élőhelye a talaj. Bőségesen spórázik, spórái 2-3 μm átmérőjűek, szinte mindenhol megtalálhatók a levegőben (Mullins és mtsi. 1976), ezért leggyakrabban belégzés útján jutnak be az emberi szervezetbe. Kis méretüknek köszönhetően könnyen eléri az alveolusokat. A belélegzett konídiumokat immunkompetens egyénekben hatékonyan eliminálják az immunsejtek, azonban immunszuppresszált vagy immundeficiens betegeknél akár halálos kimenetű invazív fertőzések kialakítására is képesek (Latge 1999).

A tüdőt érintő megbetegedések közül kolonizáció nélkül asztma, allergiás szinusztisz alakulhat ki, amely a spórákkal szembeni erőteljes kitettséggel hozható összefüggésbe. Ha a gomba micéliuma is jelen van a légzőszervrendszerben, allergiás bronchopulmonáris aszpergillózis, aszpergillóma vagy invazív aszpergillózis alakulhat ki. Ezen kívül az *A. fumigatus* egyéb testtájakon is okozhat fertőzést, pl. a bőrön, a hasüregben, a vesékben, vagy a szemben (Latge 1999).

3.6 A gombák elleni természetes immunválasz – effektor sejtek

A természetes immunválasz az immunrendszer elsődleges védelmi vonala. Ennek kialakításában rész vesznek fizikai gátak, mint a bőr vagy nyálkahártya, amelyek megakadályozzák a mikroorganizmusok bejutását a szervezetbe, a komplement rendszer elemei, amelyek segítik az immunsejtek általi felismerést, valamint maguk az effektor sejtek, amelyek egymással is együttműködve képesek a mikroorganizmusok eliminálására, valamint az adaptív immunválasz aktiválására (Ghuman és Voelz 2017). A természetes immunválasz sejtjei közé tartoznak a monociták, makrofágok, neutrofil granulociták, dendritikus sejtek, hízósejtek, bazofil és eozinofil granulociták valamint az epitel sejtek (5 ábra). Ezek közül hivatásos antigénprezentáló sejtek a makrofágok és a dendritikus sejtek, azonban mindegyik sejtípus képes antigén bemutatására, amellyel a T sejtek differenciációját indukálják (Murphy és mtsi. 2008).



5. ábra: A veleszületett és az adaptív immunitás sejtjei.

A fonalas gombák elleni immunválasz modellezésére leggyakrabban az *A. fumigatus*-t használják (Park és Mehrad 2009, Heinekamp és mtsi. 2015), azonban a felbukkanó fertőzéseket okozó fajok közül is egyre többen bevonnak a kutatásokba. Ezen fajok között a *Mucorales* rend képviselői (Ghuman és Voelz 2017) és a *Scedosporium* fajok (Roilides és mtsi. 2009, Kaur és mtsi. 2019) által kiváltott immunválaszról áll rendelkezésre nagyobb mennyiségű információ.

Mivel a dolgozat a monociták, makrofágok és neutrofil granulociták *C. lunata*-ra adott válaszát vizsgálja, a továbbiakban ez a három sejtípus kerül bemutatásra.

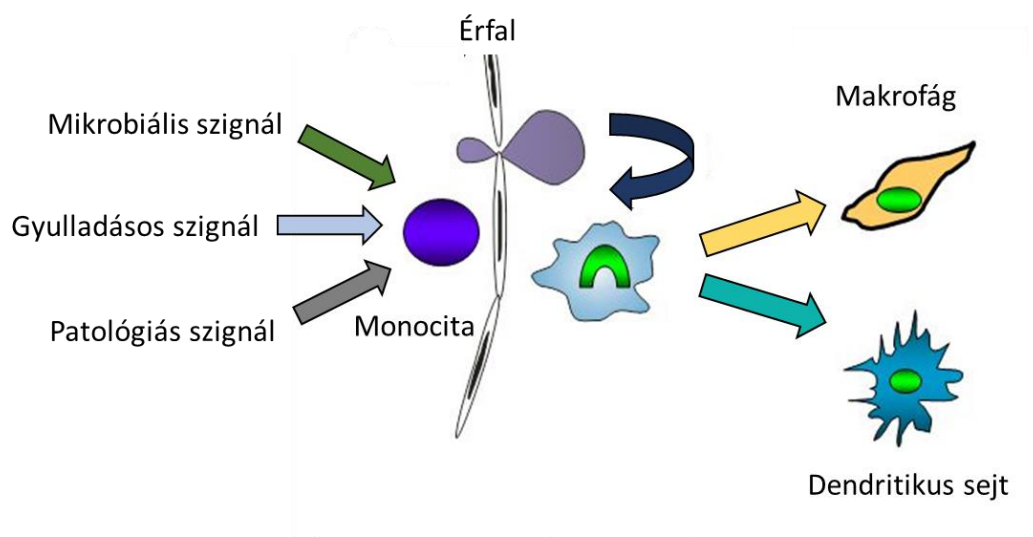
3.6.1 Monociták

A monociták a vérben található, csontvelői eredetű leukociták, amelyek a mieloid útvonalon jönnek létre. Funkcionálisan a fagocitózisra való képesség, antigénprezentáció és citokintermelés jellemzi őket (Ziegler-Heitbrock 2015). A monociták szubpopulációit CD14 és CD16 markerek alapján különítjük el. A klasszikus monocita sejtek a CD14 molekulát erősen expresszálják, a nem klasszikus monocitákra viszont a CD16 marker erősebb kifejezése jellemző. A két molekulát egyenlő mennyiségben expresszáló sejteket a köztes fenotípusú alpopulációba sorolják (Ziegler-Heitbrock és mtsi. 2010). Egérben a klasszikus és nem-klasszikus populációk ugyanúgy megtalálhatók, amelyek a CD115, CD45 és Ly6C markerek alapján különíthetők el (Ingersoll és mtsi. 2010).

Fagocitózis után a monociták az antigéneket MHC molekulán keresztül mutatják be. Az antigének prezentációjával és azok nyirokszervekbe történő szállításával szabályozzák az adaptív immunrendszert. A T sejtek differenciációjának szabályozásával helper, citotoxikus,

de akár regulátor T sejtek proliferációját is elősegíthetik (Augier és mtsi. 2010, Jakubzick és mtsi. 2017).

A monociták aktivációját mikrobiális, gyulladásos vagy egyéb patológiás szignálok indukálhatják (Ivanova és Orekhov 2016). A mikrobiális szignálok közé tartoznak többek között a gomba PAMP-ok (patogén-asszociált molekuláris mintázat) is, amelyek felismerésében elsősorban a Toll-like receptorok (TLR) vagy C-típusú lektin receptorok (CLR) játszanak szerepet (Lauvau és mtsi. 2015). Az aktivációs szignál elindítja a monociták differenciációját, amely során a sejtek a szövetek közé vándorolnak (Shi és Pamer 2011). A $CD14^+$ monociták az érfalon való átlépés után többféle útvonalon fejlődhetnek: differenciálódhatnak makrofágokká vagy dendritikus sejtekké (Plantinga és mtsi. 2013, Tamoutounour és mtsi. 2013, Jakubzick és mtsi. 2017) (6. ábra), de akár fenntarthatják a monocita állapotot is (Jakubzick és mtsi. 2013, Jakubzick és mtsi. 2017).



6. ábra: A monociták aktivációjának és differenciációjának folyamata. A monociták a szignálok hatására az érfalon keresztül a szövetek közötti térbe lépnek, majd ott differenciálódnak (<https://slideplayer.hu/slide/2108693/>).

A monociták differenciációja során többek között az endotél sejtekkel való kapcsolat kialakításához szükséges fehérjék jelennek meg a sejtek felszínén. Ilyen fehérjék az integrinek, amelyek a sejt-sejt kapcsolatok kialakításán (Hynes 1987) kívül a fagocitózissal összefüggő jelátvitelben is szerepet játszanak (Aplin és mtsi. 1998). A primer monociták makrofággá történő differenciálódása során a CD11a, CD11b és CD11c molekulák expressziója emelkedik meg, míg dendritikus sejtté való differenciálódásnál a CD11b és

CD11c expressziója nő meg. A dendritikus sejteken a CD11a expressziója is megmarad (Ammon és mtsi. 2000).

A monociták a kemokin receptorok közül elsősorban a CCR1, CCR2 és CCR5 molekulákat expresszálják, amelyek az infiltrációt kiváltó kemokinek kötéséért felelősek (Yang és mtsi. 2014). Az érés során a CCR2 molekula mennyisége csökken, amely transzkripciós szinten is kimutatható (Phillips és mtsi. 2005).

3.6.1.1 A monociták szerepe a patogén fonalas gombák elleni védekezésben

A monociták *A. fumigatus*-ra adott válasza függ attól, hogy a gomba milyen formában van jelen a szervezetben. A konídiumok jelenléte ugyan vált ki fagocitózist, de a citokin és kemokin kódoló gének expresszióját nem indukálja. Ezzel szemben a csíratömlő megjelenése, valamint a hifák jelenléte ezen gének expresszióját váltja ki (Loeffler és mtsi. 2009).

Az *A. fumigatus* okozta légúti megbetegedések esetén a monociták által közvetített védekező mechanizmusok elengedhetetlenek a gomba eliminálásában. A monociták és a monocita eredetű dendritikus sejtek fokozzák a neutrofilek ölési képességét a konídiumokkal szemben (Espinosa és mtsi. 2014), valamint a T sejtés válasz szabályozásában is részt vesznek (Rivera és mtsi. 2011). A monociták fagocitózis után NADPH-oxidáz dependens útvonalon közvetlenül is képesek a belélegzett *Aspergillus* konídiumok ölésére (Jhingran és mtsi. 2012, Espinosa és mtsi. 2014). A CD14+ sejtek gátolják a gombasejtek növekedését, míg a CD16+ sejtek inkább a citokintermelésben (TNF- α , IL1) játszanak szerepet, azonban a citokin szekréció csak élő konídiumok jelenlétében valósul meg (Serbina és mtsi. 2009).

3.6.2 Makrofágok

A makrofágok a szövetekben található mieloid eredetű immunsejtek, amelyek az idegen anyagok, elpusztult sejtek eltakarítását, valamint gyulladásos szignál jelenlétében egyéb immunsejtek toborzását végzik. A professzionális fagociták közé sorolhatók, a patogének jelenlétét TLR, NOD-like és C-típusú lektin receptorokon keresztül érzékelik (Akira és mtsi. 2006, Murray és Wynn 2011). Szöveti elhelyezkedésük szerint csoportosíthatjuk őket, funkciójukat a szöveti környezet is befolyásolja. Például a bélfalban található makrofágok a dendritikus sejtekkel együttműködve alakítják ki a bélflórával szembeni toleranciát, a lép marginális zónájának makrofágjai az immunsejtek

szuppresszióját végzik az apoptotikus sejtekkel szemben (McGaha és mtsi. 2011, Murray és Wynn 2011). A szöveti makrofágok egy része, főleg gyulladásos körülmények között, a monociták differenciációjával jön létre (Gordon és Taylor 2005), azonban egyéb populációk, mint a Kupffer-sejtek vagy az alveoláris makrofágok már magzati korban a szövetek közé vándorolnak és helyben proliferálódnak (Yona és mtsi. 2013)

A szöveti makrofágok a klasszikus (M1) és alternatív (M2) útvonalon aktiválódhatnak. Az M1 makrofágok proinflammatorikus funkciójú sejtek, amelyek a Th1-es választ, míg az antiinflammatorikus M2 sejtek a Th2-es választ indukálják. Az M1 fenotípus kialakulását többek közt a TLR ligandok általi aktiváció eredményezheti. Ilyen ligand pl. a Gram-negatív baktériumok külső membránjában található lipopoliszacharid (LPS), amely a TLR4-hez kötődik (Nau és mtsi. 2002). Az M2 fenotípus további csoportokra bontható. Az M2a típusú sejtek a Th2 sejtek által aktivált makrofágok, amelyek kialakulása a Th2 sejtekből felszabaduló IL4 és IL13 citokinektől függő folyamat (Martinez és mtsi. 2013). Az M2b csoportba tartozó sejtek immunkomplex (antigén és ellenanyag kölcsönhatása) és TLR ligand kombinált szignál jelenlétében figyelhetők meg. Az M2c, vagy immunregulátor sejtek kialakulását az IL10 jelenléte váltja ki (Park-Min és mtsi. 2005, Martinez és Gordon 2014).

3.6.2.1 A makrofágok szerepe a patogén fonalas gombák elleni védekezésben

A makrofágok a fonalas gombák spóráit, konídiumait fagocitálják, majd intracelluláris mechanizmusokkal károsítják, azonban ezen antifungális mechanizmusok az egyes fajokkal szemben eltérő lehet. A *Rhizopus* fajok fagocitált spóráinak csírázását a sejtek vaséheztetés útján gátolják, ugyanis a fertőzés során a vas sejten belüli transzportjához és eloszlásához köthető gének transzkripciók változását figyelték meg (Andrianaki és mtsi. 2018), az *A. fumigatus* konídiumok ölése viszont fagolizoszóma savasodásával és intracelluláris oxidatív útvonalon történik (Ibrahim-Granet és mtsi. 2003, Philippe és mtsi. 2003).

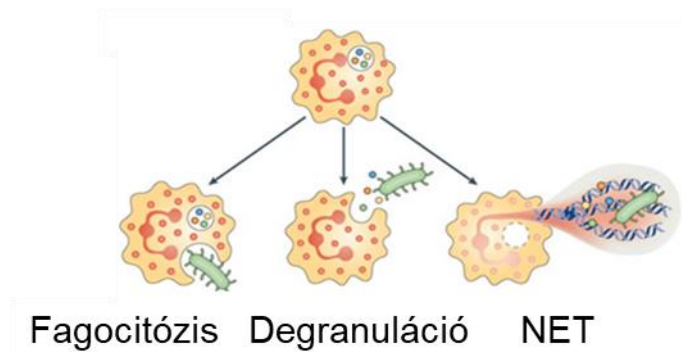
Az *A. fumigatus* spórák leggyakrabban belégzéssel kerülnek a szervezetbe, ezért a spórák eliminálásában az alveoláris makrofágoknak elengedhetetlen szerepe van. A nyugvó konídiumokat a sejtek fagocitálják, azonban citokinek és reaktív oxigénfajták (ROS) szekrécióját ez a forma nem váltja ki (Gersuk és mtsi. 2006), az intracelluláris ölési mechanizmusok aktivációja a duzzadt konídiumok megjelenésekor történik meg (Philippe és mtsi. 2003). A fagocitózis indukciójában a Dectin-1 és a TLR2 receptorok játszanak szerepet

(Luther és mtsi. 2007). Érdekes módon a konídiumok a makrofágok alternatív útvonalú polarizációját indukálják (Bhatia és mtsi. 2011). A makrofágok gátolják a neutrofil funkciókat a konídiumok jelenlétében (Rosowski és mtsi. 2018). A nem fagocitált duzzadt és csírázó konídiumok már indukálják a citokinek és a ROS szekrécióját (Gersuk és mtsi. 2006), azonban a sejtípus elsődleges feladata a konídiumok eliminálása (Schaffner és mtsi. 1982).

3.6.3 Neutrofil granulociták

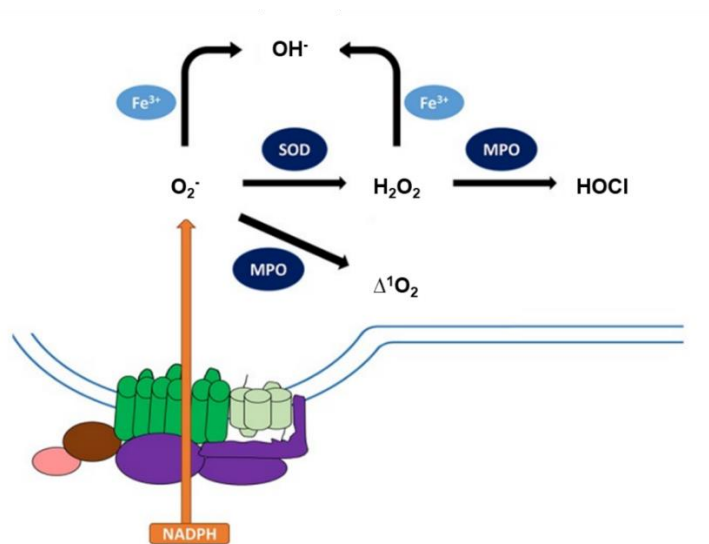
A neutrofil granulociták csontvelői eredetű sejtek, amelyek folyamatosan termelődnek a mieloid prekursor sejtekből (Borregaard 2010). Emberben a keringő leukociták 50-70%-át teszik ki (Mestas és Hughes 2004). 7-10 μm átmérőjű, szegmentált sejtmagú sejtek, amelyek citoplazmájában számos granulum és szekretoros vezikula található (Borregaard 2010). A granulumok három csoportba oszthatók: i) azurofil (elsődleges) granulum, amely mieloperoxidáz enzimet (MPO), specifikus proteázokat és defenzineket tartalmaz; ii) specifikus (másodlagos) granulum, amelyben többek között laktoferrin és zselatináz található; iii) zselatináz (harmadlagos) granulum, amely a mátrix metalloproteináz 9 enzimet tartalmazza (Faurschou és mtsi. 2002, Borregaard 2010, Hager és mtsi. 2010).

A neutrofilek a patogéneket intra- és extracelluláris útvonalakon is képesek eliminálni. Azt, hogy melyik útvonal aktiválódik a patogén mérete is befolyásolja: a kis méret fagocitózist és intracelluláris ölést, a nagy méret extracelluláris ölési mechanizmusokat indukál (Warnatsch és mtsi. 2017). A patogén bekebelezése után a neutrofil sejtek NADPH-oxidáz függő ROS termeléssel és a granulumokból az antimikrobiális peptidek fagoszómába ürítésével károsítják a mikroorganizmust (Borregaard 2010, Hager és mtsi. 2010). Az extracelluláris ölési mechanizmusban is szerepet játszik a ROS és a granulumokból felszabaduló enzimek általi károsítás (degranuláció), valamint az extracelluláris csapda (NET - *neutrophil extracellular trap*) formálás is (Brinkmann és mtsi. 2004, Papayannopoulos és Zychlinsky 2009) (7. ábra).



7. ábra: A neutrofil granulociták effektor funkciói: fagocitózis, degranuláció és NET formálás (Kolaczowska és Kubes 2013).

A NADPH-oxidáz függő ROS termelés, az oxidatív burst folyamatában a membránkötött NADPH-oxidáz elektront vesz fel a citoplazmatikus NADPH-tól, amelyet molekuláris oxigénhez köt szuperoxid gyököt (O_2^-) hozva létre, amely gyors reakcióban spontán vagy szuperoxid dizmutáz (SOD) által H_2O_2 -dá alakul (Babior és mtsi. 2002, Bedard és Krause 2007). Ezután a MPO HOCl-t hoz létre a H_2O_2 felhasználásával (Klebanoff 1999, Klebanoff 2005). Emellett a MPO a O_2^- közvetlen felhasználásával szinglet oxigén (Δ^1O_2) előállítására is képes (8. ábra) A HOCl ezután képes reakcióba lépni a H_2O_2 -dal és szinglet oxigént vagy peroxil gyököket létrehozni (Miyamoto és mtsi. 2006).



8. ábra: Az oxidatív burst folyamata. (Nguyen, Green and Mecsas 2017). Δ^1O_2 : szinglet oxigén; H_2O_2 : hidrogén peroxid; MPO: mieloperoxidáz; NADPH: Nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát; O_2^- : szuperoxid gyök; OH^- : hidroxil gyök; SOD: szuperoxid dizmutáz;

A NADPH-oxidáz komplexre számos receptoron keresztül jelátvitel hathat. Ezek közül a legtöbb G-protein kapcsolt receptorról (GPCR), a TLR-ekről és a citokin receptorokról érkező szignál elsődleges impulzusként szolgál a sejteknek, felkészíti a második szignálra adott erőteljes válaszra. Ezek a jelátviteli folyamatok nem indukálnak O_2^- termelést, azonban az enzimkomplex egy-egy tagjának foszforilációját, transzlokációját szabályozhatják. Az Fc receptorok (opszoninokat kötő receptorok) és integrin receptorok (mint pl. a CR3) jelátviteli folyamatai azonban közvetlenül képesek aktiválni a NADPH-oxidázt, így O_2^- termelést váltanak ki (Nguyen és mtsi. 2017).

A MPO érett formában tárolódik a neutrofilek azurofil granulumaiban. A sejtek receptorokon keresztül aktivációja után az enzim sejtéből való kijutása történhet degranulációval, apoptózis/nekrózis következtében (Bentwood és Henson 1980, van der Veen és mtsi. 2009, Odobasic és mtsi. 2013) vagy a NET képzés velejárójaként (Kessenbrock és mtsi. 2009). A már tárgyalt enzimatis aktivitáson kívül az MPO nem-enzimatis szabályozó szerepet is betölt. Proinflammatorikus hatása, hogy autokrin módon aktiválhatja a neutrofil granulocitákat (Lau és mtsi. 2005), azonban egyéb leukociták toborzását is végzi azok CD11b/CD18 receptorain keresztül (Johansson és mtsi. 1997). Az enzimatisan inaktív MPO az endotél sejtekben az IL6 és IL8 citokinek termelését indukálja (Lefkowitz és mtsi. 2000).

Az extracelluláris effektor funkciót ellátó NET legfőbb összetevője a sejtek DNS-e, de tartalmaz a granulumokból felszabaduló fehérjéket, mint például elasztázt, mieloperoxidázt vagy lektoferrint is. A neutrofilek baktérium- (Brinkmann és mtsi. 2004) és gombaölő (Urban és mtsi. 2006) mechanizmusaiban is van szerepe.

A NET képzés szabályozása kevésbé ismert. A legtöbb kutatás szerint a hálózat megjelenése függ a ROS képzéstől (Fuchs és mtsi. 2007), de ezek a kutatások főképp az intracelluláris ROS általi szabályozásra vonatkoznak (Stoiber és mtsi. 2015). Megfigyeltek ROS független NET képzést (Arai és mtsi. 2014) és a csapda hiányát ROS jelenlétében is. Tehát a ROS valószínűleg szükséges, de nem egyedüli szabályozója a NET megjelenésének (Yost és mtsi. 2009). Nishinaka és munkatársai (2011) eredményei alapján a szinglet oxigén a NET képzés legfontosabb inducere, azonban más kutatások ennek a hipotézisnek ellent mondanak: a pH változás befolyásolja a neutrofil funkciókat, így a NET kialakulását: az intra- és extracelluláris savasodás gátolja a ROS termelést, ezáltal a NET képzést, azonban

savas környezetben is indukálható a NET kialakulása H_2O_2 hozzáadásával (Behnen és mtsi. 2017), tehát a H_2O_2 is szerepet játszik a szabályozásban.

Nem csak a ROS-ok válhatnak ki NET képzést, hanem egyes gyulladásos citokinek, mint az IL8, TNF α (Keshari és mtsi. 2012) vagy mikrobiális szignálok, mint az LPS (Brinkmann és mtsi. 2004) jelenléte is képes indukálni azt. Feltételezik továbbá, hogy a hálózat megjelenése függ a patogén méretétől is, ugyanis a Dectin-1 receptoron keresztüli fagocitózis gátolja a kialakulását (Branzk és mtsi. 2014). Egyes esetekben, például *Candida albicans* jelenlétében, megfigyelték, hogy az MPO is szabályozza a NET kialakulását (Metzler és mtsi. 2011). Ezt az összefüggést azonban *Staphylococcus aureus* vagy *Escherichia coli* esetében nem támasztották alá (Parker és mtsi. 2012)

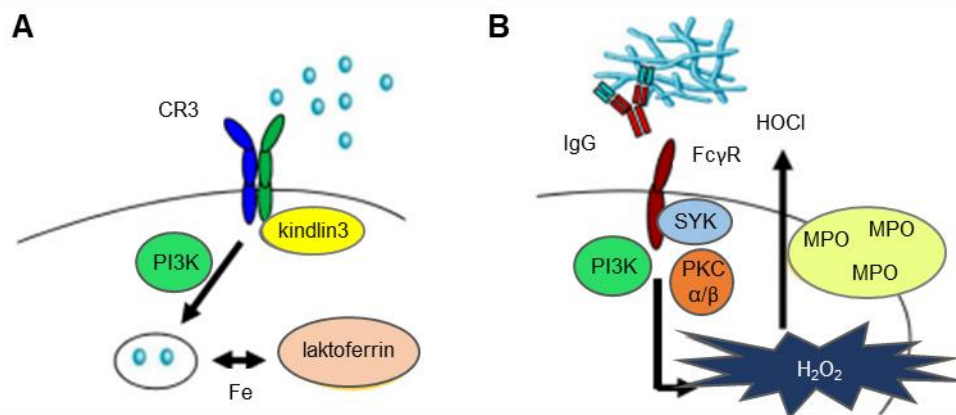
A neutrofil granulociták, akárcsak a monociták és makrofágok, CLR és TLR receptorokon keresztül ismerik fel a gombasejtfali mintázatokat (Thomas és Schroder 2013). A TLR2 és TLR4 receptorok részt vesznek a H_2O_2 termelés indukciójában. A TLR4 receptor a neutrofilek élettartamának szabályozásában is szerepet játszik, a stimuláció elnyújtott neutrofil túlélést eredményez a szignál megjelenését követő rövid időszakban, amely egy NF- κ B által közvetített útvonalon zajlik, azonban a hosszú távú élethossz-szabályozás már a monociták feladata (Sabroe és mtsi. 2003). A sejtek felszínén jelen lévő Fc receptorok is fontosak az opszonizált (ellenanyaggal vagy komplementfehérjékkel jelölt) patogének felismerésében (Dale és mtsi. 2008).

3.6.3.1 A neutrofil granulociták szerepe a patogén fonalas gombák elleni védekezésben

Tekintettel arra, hogy a neutropéniás vagy neutrofil funkcióban sérült betegeknél az invazív aszpergillózis kialakulása igen gyakori, a neutrofilek *A. fumigatus*-sal szemben betöltött kulcsfontosságú védekező szerepe régóta ismert (Young és mtsi. 1970, Cohen és mtsi. 1981). A feohifomikózisok, ezen belül a disszeminált *Curvularia* fertőzések kialakulásában is kockázati tényezőt jelent a neutropénia, a fertőzést követően a neutrofil funkció helyreállítása pedig növeli a túlélés esélyét (Ben-Ami és mtsi. 2009).

A neutrofil granulociták az *Aspergillus* konídiumokat és hifákat különböző módon ismerik fel (9. ábra). A konídiumokat opszonizáció nélkül is képesek fagocitálni a CR3 receptoron keresztül, amelyek csírázását nem oxidatív folyamatokon keresztül gátolják. A csírázás gátlása főképp a laktoferrinek általi vaskötés következtében történik. A hifák

felismerése opszonizációhoz kötött, Fc receptoron keresztül történik. Azok ölésében nagy szerepe van az oxidatív folyamatoknak (Gazendam és mtsi. 2016).



9. ábra: A) Az *A. fumigatus* konídiumok által kiváltott jelátviteli folyamat, amely nem oxidatív ölési mechanizmust indukál, B) a hifák felismerését követő jelátviteli folyamat, amely az oxidatív burst indukálásához vezet (Gazendam és mtsi. 2016). CR3: komplement receptor 3; FCγR: FC gamma receptor; H₂O₂: hidrogén peroxid; HOCl: hipoklórossav; IgG: immunoglobulin G; MPO: mieloperoxidáz; PI3K: foszfoinozítid 3-kináz; PKC: protein kináz C; SYK: Spleen tirozin kináz.

Clark és munkatársai (2018) eredményei alapján a CR3 receptor valószínűleg a hifák felismerésében is szerepet játszik, ugyanis a NET képzés szabályozásával is összefüggésbe hozható, valamint a β-glükán a receptoron keresztül a ROS képzést is indukálja. Ebben a kísérletben a Dectin-1 szerepe a felismerésben nem volt bizonyítható. Egy másik tanulmány szerint azonban a Dectin-1 knockout egerekből származó neutrofilek NADPH-oxidáz komplex aktivációja duzzadt és csírázó konídiumok jelenlétében elmaradt, ölési képességük csökkent (Werner és mtsi. 2009).

A Dectin-1 receptornak valószínűleg fontos szerepe van a *Curvularia* fajok felismerésében is, hisz a Dectin-1-hez kötött jelátvitelben is szerepet játszó CARD9 fehérje hiánya vagy helytelen működése kockázati tényezőként szerepel az ezen gombák által okozott feohifomikózisok kialakulásában (Wang és mtsi. 2018).

A krónikus granulomatózus betegségben (CGD) szenvedők NADPH-oxidáz funkció hiányában elégtelen neutrofil válasszal rendelkeznek (Arnold és Heimall 2017). A CR3 receptor a CGD-s betegek esetében is szerepet játszik a gomba felismerésében, ebben az esetben azonban nem-oxidatív ölési mechanizmusokat aktivál (Gazendam és mtsi. 2016). CGD esetén nem figyelhető meg NET formálás (Fuchs és mtsi. 2007). Ezekben a betegekben a halálozás egyik fő oka az invazív aszpergillózis (Winkelstein és mtsi. 2000, Seger 2008).

A NADPH-oxidáz génterápiás komplementálása helyreállította a NET képzést, így a neutrofilek képesek voltak eliminálni az *A. nidulans* spórákat és hifákat (Bianchi és mtsi. 2009).

A NET ölési mechanizmusban betöltött szerepe *Aspergillus* esetében ennek ellenére kérdéses. McCormick és munkatársai (2010) tanulmánya alapján a NET szerepet játszik a gomba növekedésének gátlásában, azonban Gazendam és munkatársai (2016) nem tapasztaltak változást az ölési hatékonyságban *A. fumigatus*-szal szemben akkor sem, ha a NET kialakulását gátolták.

3.7 A THP-1 sejtvonal – a monocita-makrofág sejtek modellrendszere

A THP-1 sejtvonal egy spontán immortalizálódott monocita szerű sejtvonal, amelyet egy leukémiás gyermek perifériás véréből izoláltak. Fagocitózisra képes sejtek, HLA tipizálás alapján HLA-A, HLA-B és HLA-DR antigén található a felszínükön (Tsuchiya és mtsi. 1980). A monocita állapotú THP-1 sejt a CD14 markert kis mennyiségben expresszálja (Bosshart és Heinzelmann 2016).

A *HLA-DR* gén által kódolt MHC II molekula részt vesz az antigén prezentációban, valamint általa nyomon követhető a sejtek aktiváltsági állapota is (Baqui és mtsi. 1999). A sejtvonal esetében a HLA molekulák közül a *HLA-DR* expressziója konstitutív, míg a *DP* és *DQ* $\text{IFN-}\gamma$ dependens (Yunis és mtsi. 1989). Az aktiválódás detektálására a *CCR2* molekula szintén alkalmas, hiszen a monocita állapotú THP-1 sejtek makrofággá történő differenciációjában a *CCR2* kifejeződése a primer klasszikus monocitákra jellemző mintázatot mutatja. A *CCR1* mRNS szintű alulszabályozása nem mutatható ki a THP-1 sejtek differenciációjakor (Phillips és mtsi. 2005). A sejtvonal a monociták adhéziós molekuláit is expresszálja, az *ITGAL* (CD11a), *ITGAM* (CD11b), *ITGAX* (CD11c) integrinek vizsgálata szintén következtetni enged a sejtek aktiváltsági állapotára (Baqui és mtsi. 1999).

A monocita sejtek érett makrofág fenotípusú sejtté differenciálthatók forbol-12-mirisztát-13-acetát (PMA) vagy 1,25-dihidroxivitamin D₃ (VD₃) használatával (Schwende és mtsi. 1996).

A THP-1 sejtek monocita és makrofág állapotban is képesek citokinek és kemokinek termelésére (Schutte és mtsi. 2009). A sejtvonal gyakran használt modellje a monocita és

makrofág funkciók vizsgálatának (Chanput és mtsi. 2014), gomba-immunsejt interakciók tanulmányozására is használják (Thuer és Gabaldon 2017, Hymery és mtsi. 2017)

3.8 A neutrofil granulociták modellrendszerei

Mint minden sejttypusnál, a neutrofil granulociták modellezéséhez is használhatók a vérből izolált primer sejtek, vagy rendelkezésre állnak immortalizált sejtvonalak is (pl. HL-60, NB4). Mindkét modellrendszernek vannak erősségei és gyengeségei. A sejtvonalak nem minden funkcióban azonosak a primer sejtekkel, viszont könnyebben hozzáférhetők. A primer sejtek funkcióját ugyanakkor befolyásolhatja a donor állapota, az izoláció hatékonysága és egyes lépései. A neutrofil granulociták esetében az izolálásnál visszamaradt monocita populáció is hatással van a neutrofilek túlélésére (Sabroe és mtsi. 2003).

4 Célkitűzések

A fonalas gombák elleni immunválaszról a legtöbb információnk az *A. fumigatus*-szal kapcsolatban van, azonban egyre több opportunista humán patogén fonalas gomba fajt vizsgálnak ebből a szempontból. A gombákkal szembeni felismerési és ölési mechanizmusok a szakirodalmi adatok alapján eltérőek lehetnek.

Munkánk során a klinikai mintákból leggyakrabban izolált *Curvularia* fajok reprezentatív törzsei, elsősorban a *C. lunata* által kiváltott természetes immunválaszt vizsgáltuk. Hogy képet kapjunk a folyamatok csoporton belüli diverzitásáról, egyes kísérleti elrendezések esetében a *Curvularia* nemzetség egyéb fajait is bevontuk a vizsgálatokba.

Ezen vizsgálatokhoz a következő célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

1. THP-1 monocita sejtvonal interakciójának vizsgálata *C. lunata*, *C. hawaiiensis* és *C. spicifera* törzsekkel, amely kiterjed a hifák és a konídiumok által kiváltott válasz, az ölési hatékonyság, valamint a melanin fagocitózisgátló szerepének vizsgálatára;
2. THP-1 sejtekből érlelt makrofágok interakciójának vizsgálata *C. lunata*, *C. hawaiiensis* és *C. spicifera* törzsekkel, amely során a fagocitózis mértékét és az ölési hatékonyságot kívántuk megállapítani;
3. Primer neutrofil granulociták interakciójának vizsgálata *C. lunata*-val, ezen belül a felismerési és ölési mechanizmusok, az ölési hatékonyság és a gomba védekező mechanizmusainak feltérképezése.

5 Anyagok és módszerek

5.1 Az alkalmazott gombatörzsek: tenyésztés, spóraszuszpenzió készítése

A kísérletek során négy *Curvularia* és egy *Aspergillus fumigatus* izolátumot használtunk, amelyeket az 1. táblázat mutat be.

1. táblázat: A kísérletek során használt gombatörzsek, azok törzsgyűjteményi száma, valamint izolálási helyük.

Faj	Törzsgyűjteményi szám	Forrás	Származási hely
<i>Curvularia lunata</i>	SZMC 23759	Humán keratomikózis	India
<i>Curvularia spicifera</i>	SZMC 13064	Humán keratomikózis	Coimbatore, India
<i>Curvularia hawaiiensis</i>	CBS 103.97	Humán szinuszitisz, agyi érintettséggel	Giessen, Németország
<i>Curvularia hawaiiensis</i>	SZMC 13061	Humán keratomikózis	Coimbatore, India
<i>Aspergillus fumigatus</i>	SZMC 23245	Humán keratomikózis	Horvátország

5.2 Alkalmazott sejtkultúrák

THP-1: akut mieloid leukémiás beteg perifériás véréből származó monocita-szerű sejtvonal (ATCC TIB-202).

Neutrofil granulociták: egészséges felnőtt donorok perifériás véréből izolált polimorfonukleáris sejtek.

5.3 Alkalmazott tápközegek, oldatok, reagensek és pufferek

Burgonya-dextróz táptalaj (Potato dextrose agar; PDA; VWR): 0,4% burgonya pepton, 2% glükóz, 1,5% agar.

Rizslisztes táptalaj (Rice flour agar; RFA): 1% rizsliszt, 0,2% élesztőkivonat, 2% agar.

RPMI tápoldat: RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), 0,3 mg/l L-glutamin.

THP-1 tápoldat: RPMI-1640 tápoldat (BioWhittaker) kiegészítve 10% (V/V) 56 °C -on 40 percig hőinaktivált borjúsérummal (FBS; Euroclone), valamint szükség esetén 100 unit/ml penicillin-sztreptomocinnal (Lonza) és 25 µg/ml amfotericin B-vel (Gibco).

Módosított Krebs-Ringer foszfát puffer (mKRPBG): 145 mM NaCl, 4,85 mM KCl, 5,5 mM glükóz, 5,7 mM Na₂HPO₄, pH = 7,35.

Foszfát puffer (PBS): 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH=7,4.

Nátrium-citrát puffer: 10 mM C₆H₅Na₃O₇·2H₂O, pH=7,2.

Tripánkék festék: 0,4% (m/V) tripánkék festék PBS pufferben.

ELISA puffer: 1% (m/V) marha szérumalbumin (Bovine Serum Albumin, BSA; Sigma-Aldrich) PBS pufferben.

ELISA mosó puffer: 0,05% (V/V) Tween 20 (Reanal) PBS pufferben.

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

TMB oldat: 6 mg/ml TMB (tetrametilbenzidin, Sigma-Aldrich) DMSO-ban oldva.

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

ELISA stop oldat: 1,8 M H₂SO₄.

FACS puffer: 0,05% (V/V) Tween 20 (Reanal) PBS pufferben.

MTT oldat: 0,5% (m/V) 3-(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid RPMI-1640-ben oldva.

MPO (mieloperoxidáz) szubsztrát oldat: 150 mM nátrium foszfát puffer, pH = 5,4; 2,9 mM 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin; 0,05 mM H₂O₂.

Inhibitoros MPO szubsztrát oldat: 150 mM nátrium foszfát puffer pH 5,4; 2,9 mM 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin, 0,05 mM H₂O₂, 1 mM 4-amino benzhidrazid.

Savas izopropanol: 95% (V/V) izopropanol, 5% 1N HCl.

5.4 Gombatörzsek tenyésztése, konídium-szuszpenzió készítése

5.4.1 Tenyésztés szilárd táptalajon

A felhasznált gombatörzseket PDA táptalajon tartottuk fenn. A kísérletekhez a konídiumokat 7 vagy 14 napig PDA illetve 7 napig RF táptalajon nevelt tenyészetekről, PBS-sel vagy mKRPBG-vel mostuk le. A hifatörmeléktől a *Curvularia* izolátumok esetében 45 µm pórusátmérőjű szűrő (Millipore) segítségével szabadultunk meg.

A melanin bioszintézis gátlására a PDA táptalajt 20 µg/ml triciklazollal (Sigma-Aldrich) és 1% agarral (Merck) egészítettük ki.

5.4.2 Tenyésztés folyékony tápoldatban, H₂O₂ indukció

A gombatörzseket a folyadéktenyészetben történő neveléséhez 100 ml-es Erlenmeyer lombikba, 50 ml RPMI tápoldatba 10³ konídium/ml koncentrációban oltottuk le. A tenyészeteket 37 °C-on, folyamatosan rázatva neveltük 5 napig. A tenyészeteket H₂O₂-dal indukáltuk (0,2 mM végkoncentrációban), majd 30 vagy 60 perc múlva gézlapon leszűrtük. A mintákat felhasználásig -80 °C-on tároltuk.

5.5 Sejtvonalak tenyésztése, primer sejtek izolálása

5.5.1 THP-1 sejtvonal tenyésztése és differenciáltatása

A sejtvonalat antibiotikummal kiegészített THP-1 tápoldatban tartottuk fenn, 37 °C-on, 5% CO₂ és 100% relatív páratartalom mellett. A kísérletek előtt minimum egy átoltási ciklus során antibiotikum nélkül neveltük a sejteket.

A differenciáltatáshoz a sejteket a kísérlethez szükséges végkoncentrációban osztottuk 12 vagy 24 lyukú sejtenyésztő lemezekre. A differenciáltatást 24 órán keresztül végeztük 10 nM forbol-mirisztil-acetáttal (PMA) kiegészített THP-1 tápoldatban, 1 ml végtérfogatban. A PMA eltávolítása után a sejteket 24 órán keresztül 37 °C-on, 5% CO₂ és 100% relatív páratartalom mellett inkubáltuk.

5.5.2 Primer neutrofil granulociták izolálása

A sejteket 20-50 éves, egészséges donorokból származó vénás vérből izoláltuk. A vér heparin tartalmú csőbe (BD Vacutainer) került levételre. A neutrofil granulociták izolálását a korábban már leírt dextrán (Sigma-Aldrich) szedimentációt követő Ficoll-Paque grádiensen (GE Healthcare) történő centrifugálással végeztük (Kuhns et al. 2015). Az eritrociták lízise hipozmotikusan történt. A sejtek spontán aktivációjának elkerülése érdekében az izolálást szobahőmérsékleten végeztük és az izolált sejteket 5 ml Ca²⁺ és Mg²⁺ mentes mKRPB pufferben vettük fel.

5.6 Kísérleti módszerek

5.6.1 Humán szérum izolálás

Az opszonizációhoz használt humán szérumot minden donor esetében saját vénás vérből izoláltunk. A vér szeparátor géllal töltött vérvételi csőbe került levételre. A szérum elválasztásához a megalvadt vért 25 °C-on 1200 rpm-en 15 percig centrifugáltuk.

5.6.2 Fertőzési körülmények

THP-1 sejtvonal fertőzése

A THP-1 monociták fertőzését 6 vagy 12 lyukú sejttenyésztő lemezen végeztük, a sejteket a fertőzést megelőző napon osztottuk 10^5 sejt/ml koncentrációban, 3 ml vagy 1 ml végtérfogatban.

Mind a monocita, mind pedig a makrofág sejtekhez 1:20 vagy 2:1 effektor:target (E:T) arányban adtunk élő vagy hőinaktivált konídiumokat 100 µl PBS-sel készített szuszpenzióban, majd a lemezeket meghatározott ideig (3, 9 vagy 24 óra) 37 °C-on, 5% CO₂ és 100% relatív páratartalom mellett inkubáltuk. Az inkubációs idő leteltével gyűjtött felülúszót felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

A spórák hőinaktiválását 25 percig 125 °C-on végeztük.

Primer neutrofil granulociták fertőzése

A kísérletekben csíráztatott konídiumok és neutrofil granulociták interakcióját vizsgáltuk. A 96 lyukú lemezen (Sarstedt) a csíráztatást (2×10^4 konídium/well) 37 °C-on, mKRPB-ben végeztük, *C. lunata* esetében 4 órán, *A. fumigatus* esetében 8 órán át 100 µl végtérfogatban, amely után a sejteket 100 µl térfogatban adtuk a gombákhoz a konídiumokhoz viszonyított 5:1 arányban. A CELLview üvegaljú sejttenyésztő petricsészére (Greiner Bio-One) 7×10^4 konídiumot oltottunk le 400 µl végtérfogatban. A csíráztatás után a sejteket 400 µl térfogatban adtuk a gombákhoz 5:1 arányban.

Négy kísérleti körülményt állítottunk fel:

1. Felülúszóval: a konídiumok csírázását követően az izolált sejteket közvetlenül adtuk a gombákhoz.
2. Felülúszó nélkül: a csíráztatás után a csírázó konídiumokat friss mKRPB-vel mostuk, majd a sejteket a friss pufferben adtuk a gombákhoz.

3. Szérum opszonizált: a gombákat a konídiumok csíráztatásának utolsó órájában 10% (V/V) szérum hozzáadásával opszonizáltuk, majd a sejteket így adtuk a gombákhoz.
4. Felülúszó kezelt: a sejtekhez a csírázó konídiumok gombamentes felülúszójának 100 µl-ét adtuk.

Lipopoliszachariddal (LPS) történő indukció

Az LPS-sel történő indukcióhoz *Escherichia coli* Q26:B6 (Sigma-Aldrich) lipopoliszacharidot használtunk, 1 µg/ml végkoncentrációban.

5.6.3 Fagocitózis vizsgálat

A fagocitózis vizsgálatot 12 lyukú lemezekben végeztük, amelyre a monocita THP-1 sejteket a kísérletet megelőző napon osztottuk a mintahelyekbe, 10^5 sejt/ml koncentrációban. A makrofágok vizsgálatához a sejteket 24 lyukú lemezen, 3×10^5 sejt/ml koncentrációban indukáltuk a korábban leírt módon. A kísérlet előtt 4 órával a sejteket félszeres koncentrációban festettük 15 percen át CellMask Deep Red Plasma Membrane stain (Thermo Scientific) festékkel, majd kétszer mostuk 37 °C-ra előmelegített PBS-sel.

A konídiumokat AlexaFluor 488 karboxilsav, szukcinimidil észterrel (Thermo Scientific) festettük 4 °C-on 15 percre, majd kétszer mostuk PBS-sel. Az interakcióhoz 1:2 vagy 20:1 (E:T) arányban fertőztük a sejteket. Az inkubációs idő lejártá után a sejteket felmostuk, majd 15 perc 1000 rpm-en történő centrifugálás után 200 µl FACS pufferben felfuszpendáltuk. A mérést FlowSight Imaging Flow Cytometer-rel (Amnis) végeztük, az adatokat IDEAS Software (Amnis) segítségével értékeltük ki.

5.6.4 Enzimhez kapcsolt immunoszorbens vizsgálatok (ELISA)

Az interakciók során a sejtekből felszabaduló citokinek mennyiségét ELISA eljárással határoztuk meg, a következő kitéket használva: Human TNF- α DuoSet ELISA Kit (R&D Systems), Human IL-1 β DuoSet ELISA Kit (R&D Systems), Human IL-6 DuoSet ELISA Kit (R&D Systems), Human IL-8 DuoSet ELISA Kit (R&D Systems) és Human IL-10 ELISA (Immunotools). A méréseket a gyártók utasításai szerint végeztük. A mosást minden esetben négyszer végeztük ELISA mosó pufferrel. Az elsődleges antitestet 96 lyukú NUNC Immuno-plate F96 MaxiSorp (Thermo Scientific) lemezre vittük fel egy éjszakán át történő szobahőmérsékletű inkubálással. A lemezeket mosás után ELISA pufferrel 1 órán át

blokkoltuk. Újabb mosás után a mintahelyekre felvittük az ELISA pufferben hígított citokin standardokat vagy a mintákat 2 technikai párhuzamosban, majd szobahőmérsékleten 2 órán át inkubáltuk. Mosást követően adtuk hozzá a másodlagos, biotinált antitestet a mintákhoz, amelyet 2 órán át, szobahőmérsékleten kötöttünk fel. Mosás után ELISA pufferben hígított sztreptavidin-HRP oldatot mértünk a mintahelyekbe. 20 perc inkubálás után mostuk a mintákat és 100 µl friss ELISA szubsztrát oldatot adtunk hozzájuk. A megfelelő színintenzitás elérése után 100 µl ELISA stop oldattal állítottuk le a reakciót. A fényelnyelést 450 nm-en, SPECRTOSTar Nano Microplate Reader (BMG Labtech) segítségével határoztuk meg. Az adatokat a MARS Data Analysis szoftverrel (BMG Labtech) elemeztük. A citokinek mennyiségi meghatározásához négy paraméteres logisztikus modell alapján létrehozott standard görbét használtunk.

5.6.5 Gomba életképesség meghatározás

Az immunsejt-gomba interakciókat követő hifakárosodás mértékét MTT (3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólium-bromid) vizsgálattal határoztuk meg. A metabolikusan aktív sejtek a sárga színű MTT-t kék formazán-kristályokká alakítják át, amelyek a gomba sejtfalába épülnek be. A vizsgálatoknál meghatározott interakciós idő leteltével a lemezek mintahelyeiről a felülúszót eltávolítottuk, majd a sejteket 0,5%-os nátrium-deoxikolát hozzáadásával lizáltuk. A sejtörmeléket PBS-sel történő mosással távolítottuk el, majd 200 µl vagy 1 ml, a kísérletnek megfelelő pufferben vagy tápoldatban oldott, 0,5%-os (m/V) MTT (Sigma) hozzáadása után a lemezeket 37 °C-on 3 órát inkubáltuk. Ezután a mintákat háromszor mostuk PBS-sel, majd egy éjszakán át -20 °C-on tároltuk. Ezt követően 200 µl savas izopropanolt (19:1 arányú izopropanol és HCl) adtunk a gombákhoz, majd a formazán-kristályok feloldódásáig inkubáltuk szobahőmérsékleten. A felülúszót új mikrotiterlapra vittük át, majd a fényelnyelést 550 nm-en mértük SPECTROStar Nano Microplate Reader (BMG Labtech) készülékkel. Az életképességet a következő képlet alapján számoltuk, ahol OD_{550} minta a sejtekkel ko-inkubált hifára vonatkozó fényelnyelés, míg OD_{550} kontroll a sejtek nélkül inkubált hifa esetében mért fényelnyelés:

$$\text{Életképesség} = \left(\frac{OD_{550} \text{ minta}}{OD_{550} \text{ kontroll}} \right) \times 100.$$

5.6.6 Mieloperoxidáz (MPO) aktivitás mérése

A neutrofil granulocitákból felszabaduló mieloperoxidáz mennyiségének meghatározását 96-lyukú lemezen végeztük. Az MPO felszabadulást a ko-inkubáció 30. és 60. percében mértük a sejtmentes felülúszóból. A reakcióelegy a következő összetevőket tartalmazta: 30 µl minta, 150 µl szubsztrát oldat / inhibitoros szubsztrát oldat. A reakcióelegyet 5 percig 37 °C-on inkubáltuk, majd a reakciót 70 µl ELISA stop oldat hozzáadásával állítottuk le. A mérést 450 nm-en végeztük SPECTROstar Nano Microplate Reader (BMG Labtech) készülékkel. Kontrollként vizsgáltuk a neutrofil granulociták spontán mieloperoxidáz termelését, amelyhez fertőzés nélküli sejteket használtunk. A számolás során a hozzáadott szubsztrátot tartalmazó minták OD_{450nm} értékéből kivontuk az inhibitoros minták OD_{450nm} értéket, így megkapva a kizárólag MPO aktivitásból származó értékeket. A mennyiségi meghatározáshoz Recombinant Human Myeloperoxidase Protein, CF (R&D) hígítási sorából felvett standard görbét használtunk.

5.6.7 Reaktív oxigéngyökök (ROS) mérése

Az extracelluláris H₂O₂ termelést Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit-tel (Thermo Scientific) mértük, a gyártó leírása alapján. A minták méréséhez használt excitációs és emissziós hullámhossz 560 és 590 nm volt. A mérést a ko-inkubáció 30. és 60. percében végeztük Fluostar Optima (BMG Labtech) készülékkel. A mérések során kontrollként vizsgáltuk a neutrofil granulociták fertőzés nélküli, spontán extracelluláris H₂O₂ termelését. A kiértékelés során a 30 és 60 perc elteltével mért értékekből kivontuk a spontán felszabaduláskor mért értékeket. A mennyiségi meghatározáshoz H₂O₂ hígítási sorból mért értékekből felvett standard görbét használtunk.

5.6.8 NET képzés vizsgálata

A neutrofil granulociták által létrehozott extracelluláris csapdát (NET) az interakció harmadik órájában, CELLview (Greiner Bio-One) csészén vizsgáltuk. A mintákat 1% formaldehid oldattal 15 percig fixáltuk. A festéseket nátrium-citrát pufferben, szobahőmérsékleten, fénytől védve végeztük. A DNS-t 167 nM SYTOX Green-nel (Life Technologies) 30 percig, a kitint 5 µg/ml koncentrációjú Calcofluor White-tal (Cyanamid) 15 percig, a sejtmembránt félszeres koncentrációjú CellMask Deep Red plazma membrán

festékekkel (Life Technologies) 15 percig festettük. A festési lépések között és a festés után a mintákat kétszer mostuk nátrium-citrát pufferrel.

A mikroszkópos vizsgálatot Zeiss Axio Observer fluoreszcens inverz mikroszkóppal végeztük. A NET képzésben részt vevő sejtek százalékos arányát ImageJ képanalízissel határoztuk meg Gonzalez és mtsi. (Gonzalez és mtsi. 2014) által leírt protokoll alapján kisebb módosítással. Röviden a SYTOX Green által megfestett terület kiterjedését határoztuk meg minden fókuszban lévő sejt esetében, amely alapján a sejteket 3 csoportba osztottuk: az intakt sejtmag esetében a DNS kiterjedése kisebb vagy egyenlő, mint $50 \mu\text{m}^2$, felbomlott sejtmagmembrán esetén $50\text{-}90 \mu\text{m}^2$, míg netotikus sejt esetén nagyobb, mint $90 \mu\text{m}^2$. Az egyes körülmények vizsgálatára minimum 6 képet elemeztünk.

5.6.9 Az extracelluláris pH meghatározása

Az extracelluláris pH-t, a gomba-neutrofil granulocita interakció 3. órájában, a sejtmentes felülúszóban határoztuk meg kalibrációs egyenes segítségével. A kalibrációs egyenes felvételéhez különböző pH-jú mKRPG puffert használtunk. A felülúszó $100 \mu\text{l}$ -éhez $5 \mu\text{l}$ 2% lakmusz oldatot (CPAChem) adtunk 96 lyukú lemezen, a színváltozást 580 nm-en SPECTROstar Nano Microplate Reader (BMG Labtech) segítségével mértük.

5.6.10 A melanin tisztítása és vizsgálata

A *C. lunata* neutrofil granulocitákkal való interakciója, valamint a gomba mKRPG közegben történő tenyésztése során vizsgáltuk a melanin termelést. Az interakcióból származó tápközeget 6000 rpm-en 10 percig centrifugáltuk, a tenyésztésből származó mKRPG-t pedig gézlapon szűrtük. A felülúszókat tömény HCl hozzáadásával pH = 2-ig savanyítottuk, amely hatására a melanin kiválása figyelhető meg. A savanyítás után a felülúszókat $0,2 \mu\text{m}$ poli(tetrafluoroetilén) (PTFE) membránszűrőn szűrtük (Goncalves, Lisboa and Pombeiro-Sponchiado 2012), amellyel a csapadék felfogható.

5.6.11 RNS izolálás, cDNS szintézis és kvantitatív valós idejű reverz transzkripció (qRT) PCR analízis

qRT-PCR sejttenyészetből

A THP-1 sejtekből történő totál RNS izoláláshoz RNeasy Mini kitet (Qiagen) használtunk, a gyártó utasításai alapján. Az eluálási térfogat 20 µl volt. Az izolált RNS tisztaságát és koncentrációját ND-1000 Spectrophotometer (Nano Drop) ellenőriztük.

A reverz transzkripcióhoz SuperScript VILO Master Mixet (Invitrogen) használtunk a gyártó utasításai szerint.

A relatív transzkripciók szintek meghatározása StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) segítségével történt. A reakciókat TaqMan Gene expression Master Mix (Applied Biosystems) vagy Sybr Select Master Mix (Applied Biosystems) felhasználásával mértük össze. Az indítószekvenciákat és a próbákat a 2., illetve a 3. táblázat foglalja össze. A relatív transzkripciók szinteket 18S rRNS-re normalizálva, $\Delta\Delta C_T$ ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) módszerrel (Livak and Schmittgen 2001) számoltuk ki.

2. táblázat: a THP-1 sejttenyészeteknél alkalmazott indítószekvenciák összefoglaló táblázata.

Target gén	Forward (5' -3') indítószekvenciák	Reverz (5' -3') indítószekvenciák
<i>CCR1</i>	TCTACGCCTTCGTTGGTGAG	TTTAACCAGGTGCACAGCCA
<i>CCR2</i>	TACCAACGAGAGCGGTGAAG	GCATGTTGCCCACAAAACCA
<i>CCR5</i>	TTACTGTCCCCTTCTGGGCT	AAGCAAACACAGCATGGACG
<i>CXCR2</i>	TTTCGCCATGGACTCCTCAA	GTAGTGGAAGTGTGCCCTGA
<i>IL1B</i>	AGCTGGAGAGTGTAGATCCCAA	GGGAACTGGGCAGACTCAAA
<i>ITGAL</i>	GCAAGGACATACCGCCCAT	TACTCAGGCTCAGCTCCACA
<i>ITGAM</i>	AGTCTGCCTCCATGTCCAGAA	CTGCGTGTGCTGTTCTTTGTC
<i>ITGAX</i>	AGTCTGCCTCCATGTCCAGAA	CTGCGTGTGCTGTTCTTTGTC
<i>HLADRA</i>	CCGATCACCAATGTACCTCCA	CGAAGCCACGTGACATTGAC

3. táblázat : A THP-1 sejttenyészeteknél használt TaqMan próbák azonosítói.

Target gén	TaqMan azonosító
18S rDNA	Hs99999901_s1
<i>IL10</i>	Hs00961522_m1
<i>IL6</i>	Hs00174131_m1
<i>IL8</i>	Hs00174103_m1
<i>TNFA</i>	Hs00174128_m1
<i>NLR3</i>	Hs01054716_m1

qRT-PCR a gomba sejtekből

A gombából történő totál RNS izoláláshoz NucleoSpin RNA Plant kitet (Macherey-Nagel) használtunk. A folyadéktenyészetből a gombahifát gézen való átszűréssel összegyűjtöttük, majd folyékony nitrogénben eldörzsöltük. Az RNS-t a gyártó utasításai alapján izoláltuk. Az eluálási térfogat 50 µl volt. Az RNS tisztaságát és koncentrációját ND-1000 Spectrophotometer (Nano Drop) ellenőriztük.

A reverz transzkripciót Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis kittel (Thermo Scientific) végeztük. Az átíráshoz qRT-PCR reakciónként 500 ng RNS-ből indultunk ki. A szintézishez oligo(dT)18 és random hexamer primereket használtunk a gyártó utasítása szerint.

A relatív transzkripció szintek meghatározásához valós idejű PCR reakciót használtunk. A reakciókat Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific) felhasználásával mértük össze, a gyártó utasításai alapján. A felhasznált indítószekvenciákat az 4. táblázat foglalja össze. A relatív transzkripció szinteket a *C. lunata* aktin génre normalizálva, $\Delta\Delta C_T$ ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) módszerrel (Livak és Schmittgen 2001) számoltuk ki.

4. táblázat : A *C. lunata*-nál használt indítószekvenciák összefoglaló táblázata

Target gén	Forward (5' -3') indítószekvenciák	Reverz (5' -3') indítószekvenciák
<i>Aktin</i>	CAAGTCCAACCGTGAGAAGATG	TAGTCAGTCAGATCACGACCAG
<i>HPO1</i>	CTACAAACACCAACGACATCC	GTTTAGCTCCTCGGAAATCAC
<i>HPO2</i>	GCTACTACAACAGACCCTCAG	CACAACCTCCAGAGAACAACC
<i>HPO3</i>	TACCGCCAATACTTTCTCTCT	TGGTTTCCAATTTACCGTCTG
<i>HPO4</i>	GTACCTCTTTCTCGCCATTGTC	GGAATAGCCAGGTAAGAGTTGGA
<i>HPO5</i>	CTAGCTCATTTGACGGCTTCC	GTTCCAACAGGCTTCCTAGAC
<i>HPO6</i>	TCCCAAATCATTGCTACCTCCA	CAAGTTCCCGATGATGCCAG
<i>HPO7</i>	CATTGCCTCCTATATCTTTGACTG	GGACAAAGACAAGACAGACGA
<i>HPO8</i>	GACCGCGTCTCTTTCTTGTG	ATTGCCCCTGCGAACATGAG

5.7 Statisztikai analízis

A kísérleteket két technikai és három biológiai párhuzamosban végeztük. Az adatokat Microsoft Excel és GraphPad Prism 7 szoftverek segítségével elemeztük. A szignifikancia értékeket páros t-próbával, többszörös t-próbával (hamis találati aránnyal, $Q = 10\%$), kétszemponos ANOVA teszttel vagy Kruskal-Wallis teszttel határoztuk meg. $P \leq 0,05$ (* $p < 0.05$ **** $p < 0.0001$) érték esetében tekintettük az eredményeket szignifikánsnak.

5.8 *In silico* szekvencia elemzés

A haloperoxidáz szerű fehérjéket kódoló géneket a *C. lunata* genomadattárisában (<https://genome.jgi.doe.gov/Coclu2/Coclu2.home.html>; (Ohm és mtsi. 2012, Condon és mtsi. 2013) végzett keresés alapján azonosítottuk. A szekvenciákat Expassy MyHits motívum kereső programmal (<https://myhits.isb-sib.ch>; (Pagni és mtsi. 2007) és NCBI blastP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) programmal elemeztük.

6 Eredmények és értékelésük

Kísérleteinkben az *A. fumigatus*-t használtuk kontrollként, hiszen a fonalas gombákra adott immunválasz kutatásában ez a faj az általánosan alkalmazott modellorganizmus és így a legtöbb információ is erről a fonalas gombáról áll rendelkezésünkre.

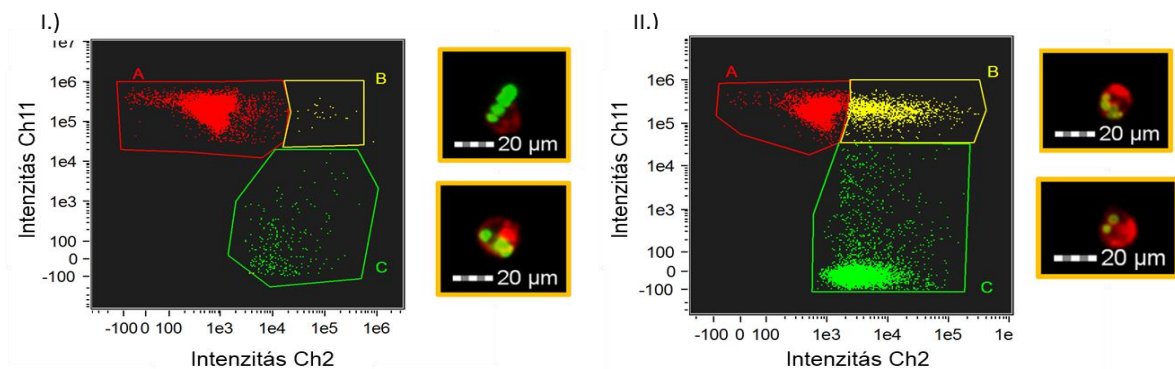
6.1 Monociták válasza *Curvularia* izolátumokra

A THP-1 monociták válaszát a *Curvularia* izolátumokra az interakció 1., 3. és 24. órájában vizsgáltuk. A gomba a fertőzéstől számított 1. órában még konídium, a 3. órában csírázó konídium állapotban van (utóbbi esetben tehát megjelenik a fonalas csíratömlő, a csírázás folyamata a leoltástól számítva körülbelül 90 perc elteltével kezdődik), míg a 24. órában már elágazó hifák is megfigyelhetők.

6.1.1 A THP-1 sejtek *C. lunata* konídiumokra adott válasza

A *C. lunata* konídiumokkal történő interakcióban a sejtek fagocitáló képességét, aktivációját és citokintermelését vizsgáltuk élő és hőinaktivált konídiumok használatával.

Az élő konídiumokkal fertőzött sejtek esetében a fagocitózist egy óra elteltével vizsgáltuk (E:T = 20:1). A sejtek csupán 0,12(±0,1)%-a mutatott pozitív eredményt a fagocitózis tekintetében, ezen események többsége viszont inkább csak sejt-konídium kapcsolat volt, mint tényleges bekebelezés (10/I. ábra).



10. ábra: A THP-1 monociták fagocitáló képessége I.) *C. lunata* (E:T = 20:1) és II.) *A. fumigatus* (E:T = 1:2) konídiumokkal szemben 1 óra elteltével. Az ábrákon az A (piros) populáció a monocitákat, a B (sárga) a konídiumokkal interakcióban lévő sejteket, míg a C (zöld) a konídiumokat jelenti. A tengelyek a piros (Ch11) és zöld (Ch2) fluoreszcencia intenzitást jelölik. A sárga keretbe foglalt fluoreszcens felvételek a konídiumok és sejtek interakcióit mutatja, ahol zöld színnel a konídium, pirossal a monocita látható.

Kontrollként végrehajtottuk a fagocitózis vizsgálatot *A. fumigatus* konídiumokkal szemben is. A fertőzést elvégeztük a szakirodalomban általánosan használt 1:2 (Loeffler és mtsi. 2009) valamint a *C. lunata*-nál általunk használt 20:1 effektor:target arányban is. Egy óra elteltével a fagocitáló sejtek aránya E:T = 1:2 esetében $20,7(\pm 2,5)\%$ az E:T = 20:1 esetében $2,4(\pm 0,4)\%$ volt (10/II. ábra). Az *A. fumigatus* csírázási ideje a 6. órára tehető, a fagocitózis mértékét 3 óra elteltével vizsgálják a szakirodalmi adatok szerint (Loeffler és mtsi. 2009).

A *Curvularia* esetében a tényleges fagocitózis hiányát magyarázhatja a konídium mérete is, hiszen az *A. fumigatus* 2-3 μm -es spórái (Mullins és mtsi. 1976) elég kicsik, hogy a sejtek akár több konídiumot is képesek legyenek internalizálni (10/II ábra), azonban a *C. lunata* 20-30 μm -es (Kusai és mtsi. 2016, Stappers és mtsi. 2018) konídiumai ezt nem teszik lehetővé (10/I. ábra).

A szakirodalmi adatok alapján a melanin egyes fajok, mint például *C. neoformans* esetében gátolhatja a fagocitózist (Wang és mtsi. 1995), más fajoknál, mint az *E. dermatitidis*, erre a folyamatra nem volt hatással (Schnitzler és mtsi. 1999). *A. fumigatus* konídiumainak felismerésében a melaninhoz kötődő MelLec receptor fontos szerepet játszik (Stappers és mtsi. 2018). A *C. lunata* konídium falának részletes felépítése és benne a melanin helyzete nem ismert. Mivel a melanin hatása a fagocitózisra fajonként eltérő, ezért feltételezhetjük, hogy a *C. lunata* esetében a pigment akár gátolhatja is a sejtek általi felismerést. A hipotézis teszteléséhez a fagocitózist olyan hőinaktivált konídiumokkal is megvizsgáltuk, melyeket melanin bioszintézist gátló körülmények közt nevelt *C. lunata* tenyészetéről mostunk le (5.4.1. fejezet).

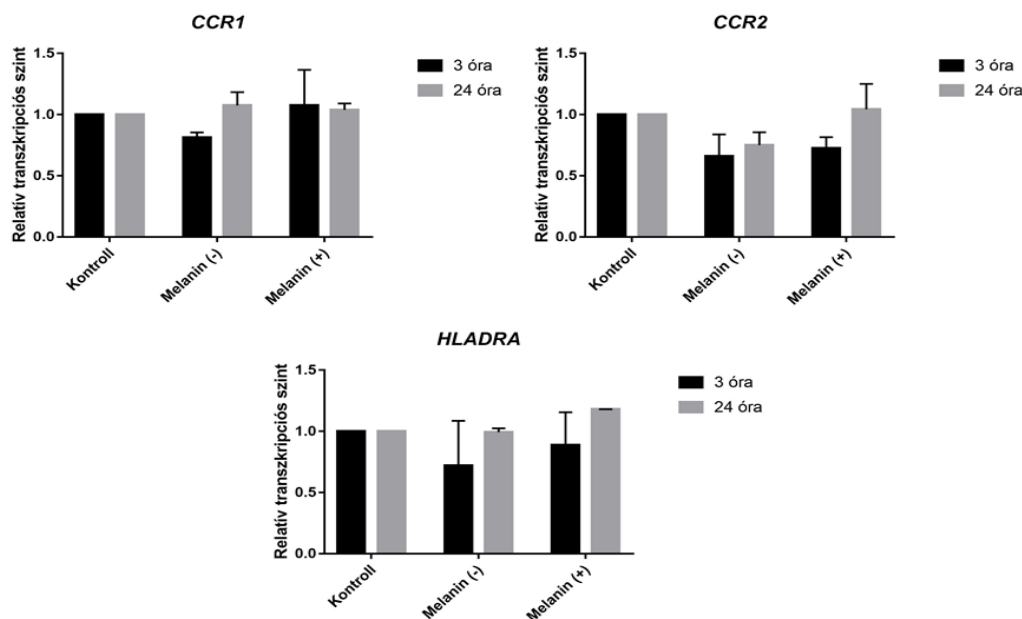
A hőinaktivált konídiumokkal végzett fagocitózis vizsgálatban a sejteket 3 órán át együtt inkubáltuk a monocitákkal (E:T = 20:1). Ez esetben a sejtek $0,35(\pm 0,2)\%$ -ánál mértünk pozitív eredményt. A melanin felhalmozódásának hiánya a sejtfalban nem befolyásolta a monociták fagocitáló képességét: az ilyen konídiumokkal végzett interakciós kísérletben a sejtek $0,69(\pm 0,1)\%$ -ánál tapasztaltunk interakciót.

Összefoglalva a fentiek elmondható, hogy míg a korábbi vizsgálatokkal összhangban (Loeffler és mtsi. 2009) a THP-1 sejtek aktívan fagocitálták az *A. fumigatus* konídiumokat, nem voltak képesek erre a *Curvularia* konídiumok esetében és ez a jelenség nem függött a konídiumok melanizáltságától. Feltételezésünk szerint a kétféle gombára jellemző

konídiumok markánsan eltérő mérete és sejtfal összetétele lehet az egyik magyarázata a monociták velük szemben tanúsított eltérő fagocitáló képességére.

A monociták és *C. lunata* konídiumok közötti csekély interakció ellenére megvizsgáltuk ezen sejtek konídiumok által kiváltott aktivációját és citokintermelését. Hőinaktivált konídiumokat adtunk a THP-1 sejtekhez, majd 3 és 24 óra elteltével mértük az aktivációhoz és a citokintermeléshez kötődő gének kifejeződését, valamint egyes citokinek mennyiségét.

A monocita sejtek gomba szignálok jelenlétében képesek aktiválódni, amely során az érfalon való átlépéshez, antigén prezentációhoz szükséges molekulák kifejeződése figyelhető meg (Shi és Pamer 2011). Az aktiváció vizsgálatához a *CCR1*, *CCR2*, és *HLADRA* géneket választottuk ki (11. ábra).

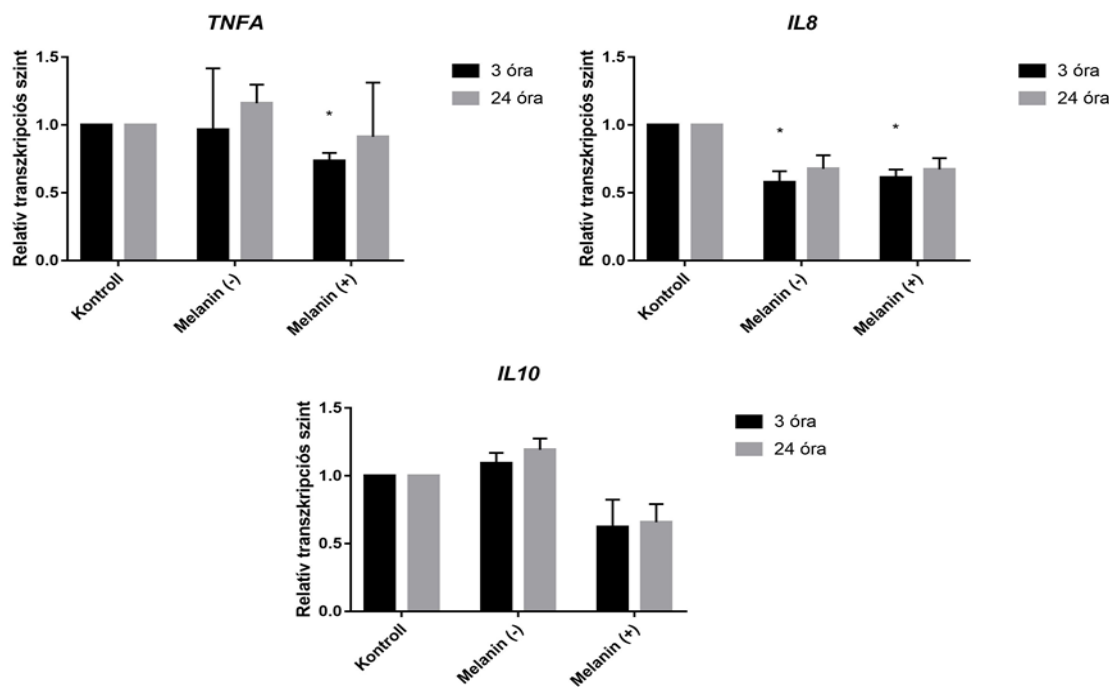


11. ábra: A THP-1 monociták aktivációt jelző génjeinek transzkripció változása *C. lunata* melanizált [melanin (+)] és melanin gátolt [melanin (-)] hőinaktivált konídiumainak hatására. A relatív transzkripció szinteket $\Delta\Delta C_T$ ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) módszerrel határoztuk meg. A statisztikai analízist páros t-próbával végeztük el az azonos időpontban mért sejtes kontrollhoz viszonyítva, $n = 3$.

THP-1 sejtek esetén a *CCR1* gén transzkripciója nem, azonban a *CCR2* géné alulszabályozást mutat aktiváció esetén (Phillips és mtsi. 2005). Aktiváció előtt a monociták kevésbé hatékony stimulátorai a T sejteknek, köszönhetően az alacsony MHCII expresszióknak (Laupeze és mtsi. 1999). Az MHCII molekulát kódoló *HLADRA* gén felülszabályozása is utal a THP-1 monociták aktivációjára, valamint az antigén prezentáció

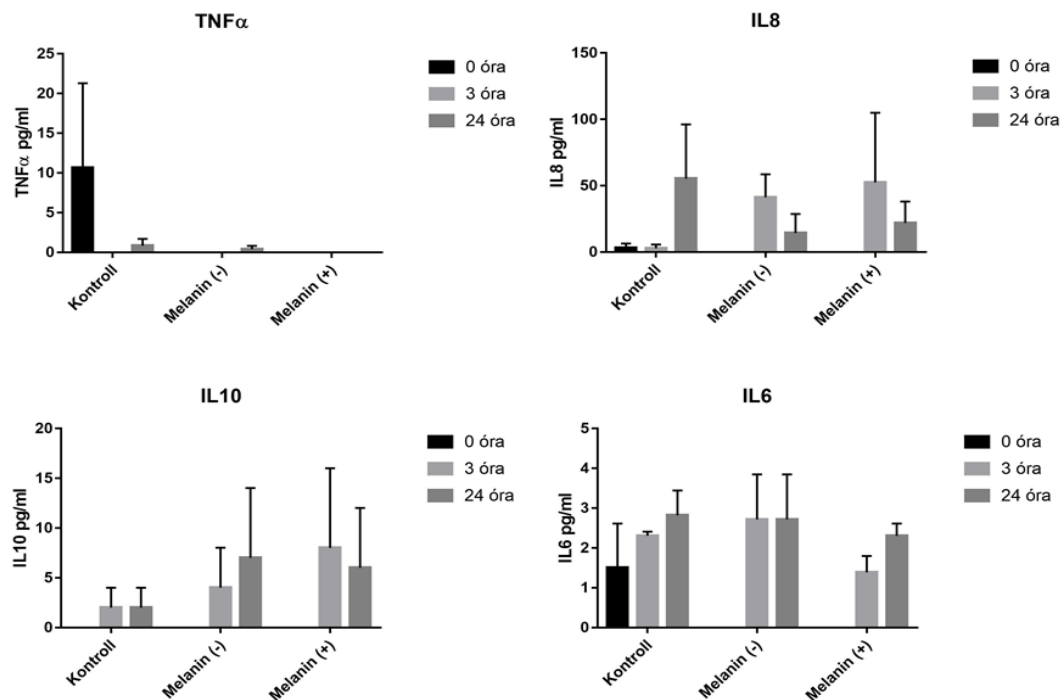
jelenlétére is következtethetünk a transzkripció változásból (Baqui és mtsi. 1999). Sem a melanizált, sem pedig a melanin gátolt *C. lunata* konídiumok nem váltottak ki az aktivációra jellemző transzkripció változást a vizsgált génekben (11. ábra).

A citokintermelést transzkripció és fehérje szinten is meghatároztuk. A vizsgált gének esetében nem tapasztaltunk transzkripció emelkedést, a melanizált konídiumok jelenléte *TNFA* és *IL8* gének szignifikáns alulszabályozását eredményezte 3 óra elteltével a kontroll sejtekhez viszonyítva. A melanin gátolt konídiumok esetében csak az *IL8* kifejeződésében tapasztaltunk szignifikáns csökkenést (12. ábra).



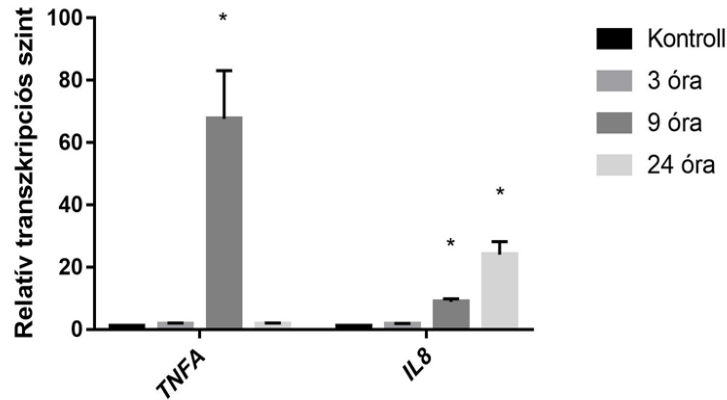
12. ábra: A THP-1 monociták citokint kódoló génjeinek transzkripció változása *C. lunata* melanizált [melanin (+)] és melanin gátolt [melanin (-)] hőinaktivált konídiumok jelenlétében. A relatív transzkripció szinteket $\Delta\Delta C_T$ ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) módszerrel határoztuk meg. A statisztikai analízist páros t-próbával végeztük el az azonos időpontban mért sejtes kontrollhoz viszonyítva, $n = 3$.

A génexpressziós értékeknek megfelelően a konídiumok jelenlétében nem mutattunk ki jelentős változást a $TNF\alpha$, IL8, IL6 és IL10 citokinek termelésében a kontroll körülményekhez képest (13. ábra).



13. ábra: A THP-1 monociták citokin termelése *C. lunata* melanizált [melanin (+)] és melanin gátolt [melanin (-)] hőinaktivált konídiumok jelenlétében. A fehérjék mennyiségét ELISA-val határoztuk meg, pg/ml koncentrációban ábrázoltuk. A statisztikai analízist Kruskal-Wallis teszttel végeztük az azonos időpontban mért sejtes kontrollhoz viszonyítva, n = 3.

A *C. lunata* konídiumokkal a monociták elenyésző százaléka került interakcióba, a hőinaktivált konídiumokkal 3 órán át együtt inkubált sejtek esetében is alacsony interakciós százalékot mértünk. Az aktiváció és a citokintermelés hiánya magyarázható a fagocitózis hiányával, azonban a fagocitózis nem minden esetben vált ki citokintermelést. Például az *A. fumigatus* konídiumok internalizációja ugyan megtörténik, de a szakirodalmi adatok szerint a citokinek génjeinek expressziójában ez a folyamat nem okoz változást (Loeffler és mtsi. 2009). Kontrollként megvizsgáltuk az *A. fumigatus* élő konídiuminak és hifáinak jelenlétében a TNF- α és IL8 citokinek kódoló gének relatív transzkripció szintjét, ahol a hifák képesek voltak kiváltani a gének felülszabályozását (14. ábra). A tenyésztés 9. órájában az *A. fumigatus* fiatal hifái, míg a 24. órában elágazó hifái voltak jelen.

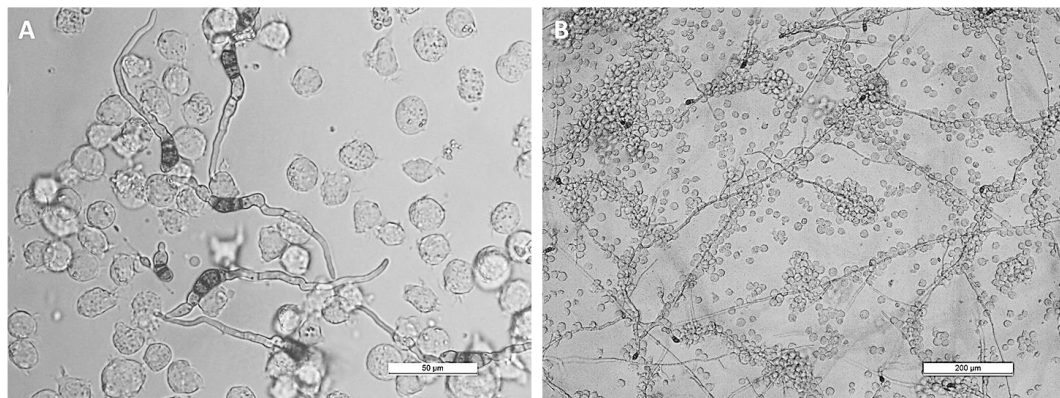


14. ábra: THP-1 monociták TNF α és IL8 citokineket kódoló g \acute{e} njeinek relatív transzkripciós változása *A. fumigatus*-sal történő interakció 3., 9. és 24. órájában. A relatív transzkripciós szinteket $\Delta\Delta C_T$ ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) módszerrel határoztuk meg. Kontrollként azonos körülmények között tartott, kezeltlen sejteket használtunk. A statisztikai analízist páros t-próbával végeztük el az azonos időpontban mért sejtes kontrollhoz viszonyítva, n = 3.

6.1.2 A THP-1 sejtek *Curvularia* hifákra adott válasza

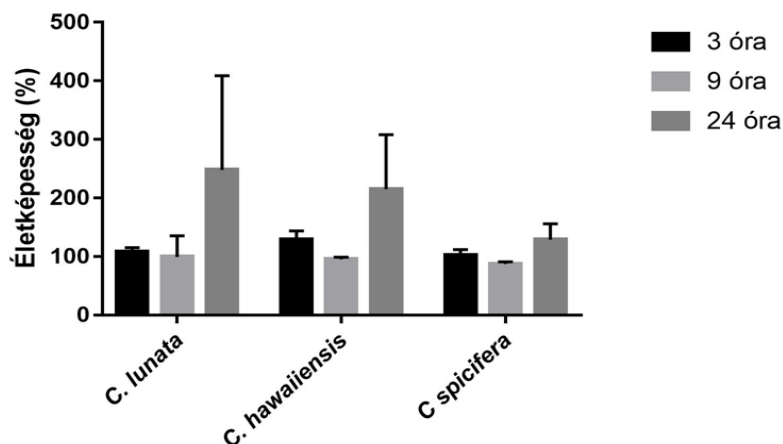
A THP-1 monociták hifákra adott válaszána vizsgálatánál mikroszkópos vizsgálatot végeztünk a fertőzés 3. és 24. órájában és ugyanezen időpontokban vizsgáltuk a sejtek aktivációját és citokin termelését is. Összehasonlításképpen a kísérletekbe, a *C. lunata* mellett, a *C. hawaiiensis* és a *C. spicifera* egy-egy klinikai izolátumát is bevontuk.

A *Curvularia* hifák jelenlétében végzett mikroszkópos vizsgálatokból kiderül, hogy a monociták csak a *C. lunata* esetében aggregálódnak a hifa köré 24 óra után. Ez a jelenség a többi törzs esetében nem volt megfigyelhető, valamint a fertőzés korai szakaszában (3 óra után) egyik törzsre sem tapasztaltuk ezt a válaszreakciót (15. ábra).



15. ábra: THP-1 monociták és *C. lunata* interakciója 3 óra (A) és 24 óra (B) után. A méretskála az A kép esetében 50 μ m-t, a B kép esetében 200 μ m-t jelöl.

Mivel a monociták rendelkeznek a patogének eliminálásához szükséges ölési mechanizmusokkal, ezért a sejtek gombákkal szembeni ölési hatékonyságának vizsgálatához az interakciót követően meghatároztuk a gombák életképességét.



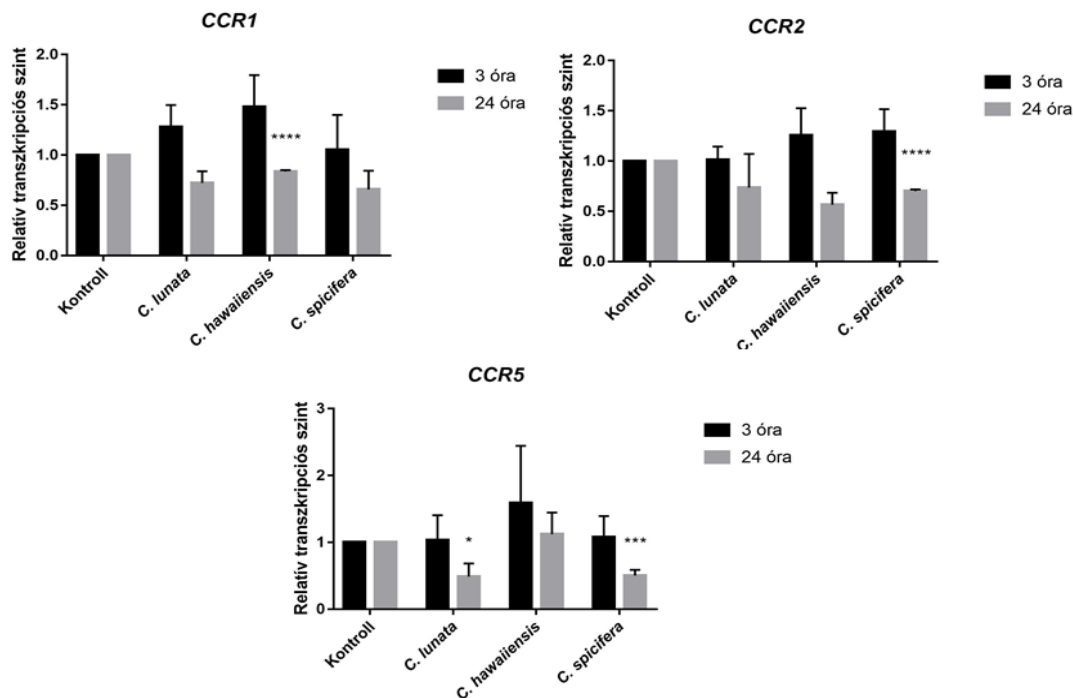
16. ábra: *Curvularia* izolátumok életképessége THP-1 monocitákkal való interakció után. Az életképességet a kezeltetlen gombakontrollhoz viszonyított százalékos értékben fejeztük ki. A vizsgálatot MTT-tesztel végeztük.

A *Curvularia* izolátumok esetében nem tapasztaltunk csökkenést az életképességben (16. ábra). A kontrollként használt *A. fumigatus* életképessége 12,9%-ra csökkent a monocitákkal történt 24 órás interakció után.

Más sejttypusoknál, például makrofágoknál ismert, hogy a gomba körüli sejtszortosulás megakadályozza a gomba további szöveti terjedését (Behnsen és mtsi. 2007). *C. lunata* esetében ugyan megfigyelhető volt a monociták csoportosulása, azonban a gomba sok esetben túlnőtte az aggregáció helyét (15/B. ábra). A magasabb életképesség ebben az esetben feltételezhetően a gyorsabb növekedési ütemmel magyarázható.

Akárcsak a konídiumok esetében, a hifákra adott válasznál is megvizsgáltuk a monocita sejtek aktivációját. Ebben az esetben több gént is bevontunk a vizsgálatokba.

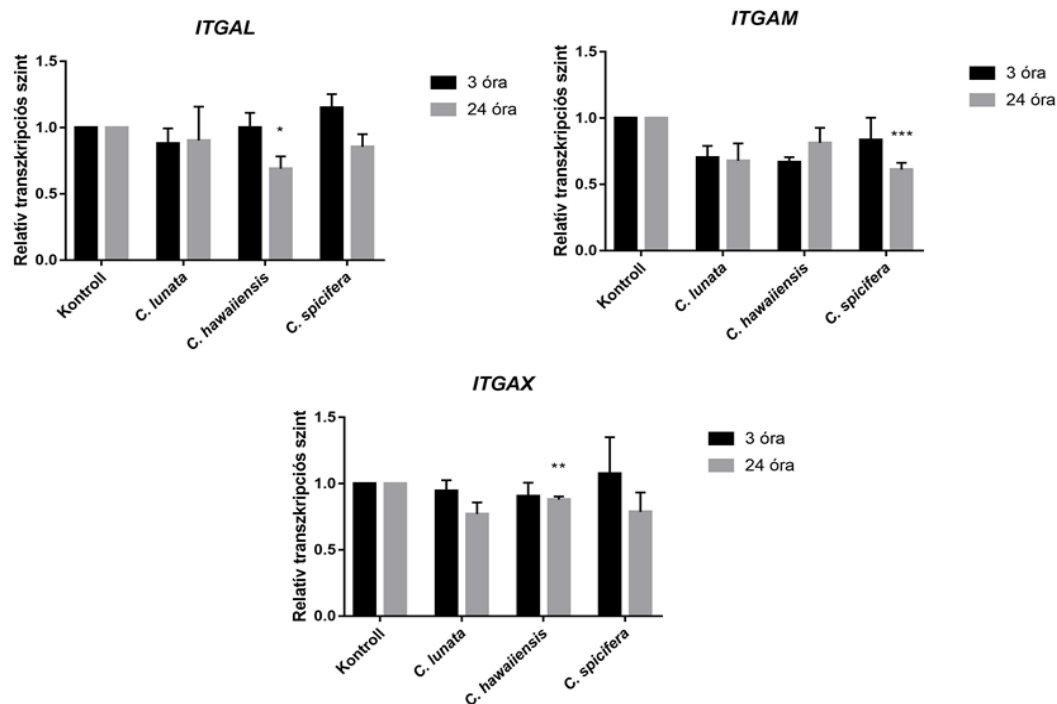
A konídiumoknál is vizsgált *CCR1* és *CCR2* gének mellett a *CCR5* gén kifejeződését is vizsgáltuk (17. ábra), amely a *CCR1*-hez hasonlóan, a THP-1 aktiváció során nem kerül gátlás alá (Phillips et al. 2005).



17. ábra: A THP-1 monociták aktivációját jelző *CCR* gének relatív transzkripció szintje. A relatív transzkripció szinteket $\Delta\Delta C_T$ ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) módszerrel határoztuk meg. Kontrollként azonos körülmények között tartott, kezeletlen sejteket használtunk. A statisztikai analízist páros t-próbával végeztük el az azonos időpontban mért sejtes kontrollhoz viszonyítva, $n = 3$.

A *CCR2* gén alulszabályozása a *C. hawaiiensis* és *C. spicifera* esetében 24 óra elteltével megfigyelhető, azonban a *CCR1* és *CCR5* gének relatív transzkripció szintjében is csökkenést tapasztaltunk, amely mintázat nem jellemző a THP-1 aktiváció során (17. ábra).

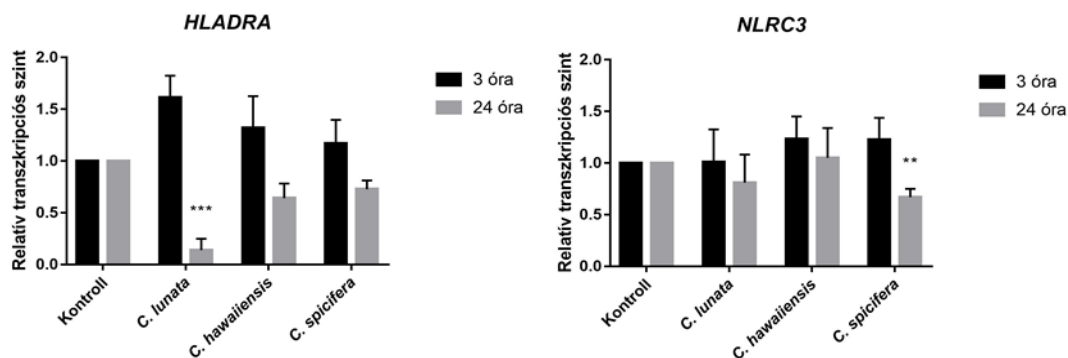
A CD11 molekulák az endotél sejtekkel való kapcsolat kialakításában szerepet játszó integrinek, amelyek mennyisége az aktiváció során megemelkedik. A CD11a, CD11b és CD11c molekulák mennyiségéből következtetni lehet a differenciáció irányára is (Ammon et al. 2000) Ezen molekulákat kódoló *ITGAL*, *ITGAM* és *ITGAX* gének relatív transzkripció szintje nem mutatott emelkedést a gombák jelenlétében (18. ábra). Az eredményekből arra következtethetünk, hogy a *Curvularia* izolátumok hifái önmagukban nem indítják el a monocita aktiváció és differenciáció folyamatát.



18. ábra: THP-1 monociták adhézióhoz köthető génjeinek relatív transzkripció szintjei. A relatív transzkripció szinteket $\Delta\Delta C_T$ ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) módszerrel határoztuk meg. Kontrollként azonos körülmények között tartott, kezeletlen sejteket használtunk. A statisztikai analízist páros t-próbával végeztük el az azonos időpontban mért sejtes kontrollhoz viszonyítva, $n = 3$.

Ezt az eredményt támasztja alá a konídiumok jelezésében is vizsgált *HLADRA* gén transzkripció mintázata is. A *C. lunata* esetében 3 óra után ugyan kismértékű transzkripció emelkedést látható, 24 óra után erőteljes alulszabályozás figyelhető meg. A 24 óra utáni transzkripció gátlás a *C. hawaiiensis* és *C. spicifera* jelenlétében is megmutatkozik (19. ábra). A monociták HLA-DR expressziójának csökkenése több tanulmány szerint is protektív immunválasz (Palojarvi és mtsi. 2013) és az immunszuppresszió kialakulásához vezet, amely a nozokomiális fertőzésekkel is összefüggésbe hozható (Drewry és mtsi. 2016, Manzoli és mtsi. 2016, Boeddha és mtsi. 2018).

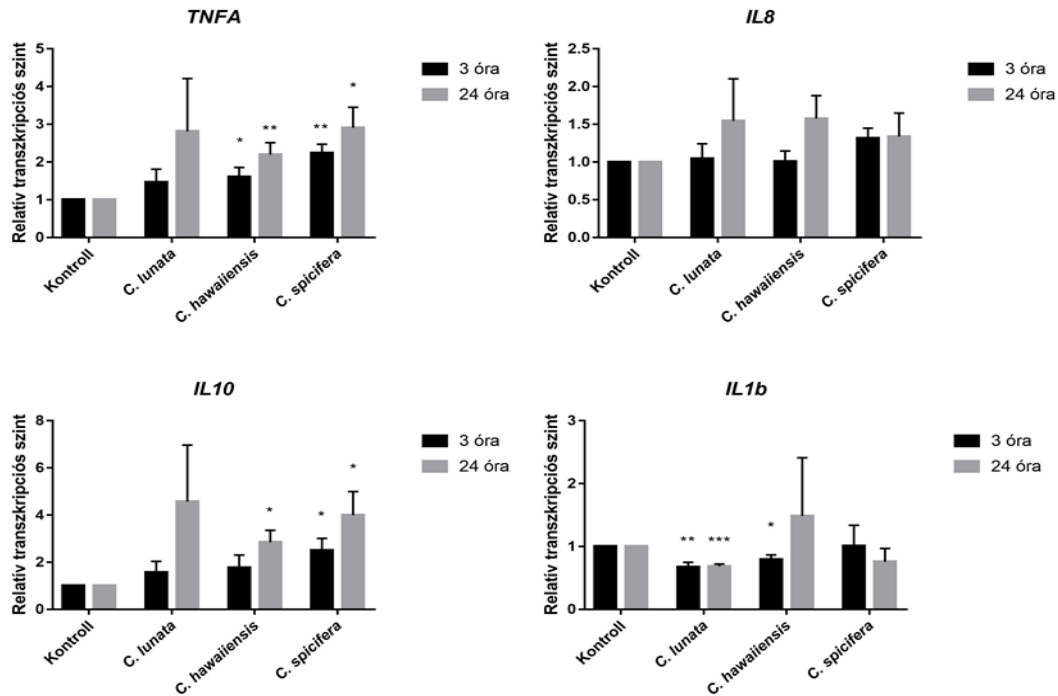
A gén által kódolt MHCII molekula részt vesz az antigén prezentációban (Busch és mtsi. 2005). A mikroszkópos vizsgálatoknál tapasztaltuk, hogy a monociták és a gombahifák között 3 óra után nem alakul ki sejt-sejt kapcsolat (15/A. ábra). A *HLADRA* 3 óra utáni transzkripció emelkedése nem utal antigén prezentációra. A *C. lunata* esetében 24 óra elteltével a sejtek a hifákhoz tapadnak (15/B. ábra), azonban ezen időpontban a *HLADRA* génben alulszabályozás látszik, amely az antigén prezentáció hiányára utalhat (19. ábra).



19. ábra: THP-1 monociták *HLADRA* és *NLRC3* génjeinek relatív transzkripció szintjei. A relatív transzkripció szinteket $\Delta\Delta C_T$ ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) módszerrel határoztuk meg. Kontrollként azonos körülmények között tartott, kezeletlen sejteket használtunk. A statisztikai analízist páros t-próbával végeztük el az azonos időpontban mért sejtes kontrollhoz viszonyítva, $n = 3$.

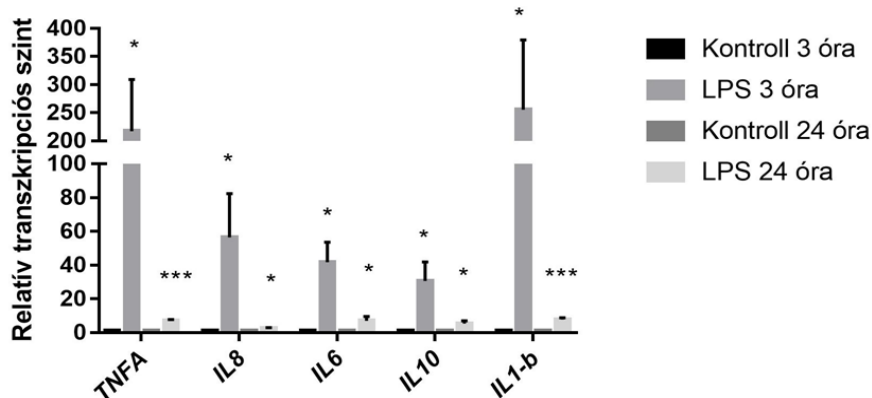
Az *NLRC3* molekula az immunválasz negatív szabályozója, amely az *NLRP3* inflammaszóma összeszerelődés gátlásával megakadályozza az *IL1 β* felszabadulást (Gultekin és mtsi. 2015). A molekulát kódoló gén relatív transzkripciójában nem mértünk emelkedést a *Curvularia* törzsek jelenlétében, *C. spicifera* esetében 24 óra elteltével szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető (19. ábra). Feltételezhető, hogy ez a molekula nem vesz részt a monociták válaszában a *Curvularia* fertőzések esetében.

A monociták citokin válaszát génexpressziós és fehérje szinten is vizsgáltuk. A gyulladásos citokinek közül a *TNFA*, *IL8*, *IL6* és *IL1B* gének relatív expressziós mintázatát vizsgáltuk a gombák jelenlétében. A *TNF α* -t kódoló gén expressziójában mindhárom vizsgált törzs jelenlétében emelkedést tapasztaltunk 24 óra elteltével, a *C. spicifera* és *C. hawaiiensis* már 3 óra után relatív transzkripció növekedést okozott a sejtekben. Az *IL8* génjének vizsgálatakor kismértékű, de statisztikailag nem szignifikáns emelkedést mértünk a vizsgált *Curvularia* törzsek általi 24 órás indukció hatására (20. ábra). Az *IL6* citokint kódoló gén esetében nem tapasztaltunk transzkripció változást. Az *IL1 β* génjének alulszabályozását mértük 3 és 24 órás *C. lunata*-val valamint 3 óra után *C. hawaiiensis*-szel való interakció után, a *C. spicifera* nem okozott szignifikáns változást a transzkripcióban. Az *IL10* antiinflammatorikus citokint kódoló gén vizsgálatakor erősebb transzkripciót mértünk mindhárom gombatörzs hatására 24 óra elteltével (20. ábra).



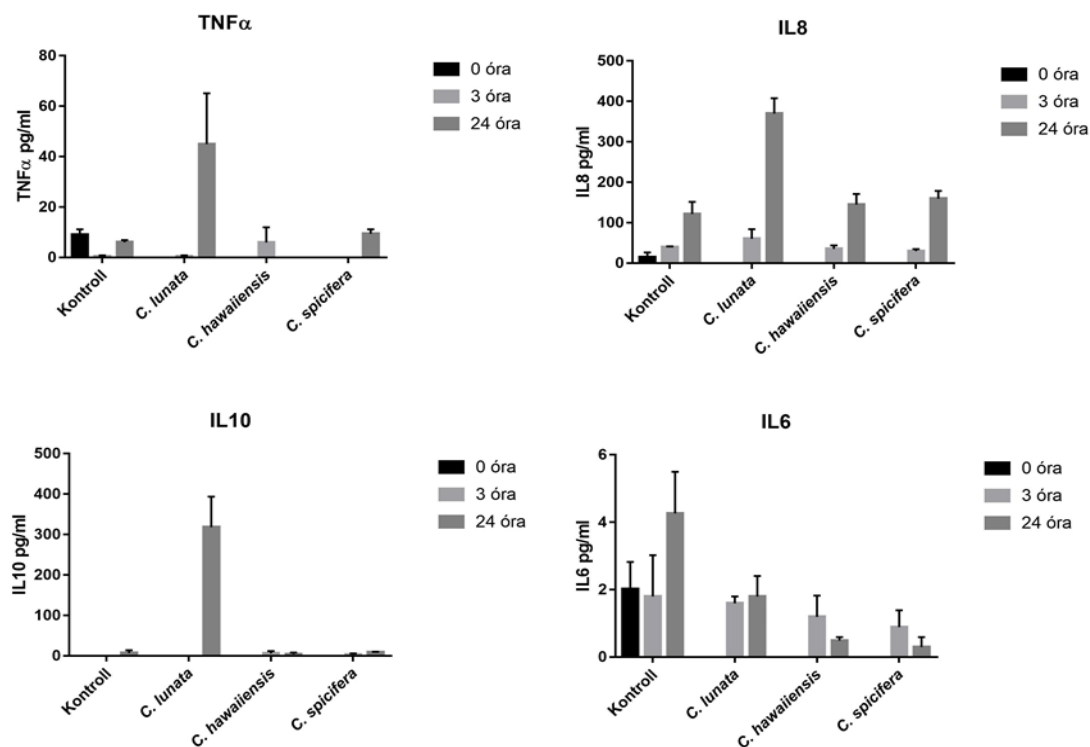
20. ábra: A THP-1 monociták citokinek kódoló génjeinek relatív transzkripció szintjei. A relatív transzkripció szinteket $\Delta\Delta C_T$ ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) módszerrel határoztuk meg. Kontrollként azonos körülmények között tartott, kezeltlen sejteket használtunk. A statisztikai analízist páros t-próbával végeztük el az azonos időpontban mért sejtes kontrollhoz viszonyítva, $n = 3$.

Kontrollként az LPS-re adott válasz esetében is megvizsgáltuk a citokinek kódoló gének kifejeződését. Erőteljes *TNFA*, *IL8*, *IL6*, *IL10* és *IL1B* kifejeződést mértünk már 3 óra elteltével. 24 óra elteltével ugyan a relatív transzkripció szint visszaesett, de még mindig emelkedett értékeket mutatott (21. ábra).



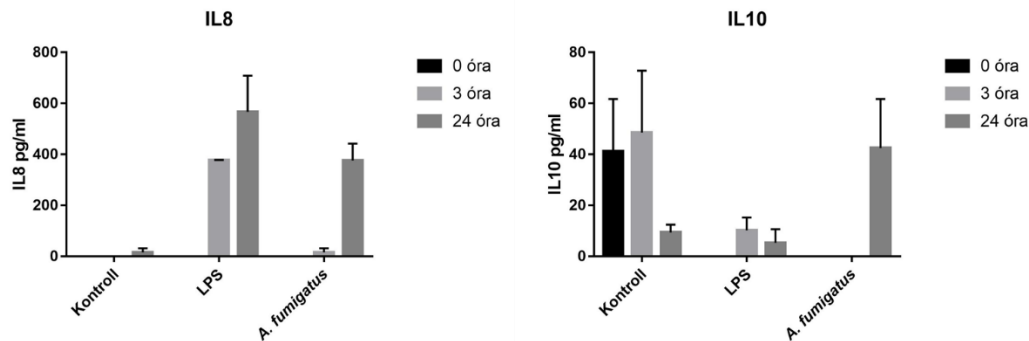
21. ábra: THP-1 monociták citokin kódoló génjeinek relatív transzkripció változása LPS indukció hatására 3 és 24 óra után. A relatív transzkripció szinteket $\Delta\Delta C_T$ ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) módszerrel határoztuk meg. Kontrollként azonos körülmények között tartott, kezeltlen sejteket használtunk. A statisztikai analízist páros t-próbával végeztük el az azonos időpontban mért sejtes kontrollhoz viszonyítva, $n = 3$.

A citokinek mennyiségének fehérjeszintű meghatározásánál nem tapasztaltunk IL6 termelést a *Curvularia* izolátumokkal való interakció után, a *C. hawaiiensis* és *C. spicifera* csírázó konídiumainak és hifáinak jelenlétében a kontroll sejtekhez hasonló citokin mennyiségeket mértünk TNF α , IL8 és IL10 esetében is (22. ábra).



22. ábra: THP-1 monociták citokin termelése *Curvularia* törzsekkel való interakció 3. és 24. órájában. A fehérjék mennyiségét ELISA-val határoztuk meg, pg/ml koncentrációban ábrázoltuk. A statisztikai analízist Kruskal-Wallis teszttel végeztük az azonos időpontban mért sejtes kontrollhoz viszonyítva, $n = 3$.

A *C. lunata* 24 óra elteltével kis mennyiségű TNF α termelődést (45 pg/ml) indukált, valamint az IL8 (340 pg/ml) és az IL10 (318 pg/ml) termelése jelentősen megemelkedett (22. ábra). Az *A. fumigatus*-szal indukált kontroll sejtek esetében hasonló mennyiségű IL8 (376 pg/ml) termelődését mutattunk ki, viszont csak kis mennyiségű IL10 (43 pg/ml) termelést detektáltunk. Az IL8 termelés ebben az esetben egyéb kutatások által is alátámasztott (Loeffler és mtsi. 2009, Cortez és mtsi. 2006). Az LPS indukció után 3 órával 377 pg/ml IL8 és 10 pg/ml IL10 termelést mértünk, míg 24 órával 567 pg/ml IL8 és 5 pg/ml IL10 mennyiséget határoztunk meg (23. ábra).



23. ábra: A monociták IL8 és IL10 termelése LPS és *A. fumigatus* (E:T = 20:1) indukció hatására 3 és 24 óra után. A fehérjék mennyiségét ELISA-val határoztuk meg, pg/ml koncentrációban ábrázoltuk. A statisztikai analízist Kruskal-Wallis teszttel végeztük az azonos időpontban mért sejtes kontrollhoz viszonyítva, n = 2.

A proinflammatorikus citokinek fontos szerepet játszanak a gombák elleni immunválasz kialakításában (Antachopoulos és Roilides 2005), a *Curvularia* izolátumok jelenlétében tapasztalt kis mennyiségű gyulladásos citokin termelés ebből a szempontból meglepő jelenség, amelyet a *C. lunata* esetében tapasztalt antiinflammatorikus IL10 termelés magyarázhat, hiszen ez a citokin gátolja a proinflammatorikus citokinek termelését (de Waal Malefyt és mtsi. 1991, Couper és mtsi. 2008, Ouyang és mtsi. 2011). Az IL10 rendellenesen magas szintje a szérumban *A. fumigatus* fertőzésre való hajlamosító tényező (Romani 2004), a citokin hiánya pedig a *C. albicans* és a *H. capsulatum* gyorsabb eliminációját eredményezte (Romani és mtsi. 1994, Deepe és Gibbons 2003). A kiváltott magas IL10 koncentráció összefügghet azzal, hogy a *Curvularia* fajok, főleg a *C. lunata* immunokompetens egyénekben is krónikus fertőzéseket okozhat, amelyek többsége egyben allergiás megbetegedés is (Krizsán és mtsi. 2015).

Az IL10 gátolni képes az IL8 termelődését is, azonban az IL10 termelés ellenére a *C. lunata* hifáinak jelenlétében 24 óra után magas IL8 szintet is kimutattunk. Ez a citokin a neutrofil granulociták fő kemoattraktánsa (Hoffmann és mtsi. 2002), ami azt sugallja, hogy ezeknek a sejteknek fontos szerepe van a gomba elleni védekezésben.

A *C. hawaiiensis* és *C. spicifera* esetében mért transzkripciós emelkedések ellenére egyik vizsgált citokin termelését sem tudtuk fehérje szinten kimutatni. A TNF α szekréció szabályozása transzkripciós és transzlációs szinten is megvalósul (Spriggs és mtsi. 1992, Parameswaran és Patial 2010), ezen citokin esetében valószínűleg a fehérje termelésére transzlációs gátlás hat. Az IL10 és IL8 citokinek megjelenése azonban elsősorban

transzkripció szabályozás alatt áll (Le és mtsi. 1997, Roebuck 1999), a szekréció hiányát valószínűleg a transláció gátlás nem magyarázza.

A közeli rokon gombákra adott eltérő immunválasz más nemzetségeken belül is megfigyelhető. A monociták az *Aspergillus* nemzetség különböző tagjaival szemben eltérő IL6 és TNF α választ adtak (Warris és mtsi. 2005), de a *Candida* fajok esetében is írtak le különbségeket az immusejtek általi felismerés és citokintermelés tekintetében (Netea és mtsi. 2015, Toth és mtsi. 2017a).

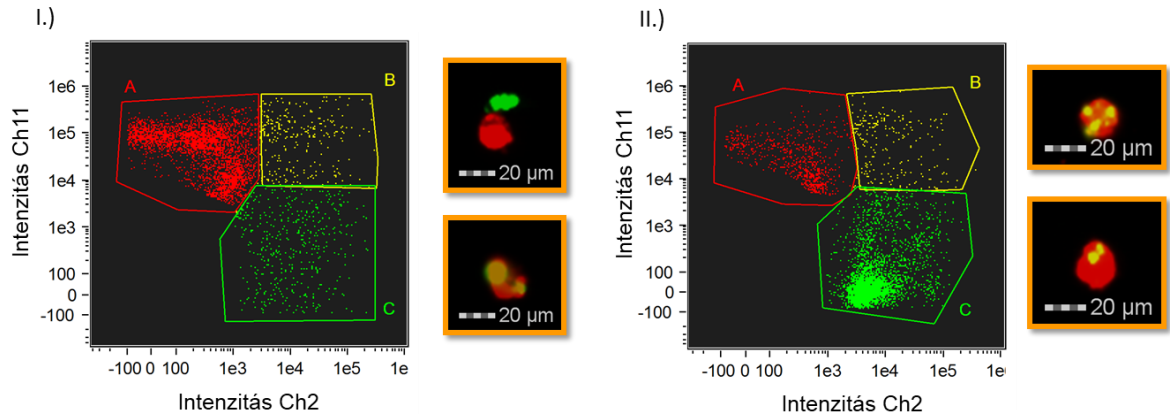
Az ebben a fejezetben bemutatott eredményeket a következő publikáció tartalmazza: Tóth és munkatársai (2017b).

6.2 Makrofágok válasza *Curvularia* izolátumokra

A makrofággá érlelt THP-1 sejtek interakcióját is megvizsgáltuk a *Curvularia* izolátumokkal. A 3 és 24 órás vizsgálatoknál a *C. lunata* mellett ebben az esetben is bevontuk a *C. hawaiiensis* és *C. spicifera* egy-egy klinikai izolátumát.

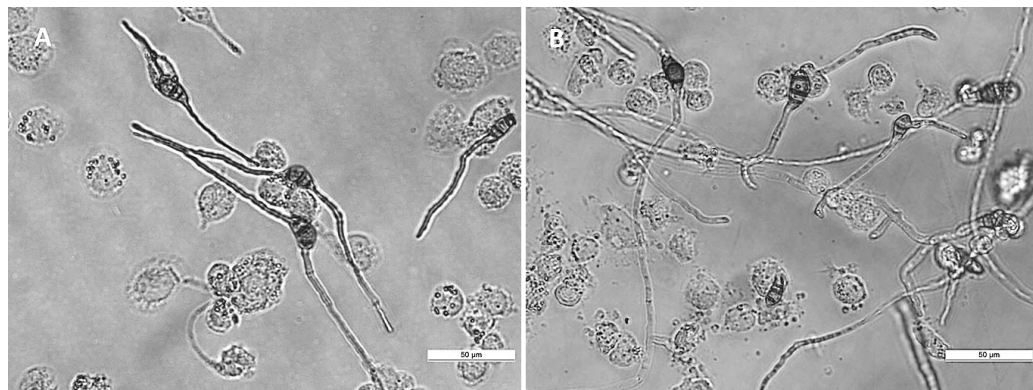
Mivel a makrofágok elsődleges feladata *A. fumigatus*-szal szemben a spórák eliminálása (Marr és mtsi. 2001, Philippe és mtsi. 2003), a sejtek *C. lunata* konídiumokat fagocitáló képességét vizsgáltuk. A vizsgálatot 1 és 2 óra ko-inkubációt követően végeztük el, élő konídiumok jelenlétében (24. ábra). Két óra elteltével már csírázó konídiumok vannak jelen.

Egy óra elteltével a sejtek 4,3(\pm 1,5)%-a mutatott interakciót a *C. lunata* konídiumokkal 20:1 (E:T) arány esetén. Habár ez az érték elmarad az *A. fumigatus*-sal 1:2 (E:T) arányban fertőzött sejteknél tapasztalt 23(\pm 1)%-os értéktől, azt érdemes megjegyezni, hogy a *C. lunata* konídiumok 30,9(\pm 1,9)%-át ismerték fel a sejtek ebben az időpontban (24/I. ábra). Két óra után a sejtek 6,3(\pm 1,8)%-a mutatott pozitív eredményt az interakcióra nézve (E:T = 20:1). Ebben az időpontban a konídiumok 43(\pm 2,2)%-át ismerték fel a makrofágok. A *C. lunata* esetben mért pozitív események többsége tényleges internalizációt is. *A. fumigatus* esetében a monocitákhoz hasonlóan itt is megvizsgáltuk 3 óra elteltével a fagocitáló sejtek arányát. 1:2 (E:T) fertőzési aránynál a sejtek 46,2(\pm 0,24)%-a fagocitált (24/II. ábra), míg 20:1 (E:T) aránynál 3(\pm 1,3)%-os értéket mértünk. Az eredmények alapján a makrofággá differenciáltatott THP-1 sejtek képesek felismerni és fagocitálni a *C. lunata* konídiumokat.



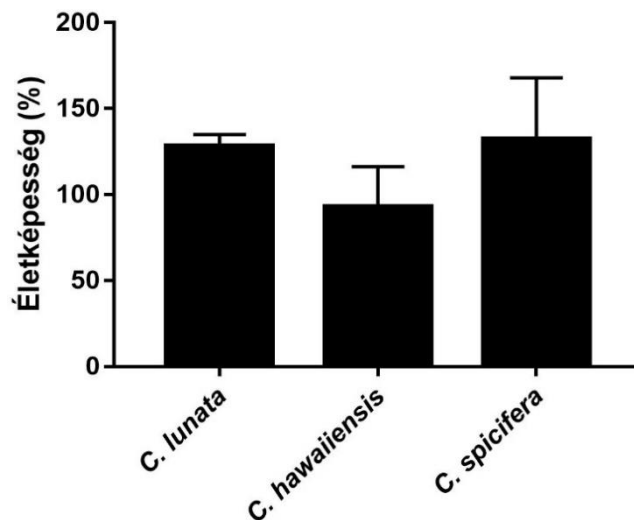
24. ábra: A THP-1 makrofágok fagocitáló képessége I.) *C. lunata* (E:T = 20:1) és II.) *A. fumigatus* (E:T = 1:2) konídiumokkal szemben 1 óra elteltével. Az ábrákon az A (piros) populáció a monocitákat, a B (sárga) a konídiumokkal interakcióban lévő sejteket, míg a C (zöld) a konídiumokat jelenti. A tengelyek a piros (Ch11) és zöld (Ch2) fluoreszcencia intenzitást jelölik. A sárga keretbe foglalt fluoreszcens felvételek a konídiumok és sejtek interakcióit mutatja, ahol zöld színnel a konídium, pirossal a makrofág látható.

Az interakció 3. és 24. órájában mikroszkópos vizsgálatot végeztünk (25. ábra). A sejtek hifa körüli aggregációját egyik törzsnél sem tapasztaltuk, azonban itt is megfigyelhetők voltak a konídiumokhoz kapcsolódó sejtek.



25. ábra: A THP-1 makrofágok és a *C. lunata* interakciója 3 (A) és 24 (B) óra után. A képeken a méretskála 50 µm-t jelöl.

24 óra ko-inkubáció után mértük az izolátumok életképességét (26. ábra), amelyből kiderül, hogy a THP-1 makrofágok nem voltak képesek a gombák hatékony ölésére. Irodalmi adatok alapján az *A. fumigatus* fiatal hifái indukálják a makrofágok NADPH oxidáz általi ROS, valamint citokin termelését (Gersuk és mtsi. 2006), a hifák károsítását azonban főleg a neutrofil granulociták végzik (Rosowski és mtsi. 2018).



26. ábra: A *Curvularia* izolátumok életképessége a THP-1 makrofágokkal való 24 órás interakciót követően, az azonos körülmények között nevelt gomba kontrollhoz viszonyított százalékos értékben. Az életképességet MTT-tesztel határoztuk meg.

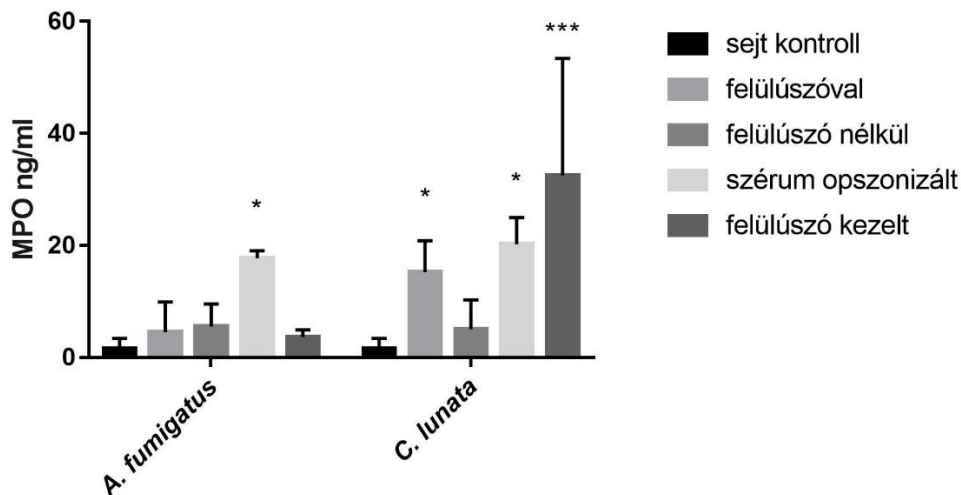
A THP-1 makrofágok az eredmények alapján a *C. lunata* konídiumait felismerik és fagocitálják, ennek ellenére a gomba életképessége a sejtek nélkül nevelt törzshöz képest nem csökkent. Valószínűleg az internalizált konídiumok csírázását jelentősen nem gátolták a sejtek. A *C. hawaiiensis* és *C. spicifera* esetében sem tapasztaltuk az életképesség csökkenését. A hifák nem váltották ki a THP-1 makrofágok aggregációját.

6.3 Neutrofil granulociták válasza *Curvularia lunata*-ra

A primer neutrofil granulociták tisztaságát és életképességét az izolálás után ellenőriztük: minden esetben minimum 95%-os tisztaságot (a kontamináló sejteket Wright festés alapján eritrocitaként azonosítottuk) és 97%-os életképességet értünk el.

A kísérletekben vizsgáltuk a neutrofilek felismerési mechanizmusát, ROS termelését, NET képzését és ölési hatékonyságát *C. lunata*-val szemben. Kontrollként *A. fumigatus*-t használtunk.

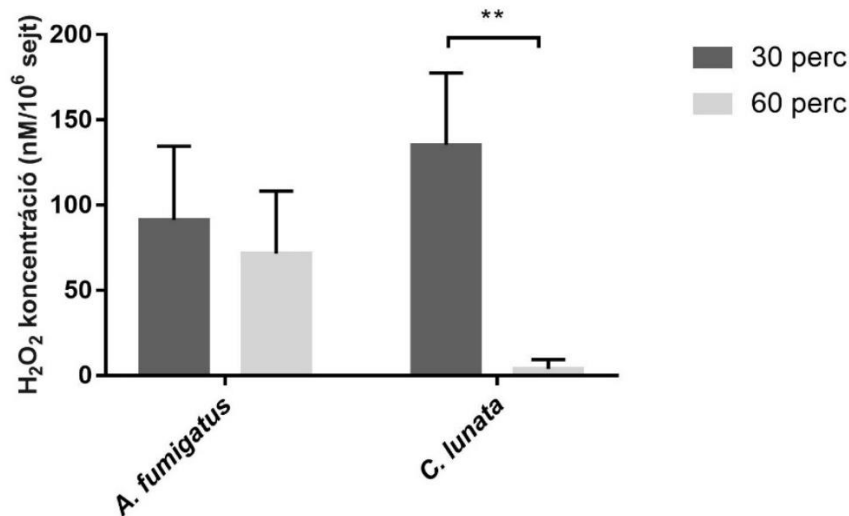
A sejtek felismerési mechanizmusát a különböző körülmények között felszabaduló MPO mennyiségének meghatározásával vizsgáltuk (27. ábra). Az enzim extracelluláris megjelenése jelzi a sejtek aktivációját (van der Veen és mtsi. 2009).



27. ábra: A neutrofil granulociták által kibocsátott MPO mennyisége *A. fumigatus* és *C. lunata* jelenlétében, különböző körülmények között. Kontrollként az azonos körülmények között nevelt, kezeletlen sejteket használtuk. Felülúszóval: a neutrofil granulocitákat közvetlenül adtuk a csírázó konídiumokhoz; felülúszó nélkül: a neutrofilek hozzáadása előtt a fiatal hifákat mKRP pufferrel mostuk; szérumszopsonizált: a gombákat a csírázás utolsó órájában megfelelő donorból származó szérummal opszonizáltuk; felülúszó kezelt: a neutrofil sejtekhez a gombák sejtmentes csíráztatási felülúszóját adtuk. $n = 12$; a statisztikai analízist kétszemponos ANOVA módszerrel végeztük.

Míg az *A. fumigatus* a szakirodalmi adatoknak megfelelően csak szérumszopsonizáció után aktiválta a sejteket (Gazendam és mtsi. 2016), a *C. lunata* csíráztatási felülúszója és az opszonizált gomba jelenlétében is mértünk az extracelluláris MPO szintjében emelkedést. Ebből arra következtethetünk, hogy a gomba felismerése az *A. fumigatus*-hoz hasonlóan történik, valamint, hogy a *C. lunata* által termelt valamely szolubilis faktor képes indukálni a neutrofil aktivációt.

A MPO feladata elsősorban az oxidatív burst során termelődő H_2O_2 HOCl-é alakítása (3.8.3. fejezet), amely biztosítja a hatékony ölést. Az interakció során mértük a termelődő H_2O_2 mennyiségét. Azt tapasztaltuk, hogy az *A. fumigatus*-hoz hasonlóan a *C. lunata* is csak szérumszopsonizáció után képes indukálni a ROS felszabadulást, azonban az interakció 60. percében (az *A. fumigatus*-sal ellentétben) az majdnem teljesen eltűnik (28. ábra).



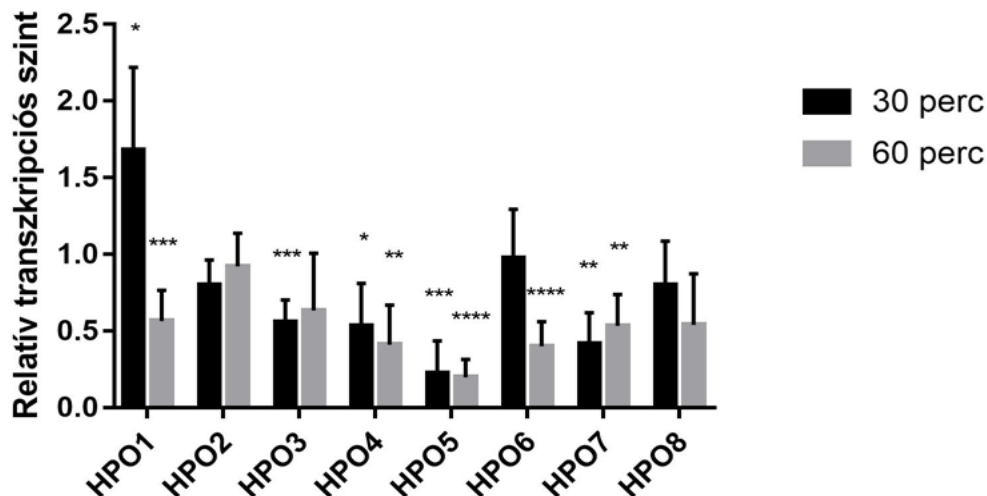
28. ábra: A neutrofil granulociták extracelluláris H₂O₂ termelése szérum opszonizált gombák jelenétében, 10⁶ sejtre vonatkoztatva az interakció 30. és 60. percében. n = 6; a statisztikai analízist kétszemponos ANOVA módszerrel végeztük.

Érdekes, hogy a szérum opszonizáció nélkül, a csak a szolubilis faktor által aktiválódó sejtek esetében nem tapasztaltunk ROS termelést. Mint azt az 3.8.3. fejezetben tárgyaltuk, a MPO nem csupán az oxidatív burst folyamatában tölt be fontos szerepet, hanem egyéb leukociták toborzását is végzi (Johansson és mtsi. 1997, van der Veen és mtsi. 2009). Elképzelhető, hogy a szolubilis faktor hatására termelődő MPO proinflammatorikus szabályozóként működik.

A 60. percen mért szignifikáns H₂O₂ koncentrációbeli csökkenés háttérében állhat egy, a gomba által termelt, MPO-hoz hasonló haloperoxidáz, amely szintén HOCl-t hoz létre H₂O₂ felhasználásával (Butler 1998) vagy egyes mikrobiális haloperoxidázok esetében leírt kataláz aktivitással a H₂O₂-t vízzé és oxigénné bontja (Morris és Hager 1966, Libby és mtsi. 1982, van Pee és Lingens 1985). Egy biotechnológiai tárgyú tanulmány felhívja a figyelmet a rokon *C. inaequalis* extracelluláris haloperoxidáz termelésére (Hansen és mtsi. 2003).

A haloperoxidázok vizsgálatára a *C. lunata* genomadatbázisából (*Cochliobolus lunatus* m118 v2.0, JGI MycoCosm) 9 haloperoxidázszerű fehérjét kódoló gént azonosítottunk, amelyeket *HPO1-9* géneknek neveztünk el. A gének szekvenciáit az 1. melléklet tartalmazza. A 9 aminosav szekvenciában ExPasy MyHits motívum kereső programjával végzett keresés alapján megtalálható a haloperoxidázokra jellemző 2-es típusú foszfatidil-sav foszfatáz (PAP2) motívum benne a PAP2 doménnel.

A *HPO1-8* gének expressziós változását H_2O_2 indukció hatására vizsgáltuk az indukció 30. és 60. percében (29. ábra). Az általunk használt törzs *HPO9* gén szekvenciája valószínűleg eltér az m118-as törzsetől, ugyanis erre a génre tervezett indítószekvenciákkal nem sikerült a gént felszaporítanunk. A *HPO1* gén esetében 30 perc után szignifikánsan nagyobb transzkripciós szintet detektáltunk, míg a többi gén esetében szignifikáns csökkenés vagy változatlan transzkripció volt megfigyelhető.



29. ábra: *C. lunata* feltételezhetően haloperoxidázt kódoló génjeinek relatív transzkripciós szintje H_2O_2 indukció hatására 30 és 60 perc elteltével. A relatív transzkripciós szinteket $\Delta\Delta C_T$ ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) módszerrel határoztuk meg a kezeltlen gombánál tapasztalt génexpresszióhoz viszonyítva. A statisztikai analízist többszörös t-próbával végeztük az indukálatlan 30 és 60 perces mintákhoz képest, amelyek értékét 1-nek vettük (hamis találati aránnyal, $Q = 10\%$).

A *HPO1* gén által kódolt fehérje aminosav sorrendje NCBI blastp illesztés alapján 93% egyezést mutat a *C. inaequalis* vanádium kloroperoxidázzal (P49053), amelynek ismert a fehérje szerkezete (3.7 fejezet). A *HPO1* fehérje aminosav szekvenciáját a *CPO* fehérjéhez illesztve látható, hogy a fehérje központi egységét alkotó α -helix struktúránál a két szekvencia nagyfokú hasonlóságot mutat (30. ábra). A *HPO1* fehérjében is megtalálható az aktív centrumhoz és vanadát-ion megkötéséhez szükséges His aminosavak, valamint a vanádium központ kialakításában szerepet játszó Ser⁴⁰², Gly⁴⁰³, Lys³⁵³, Arg³⁶⁰ és Arg⁴⁹⁰ aminosavak is (3.7 fejezet). A szerkezeti hasonlóság alapján valószínűleg a *HPO1* fehérje szintén vanádium kloroperoxidáz. Ezen enzimek esetében még nem írtak le kataláz aktivitást (Renirie és mtsi. 2009).

```

SP|P49053|PRXC_CURIN MGSVTPIPLPKIDEPEEYNTNYILFWNNHVGLELNRVTHTVGGPLTGPPLSARALGMLHLA 60
HPO1 MGSVIPIPLPKIDEPEEYNTNYILFWNNHVGLELNRVTHTVGGPLTGPPLSARALGMLHLA 60
***
SP|P49053|PRXC_CURIN IHDAYFSICPPTDFTTFLSPDTENAAYRLPSPNGANDARQAVAGAALKMLSSLYMKPVEQ 120
HPO1 IHDAYFSICPPTDFTTFLSPDAENAAYRLPSPNGAHDARQAVAGAALKMLSSLYMKP--- 117
***
SP|P49053|PRXC_CURIN PNPNGANISDNAYAQLGLVLDRLSVLEAPGGVDRESASFMFGEDVADVFFALLNDPRGAS 180
HPO1 -DSNSGGNISDNAYAQLALVIDRSLKAPGGVNRESASVFVGEAVADVFFALLNDPRGAS 176
: * * .*****.***:*****:*****:*****:*** *****
SP|P49053|PRXC_CURIN QEGYHPTPGRYKFDDEPTHPVVLIPVDPNNPNGPKMPFRQYHAPFYGKTTKRFATQSEHF 240
HPO1 QEGYHPTPGRCKFDDEPTHPVVLVPVDPNNPNGPKMPFRQYHAPFYGKTTKRFATQTEHF 236
***** *****:***** ***** *****:***
SP|P49053|PRXC_CURIN LADPPGLRSNADETAEYDDAVRVAIAMGGAQALNSTKRSPWQTAQGLYWAYDGSNLIGTP 300
HPO1 LADPPGLRSNADETAEYDDSIRVAIAMGGAQGLNSTKRSPWQTAQGLFWAYDGSNLVGT 296
*****:*****.*****:*****:*****:***
SP|P49053|PRXC_CURIN PRFYNQIVRRIAVTYKKEEDLANSEVNNADFARLFALVDVACTDAGIFSWKEKWEFEFWR 360
HPO1 PRFYNQIVRRIAVTYKKEEDLANSEVNNADFARLFALVDVACTDAGIFSWKEKWEYEFWR 356
*****:*****:*****:*****:*****:***
SP|P49053|PRXC_CURIN PLSGVRDDGRPDHGDFFWLTLGAPATNTNDIPFKPPFPAYPSGHATFGGAVFQMVRRYYN 420
HPO1 PLSGVRDDGRPDHGDFFWLTLGAPATNTNDIPFKPPFPAYPSGHATFGGAVFQMVRRYYN 416
*****
SP|P49053|PRXC_CURIN GRVGTWKDDEPDNIAIDMMISEELNGVNRDLRQPYDPTAPIEDQPGIVRTRIVRHFDSAW 480
HPO1 GRVGTWKDDEPDNIAIDMVISEELNGVNRDLRQPYDPTAPIEDQPGIVRTRIVRHFDSAW 476
*****:*****:*****:*****:*****:***
SP|P49053|PRXC_CURIN ELMFENAISRIFLGVHWRFDAAAARDLIPPTTKDVYAVDNNGATVFQNVEDIRYTTRGT 540
HPO1 ELMFENAISRIFLGVHWRFDAAAARDLIPPTTKDVYAVDNNGATVFQNVEDIRYSTKGT 536
*:*****:*****:*****:*****:*****:***
SP|P49053|PRXC_CURIN REDPEGLFPIGGVPLGIEIADEIFNNGLKPTPETQMPQETPVQKPVGQQPVKGMWEEE 600
HPO1 REDPEGLFPIGGVPLGIEIADEIFNNGLRPTPPELQMPQETPVQKPVGQQPVQGLWQDE 596
*** *****:*****:*****:*****:***
SP|P49053|PRXC_CURIN --QAPVVKEAP 609
HPO1 EEQVPVVKEAP 607
* .*****

```

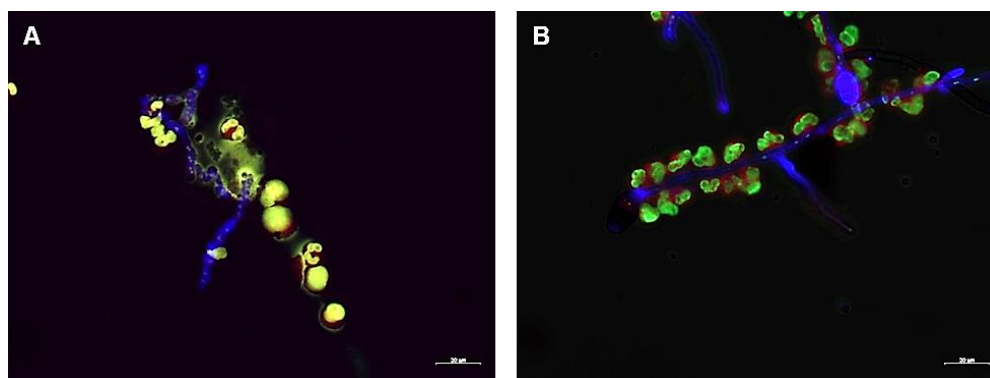
30. ábra: A *C. inaequalis* vanádium kloroperoxidáz és *C. lunata* HPO1 fehérjék aminosav szekvencia illesztése. A *C. inaequalis* fehérjeszekvenciájában az α -helix struktúrát kék szín, az aktív centrumot sárga, a fémion kötőhelyet lila szín jelöli. A vanádium központ létrehozásában résztvevő egyéb aminosavakat piros betűvel jelöltük. Az illesztést és a szerkezeti elemek azonosítását UniProt BLAST programmal készítettük.

A HPO2-9 fehérjék más fehérjék szekvenciáihoz való legnagyobb azonossági százalékát az 5. táblázat foglalja össze. Ezen hasonló fehérjék funkciója más organizmusokban sem tisztázott, de mivel az indukció hatására nem tapasztaltuk a gének felülszabályozását, a H_2O_2 átalakításában valószínűleg nem vesznek részt a vizsgált körülmények között.

5. táblázat: A *HPO2-9* gének által kódolt fehérjék aminosav szekvenciáinak legmagasabb százaléku azonossága és lefedettsége más organizmusok fehérjéivel.

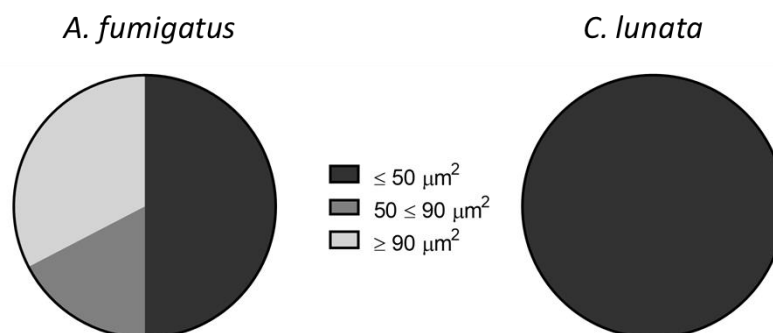
Kódoló gén	Legnagyobb hasonlóságot mutató gén	Azonosság	Lefedettség
<i>HPO2</i>	<i>B. maydis</i> hipotetikus fehérje COCC4DRAFT 43272	58%	97%
<i>HPO3</i>	<i>Bipolaris oryzae</i> hipotetikus fehérje COCMIDRAFT 93739	89%	100%
<i>HPO4</i>	<i>B. maydis</i> hipotetikus fehérje COCC4DRAFT 41040	94%	100%
<i>HPO5</i>	<i>B. maydis</i> hipotetikus fehérje COCC4DRAFT 54428	89%	100%
<i>HPO6</i>	<i>Stemphylium lycopersici</i> PAP2 domént tartalmazó fehérje	76%	96%
<i>HPO7</i>	<i>B. victoriae</i> hipotetikus fehérje COCVIDRAFT 104494	86%	100%
<i>HPO8</i>	<i>Pyrenophora teres f. teres</i> hipotetikus fehérje PTT 08684	91%	100%
<i>HPO9</i>	<i>Bipolaris sorokiniana</i> hipotetikus fehérje COCSADRAFT 177466	91%	98%

Az interakció során a NET képződést is megvizsgáltuk. A szérum opsonizált *A. fumigatus*-szal való 3 órás interakcióban jól megfigyelhető a kromatin dekonzenzációja és az extracelluláris háló megjelenése, míg azonos körülmények között a *C. lunata* jelenlétében a sejtek láthatóan felismerik a gombát, kapcsolódnak a hifához, azonban a sejtmag lobuláris szerkezete megmarad, NET képzés pedig nem látható (31. ábra). Egyéb körülmények között a sejtek hifa körüli aggregációja is elmaradt.



31. ábra: Neutrofil granulociták NET képzése *A. fumigatus* (A) és *C. lunata* (B) hifák jelenlétében, 3 órás interakciót követően. A méretskála 20 µm-t jelöl.

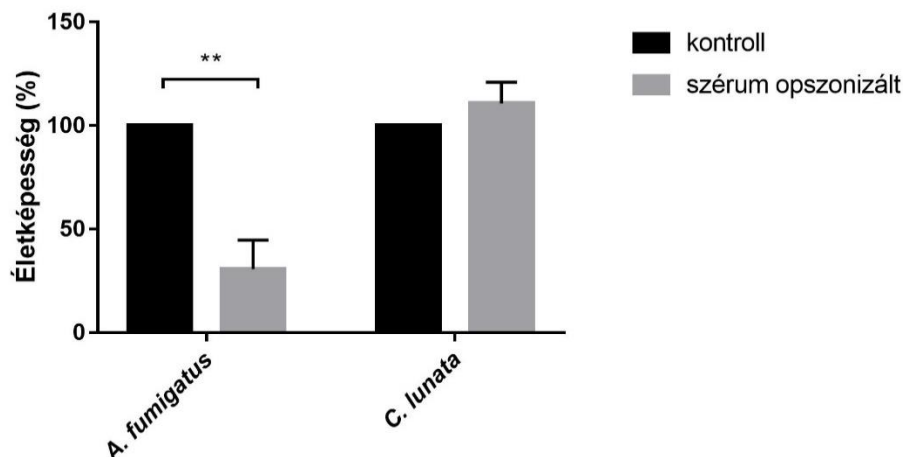
A NET képzés egyes stádiumaiban levő sejtek kvantifikációjánál azt tapasztaltuk, hogy az *A. fumigatus* hifái köré gyűlt sejtek között intakt és felbomlott sejtmagú sejtek, valamint már netotikus sejtek is megtalálhatók, míg a *C. lunata* hifái körül csak intakt sejtmagú sejtek voltak megfigyelhetők (32. ábra)



32. ábra: A NET képzés egyes stádiumaiban lévő sejtek százalékos megoszlása *A. fumigatus* és *C. lunata* szérumszuszpenzió hatására. A stádiumokat a DNS kiterjedésének mértékével jellemeztük: intakt sejtmag: $\text{DNS} \leq 50 \mu\text{m}^2$; felbomlott sejtmembrán: $50 \mu\text{m}^2 \leq \text{DNS} \leq 90 \mu\text{m}^2$; netotikus sejtek: $\text{DNS} \geq 90 \mu\text{m}^2$. A sejtek DNS-ének kiterjedését SYTOX Green festés alapján határoztuk meg ImageJ szoftver segítségével.

A ROS-ok NET képzésben betöltött szabályozó szerepét több tanulmány is alátámasztotta (Fuchs és mtsi. 2007, Behnen és mtsi. 2017). A H_2O_2 mennyiségének radikális csökkenése magyarázhatja a NET képzés elmaradását, ez azonban azt is feltételezi, hogy a *HPO1* gén által kódolt haloperoxidáz, amely szerkezet alapján nem rendelkezik kataláz aktivitással, nem vesz részt ebben a folyamatban, hiszen a NET képzés nem indukálódik. A NET képzés hiánya *C. lunata* jelenlétében ellentmond annak a szakirodalomban leírt jelenségnek, amely szerint a NET megjelenése a patogén méretétől függene (Branzk és mtsi. 2014).

Mivel szérumszuszpenzió hatására a neutrofil granulociták a hifák köré aggregálódtak, megvizsgáltuk a gombák életképességét az interakciót követő 3. órában (33. ábra). Azt tapasztaltuk, hogy míg a sejtek az *A. fumigatus*-t hatékonyan képesek ölni, a *C. lunata* életképessége nem csökkent az interakció után.



33. ábra: A szérum opsonizált gombatörzsek életképessége a neutrofil granulocitákkal való 3 órás interakció után a kontrollhoz viszonyított százalékos értékben kifejezve. Kontrollként az azonos körülmények között, neutrofil sejtek nélkül nevelt gombákat használtuk. $n = 9$; a statisztikai analízist kétszemponos ANOVA módszerrel végeztük.

A H_2O_2 mennyiségének csökkenésére két hipotézist vizsgáltunk, amelyeket az alábbiakban ismertetünk.

6.3.1 A melanin, mint antioxidáns jelenléte

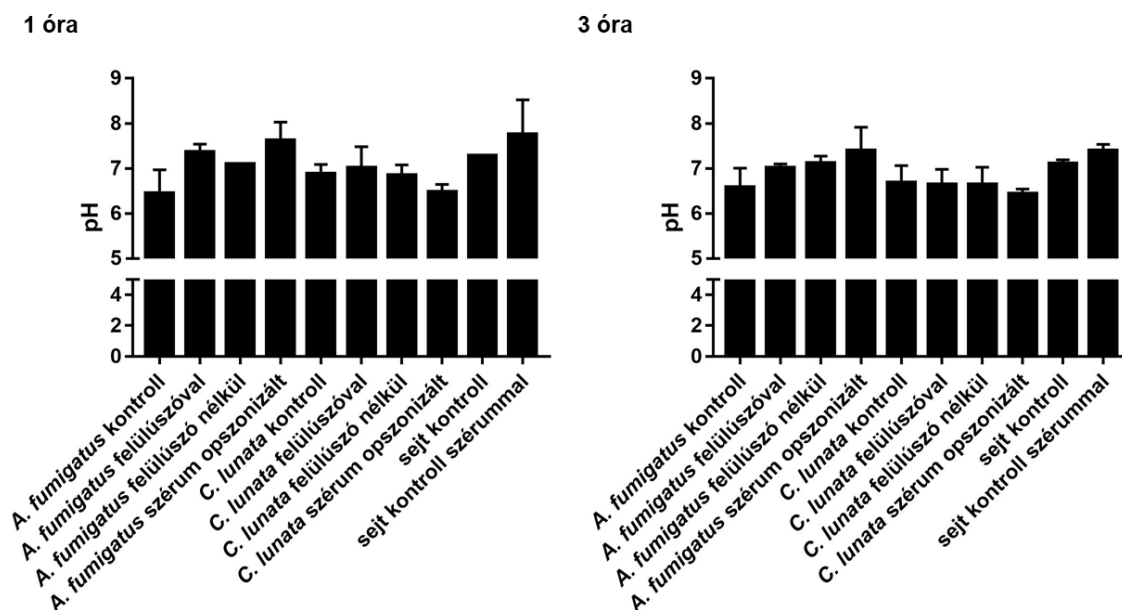
A melaninok antioxidáns kapacitását szakirodalmi adatok támasztják alá (Jacobson és mtsi. 1995, Wang és mtsi. 1995). Az interakció 60. percében lecsökkent H_2O_2 szint magyarázható lenne a gomba által termelt melanin szabadgyök semlegesítő hatásával, ezért az interakciós felülúszóban vizsgáltuk a melanin jelenlétét. Az interakcióból származó felülúszó savanyítása során nem tapasztaltuk csapadék képződését, a PTFE membránon sem volt látható pigment szűrlet. Hét napos tenyésztés után is vizsgáltuk a melanin termelést mKRPG közegben. A savanyítás után nem volt megfigyelhető a melanin kiválása.

Feltételezhető, hogy ebben a közegben a gomba nem bocsát ki melanint az extracelluláris térbe, tehát a H_2O_2 semlegesítése sem a pigment által történik.

6.3.2 Az extracelluláris környezet savasodása

Szakirodalmi adatok alapján a mikrobák és a neutrofil sejtek interakciója során az extracelluláris savasodás gátolja a neutrofil funkciókat, elsősorban az oxidatív burst gátlásán keresztül (Behnen és mtsi. 2017), ezért az interakció 1. és 3. órájában meghatároztuk a közeg pH-ját (30. ábra).

Mivel a szérum hozzáadása lúgosította a közeget, az egyes kísérleti eredményeket mindig a megfelelő kontrollhoz hasonlítottuk. A gomba kontrollok 1 és 3 óra elteltével is savanyították a környezetüket. Ezzel ellentétben a sejtek jelenlétében *A. fumigatus* esetében nem tapasztaltuk a közeg savanyítását egyik vizsgált időpontban sem. *C. lunata* esetében szérum opszonizáció után a sejtek jelenlétében is megfigyelhető volt a pH csökkenése már 60 perc elteltével is. 3 óra után szignifikánsan alacsonyabb pH-t mértünk ebben az esetben, mint a kontroll sejteknél (30. ábra). A Behnen és munkatársai (2017) által publikált tanulmány szerint a 6,5 körüli pH már elegendő a neutrofil funkciók gátlásához.



30. ábra: Az extracelluláris pH alakulása a neutrofil granulociták és a gombák interakciójában 60 perc (A) és 3 óra (B) elteltével. A gomba kontrollok a sejtek nélkül, míg a sejt kontroll a gombák nélkül azonos körülmények között inkubált állapotot jelöli. Az ábrán használt további jelölések: felülúszóval - a neutrofil granulocitákat közvetlenül adtuk a csírázó konídiumokhoz; felülúszó nélkül - a neutrofilek hozzáadása előtt a fiatal hifákat mKRPG pufferrel mostuk; szérum opszonizált - a gombákat a csírázás utolsó órájában megfelelő donorból származó szérummal opszonizáltuk. A szérum opszonizációs körülmények statisztikai elemzése a szérummal és szérum nélküli inkubált sejtes kontrollhoz viszonyítva is megtörtént, míg a többi esetben a szérum nélküli inkubált sejtes kontrollt használtuk. $n = 6$; a statisztikai analízist kétszemponos ANOVA módszerrel végeztük.

Ezen eredmények magyarázatot adnak a H_2O_2 mennyiségének csökkenésére és ezzel együtt a NET képzés elmaradására is. A *C. lunata* opszonizációja nélkül végzett interakciós kísérletekben (felülúszóval és felülúszó nélkül) is megfigyelhető volt kismértékű pH csökkenés, azonban ezekben az esetekben nem tapasztaltuk a gomba és a sejtek tényleges kapcsolatát (6.3. fejezet).

7 Összefoglalás

A *Curvularia* fajok mind humán egészségügyi problémaként, mind pedig gazdasági kártevőként gyakorlati jelentőséggel bíró fonalas gombák. Növényi patogénként számos kutatás foglalkozik ezen fajokkal, azonban humánpatogén szempontból kevés információnk van a nemzetség képviselőiről. Ezek a gombák feohifomikózisok kialakítására képesek, melyek egészséges emberekben elsősorban lokális, immunszuppresszált betegekben invazív, illetve disszeminált fertőzésként jelentkeznek. A nemzetség tagjai közül humán fertőzésekben leggyakrabban a *C. lunata*, a *C. hawaiiensis* és a *C. spicifera* fajok képviselőit izolálják, amely fajok erősen melanizáltak, ezért a pigment esetleges virulenciafaktorként betöltött szerepe is jól vizsgálható esetükben. Mivel az opportunistá fonalas gombafertőzések esetszáma az utóbbi évtizedekben növekedést mutat, amely magában foglalja a kevésbé jellemzett nem *Asperillus* fajokat is, az ilyen irányú kutatások fontossága kiemelkedő.

Munkánk során célul tűztük ki a *C. lunata* interakciójának vizsgálatát három, a veleszületett immunválasz folyamatában alapvető szerepet játszó immunsejtípussal.

A monocitákkal és makrofágokkal való interakció modellezésére a THP-1 sejtvonalat használtuk, ahol a sejtek válaszát a konídiumok és hifák jelenlétében is megvizsgáltuk. A hifák által kiváltott választ a *C. hawaiiensis* és a *C. spicifera* esetében is tanulmányoztuk. A neutrofil granulociták és a *C. lunata* fiatal hifáinak interakcióját primer immunsejtek felhasználásával modelleztük.

1. Monociták válasza a *Curvularia* izolátumokra

A THP-1 monociták a *C. lunata* nagy, melanizált konídiumaival nem léptek interakcióba, a fagocitózis vizsgálatban a kölcsönhatásban lévő sejtek aránya nagyon alacsony volt. A pozitív események többsége nem volt tényleges internalizáció. Mivel a melanin hatással lehet a fagocitózisra, a vizsgálatot elvégeztük melanin bioszintézist gátló körülmények közt termelt konídiumokkal is, azonban az interakcióba lépő sejtek arányát nem növelte a konídiumfal melanin tartalmának hiánya. A THP-1 monociták sem a melanizált, sem pedig a melanin gátolt konídiumok jelenlétében nem termeltek TNF α , IL6, IL8 vagy IL10 citokineket.

A monociták többek között mikrobiális szignálok hatására aktiválódni képesek, amely során a sejtek felszíni receptor mintázata megváltozik. Az aktiváció elindítja a differenciáció

folyamatát, amely után a monociták makrofággá vagy dendritikus sejtté alakulnak, vagy fenntartják monocita állapotukat. A monociták az antigén prezentációban is részt vesznek.

A THP-1 monociták aktivációját mind a konídiumok, mind a hifák jelenlétében vizsgáltuk. A *C. lunata* konídiumai nem váltották ki a sejtek aktivációját, valószínűleg antigén prezentáció sem történik, amely a kismértékű interakcióval magyarázható. A melanin hiánya a konídiumfalban nem befolyásolta az aktiváció és az antigén prezentáció elmaradását. A hifák jelenlétében sem tapasztaltuk az aktivációra jellemző génexpressziós mintázatot egyik *Curvularia* izolátum jelenlétében sem, habár a *C. lunata* esetében a sejtek aggregációja volt megfigyelhető a késői immunválasz vizsgálatánál. Ebben az esetben sem következtethettünk antigén prezentációra. A *C. hawaiiensis* és *C. spicifera* hifái nem váltották ki a monociták csoportosulását. A monociták nem voltak képesek csökkenteni a gombák életképességét az interakció során.

A THP-1 monociták hifák hatására bekövetkező citokintermelését is megvizsgáltuk. A *C. hawaiiensis* és *C. spicifera* nem váltotta ki a mért citokinek termelését. A *C. lunata* hifák jelenlétében tapasztalt IL10 antiinflammatorikus citokin termelés összefüggésben állhat a gomba által okozott fertőzések krónikus jellegével, a gyulladásos válasz gátlására utalhat a *HLADRA* gén alulszabályozása is. Ugyanakkor a gomba az IL8 termelését is indukálta, amely a neutrofil granulociták toborzásáért felelős legfontosabb attraktáns.

2. Makrofágok válasza a *Curvularia* izolátumokra

A *Curvularia* izolátumok interakcióját érlelt THP-1 sejtekkel is vizsgáltuk, amely makrofágokhoz hasonló fenotípust mutat. A *C. lunata* konídiumait az érlelt sejtek hatékonyabban ismerték fel, a fagocitáló sejtek aránya megnőtt. Az interakciós események nagy része tényleges internalizáció volt a konídiumok méretétől függetlenül.

A hifák ebben az esetben nem indukálták a sejtek aggregációját, azonban azok megjelenése után is megfigyelhető volt a sejtek konídiumhoz történő kapcsolódása, tehát a makrofágok a konídiumok felismerésében játszhatnak szerepet.

A sejtekkel való interakció nem csökkentette az izolátumok életképességét, önmagukban a makrofágok nem voltak képesek hatékony ölésre.

3. Neutrofil granulociták válasza *C. lunata* fiatal hifáira

A vizsgálatok során megállapítottuk, hogy a neutrofil granulociták a *C. lunata* hifáit szérumban dependens mechanizmussal ismerik fel, amely indukálja az oxidatív burst folyamatát

a sejtekben. A gomba termelhet egy szolubilis faktort, amely önmagában is kiváltja a sejtek aktiválódását, azonban ROS felszabadulást ez nem eredményez. A nagyméretű mikrobákkal szemben, mint a fonalas gombák, a NET képzést fontos effektor funkciónak tartják a neutrofilek esetében. A *C. lunata* jelenléte azonban nem váltotta ki a NET formálását, habár a sejtek kapcsolódtak a hifákhoz. A NET hiányát magyarázhatja a H_2O_2 szintjének radikális csökkenése az interakció során, hiszen a NET képzés szabályozásában a reaktív oxigén gyökök fontos szerepet játszanak. Eredményeink alapján a gomba savanyítja a környezetét az interakció során, amely pH változás gátolja a neutrofil funkciókat, elsősorban az oxidatív burst gátlásán keresztül. Ezen körülmények között a neutrofil granulociták nem voltak képesek hatékony ölésre a *C. lunata*-val szemben

Eredményeink alapján a monociták a *C. lunata* hifáit, míg a makrofágok a konídiumokat ismerik fel. A monociták esetében az antiinflammatorikus folyamatok előtérbe kerülését figyeltük meg, amely hozzájárulhat a krónikus fertőzések kialakulásához. A neutrofil granulociták szérumszopció után képesek felismerni a gomba hifáit, azonban a gomba gátolja a neutrofil effektor funkciókat. A vizsgált sejttypusok egyike sem volt képes a *C. lunata* vagy a többi *Curvularia* izolátum hatékony ölésére izolált körülmények között. Mivel az interakciók során immunreguláló molekulák termelését is kimutattuk, mint a monociták esetében a neutrofilek toborzásáért felelős IL8 termelést, vagy az effektor funkciókat nem indukáló MPO felszabadulást neutrofil granulociták esetében, feltételezhető, hogy ez a sejt-sejt kommunikáció a *C. lunata* elleni védekezésben nagyon fontos szerepet játszik.

8 Summary

Curvularia species are filamentous fungi having practical significance for both the human health and the agriculture. Several studies have been performed on these species as plant pathogens but from a human pathogenic concept, we have only few information about them. Some of these fungi can cause human phaeohyphomycoses (*i.e.* mycoses caused by dematiaceous fungi) that manifest as local infections in healthy individuals and as invasive infection in immunosuppressed patients. Among the members of the genus, *C. lunata*, *C. hawaiiensis* and *C. spicifera* are the most frequently isolated species from human infections, that are highly melanized hence the role of the pigment as a potential virulence factor can be investigated. As far as in the last decades, case number of infections caused by opportunistic pathogenic filamentous fungi including the less characterized non-*Aspergillus* species have been increasing, research of these fungi became an intensively studies area.

During this study, our aim was to examine the interaction of *C. lunata* with three cell types of the innate immunity.

To model the interaction with monocytes and macrophages, we used the THP-1 cell line and examined the response of the cells to conidia and hyphae as well. Response to hyphae was analyzed in case of *C. hawaiiensis* and *C. spicifera*, too. Interaction of neutrophil granulocytes and young hyphae of *C. lunata* was simulated using primer immune cells.

1. Response of monocytes to *Curvularia* strains

THP-1 monocytes did not interact with the large and melanized conidia of *C. lunata*, and the percentage of connecting cells was very low in phagocytosis assay. Majority of positive events was were not actual internalization. As melanin can affect phagocytosis, the assay was performed with conidia harvested from cultures grown on melanin biosynthesis inhibitory medium. However, the lack of melanin in the conidial cell wall did not increase the ratio of the connecting cells. THP-1 monocytes didn't produce any TNF α , IL6, IL8 or IL10 cytokines, neither in response to melanin inhibited nor to melanized conidia.

Monocytes can be activated by microbial signals, and during this process, the pattern of the cell surface receptors changes. Activation may start differentiation of monocytes to macrophage or dendritic cell but can maintain the monocytic state as well. Monocytes also participate in the antigen presentation.

Activation of THP-1 monocytes was examined in presence of both conidia and hyphae. Conidia of *C. lunata* didn't induce activation of cells, probably antigen presentation is also missing, that can be explained by the low level of interaction. Absence of melanin from the conidial cell wall had no effect on the lack of activation or antigen presentation. We did not observe the gene expression pattern specific to activation in the presence of hyphae of any tested *Curvularia* strain, although during investigation of late immune response to *C. lunata*, aggregation of monocytes could be seen around the hyphae. In this case, we also could not suppose antigen presentation. Hyphae of *C. hawaiiensis* and *C. spicifera* didn't induce aggregation of monocytes. The cells could not reduce viability of fungi during the interaction.

Cytokine production of THP-1 monocytes was also analyzed as an effect of fungi. *C. hawaiiensis* and *C. spicifera* did not induce the release of the examined cytokines. Production of anti-inflammatory IL10 cytokine as a response to *C. lunata* hyphae can be related to the chronic nature of infections caused by the fungus. Downregulation of *HLADRA* can refer to the inhibition of inflammation. At the same time, *C. lunata* induced the release of IL8, which is the main attractant for neutrophil granulocytes.

2. Response of macrophages to *Curvularia* strains

Interaction of *Curvularia* species was investigated with differentiated THP-1 cells showing macrophage-like phenotype. Conidia of *C. lunata* was recognized more efficiently by the differentiated cells and the ratio of phagocytizing cells increased. The majority of interactions was actual internalization despite the size of the conidia.

Hyphae in this case did not induce aggregation of cells but connection of macrophages and conidia was seen even after germination, so macrophages may play role in the recognition of conidia.

Interaction with the cells did not reduce the viability of strains and macrophages on their own were not capable of efficient killing.

3. Response of neutrophil granulocytes to young hyphae of *C. lunata*

During our experiments, we concluded that neutrophil granulocytes could recognize *C. lunata* hyphae in a serum dependent way. This process induced oxidative burst in the cells. Fungus could produce a soluble factor, which was able to trigger the activation of cells but did not provoke ROS generation. NET formation is considered as an important effector function of neutrophils against large microbes. Presence of *C. lunata* did not trigger NET

formation, although cells attached to the hyphae. Absence of NET can be explained by the radical decline in the concentration of hydrogen peroxide during the interaction, as formation of NET is regulated by ROS. According to our results, the fungi acidifies its environment during the interaction. This pH change inhibits neutrophil functions primarily by the blockage of oxidative burst. Under these circumstances, neutrophil granulocytes could not kill efficiently *C. lunata*.

Based on our results, monocytes recognize hyphae of *C. lunata* while macrophages react to the conidia. In case of monocytes, we noticed the anti-inflammatory processes to become conspicuous, that can correlate with the development of chronic infections. Neutrophil granulocytes can recognize fungal hyphae after serum opsonization, but the fungi can block effector functions of neutrophils. None of the investigated cell types could kill *C. lunata* or the other *Curvularia* strains under these isolated circumstances. While during interactions we detected the production of immunoregulating molecules like IL8 in case of monocytes (that is responsible for the recruitment of neutrophils) or MPO release by neutrophil granulocytes that did not induce the effector functions of the cells, we could assume that protection against *C. lunata* may depend on this cell-cell communication.

9 Irodalomjegyzék

- Akira, S., S. Uematsu & O. Takeuchi (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124, 783-801.
- Altire-Werber, E. & S. C. Edberg (1985) An animal model of *Curvularia geniculata* and its relationship with human disease. *Mycopathologia*, 89, 69-73.
- Ambrosetti, D., V. Hofman V., L. Castillo, M. Gari-Toussaint & P. Hofman (2006) An expansive paranasal sinus tumour-like lesion caused by *Bipolaris spicifera* in an immunocompetent patient. *Histopathology*, 49, 660-2.
- Ammon, C., S. P. Meyer, L. Schwarzfischer, S. W. Krause, R. Andreesen & M. Kreutz (2000) Comparative analysis of integrin expression on monocyte-derived macrophages and monocyte-derived dendritic cells. *Immunology*, 100, 364-9.
- Andrianaki, A. M., I. Kymizi, K. Thanopoulou, C. Baldin, E. Drakos, S. S. M. Soliman, A. C. Shetty, C. McCracken, T. Akoumianaki, K. Stylianou, P. Ioannou, C. Pontikoglou, H. A. Papadaki, M. Tzardi, V. Belle, E. Etienne, A. Beauvais, G. Samonis, D. P. Kontoyiannis, E. Andreaskos, V. M. Bruno, A. S. Ibrahim & G. Chamilos (2018) Iron restriction inside macrophages regulates pulmonary host defense against *Rhizopus* species. *Nat Commun*, 9, 3333.
- Antachopoulos, C. & E. Roilides (2005) Cytokines and fungal infections. *Br J Haematol*, 129, 583-96.
- Aplin, A. E., A. Howe, S. K. Alahari & R. L. Juliano (1998) Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev*, 50, 197-263.
- Arai, Y., Y. Nishinaka, T. Arai, M. Morita, K. Mizugishi, S. Adachi, A. Takaori-Kondo, T. Watanabe & K. Yamashita (2014) Uric acid induces NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation. *Biochem Biophys Res Commun*, 443, 556-61.
- Arif, S. & J. R. Perfect (2017) Emergence of the molds other than *Aspergillus* in immunocompromised patients. *Clin Chest Med*, 38, 555-573.
- Arnold, D. E. & J. R. Heimall (2017) A Review of chronic granulomatous disease. *Adv Ther*, 34, 2543-2557.
- Augier, S., T. Ciucci, C. Luci, G. F. Carle, C. Blin-Wakkach & A. Wakkach (2010) Inflammatory blood monocytes contribute to tumor development and represent a privileged target to improve host immunosurveillance. *J Immunol*, 185, 7165-73.
- Babior, B. M., J. D. Lambeth & W. Nauseef (2002) The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys*, 397, 342-4.
- Badiee, P., A. Alborzi & M. Joukar (2011) Molecular assay to detect nosocomial fungal infections in intensive care units. *Eur J Intern Med*, 22, 611-5.
- Balla, A., J. Pierson, J. Hugh, C. Wojewoda, P. Gibson & L. Greene (2016) Disseminated cutaneous *Curvularia* infection in an immunocompromised host; diagnostic challenges and experience with voriconazole. *J Cutan Pathol*, 43, 383-7.
- Baqui, A. A., T. F. Meiller, J. I. Kelley, B. F. Turng & W. A. Falkler (1999) Antigen activation of THP-1 human monocytic cells after stimulation with lipopolysaccharide from oral microorganisms and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Periodontal Res*, 34, 203-13.

- Beckett, A. R., S. A. Kahn, R. Seay & A. C. Lintner (2017) Invasive *Curvularia* infections in burn patients: a case series. *Surgical Infections Case Reports*, 2.
- Bedard, K. & K. H. Krause (2007) The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 87, 245-313.
- Behnen, M., S. Moller, A. Brozek, M. Klinger & T. Laskay (2017) Extracellular acidification inhibits the ROS-dependent formation of neutrophil extracellular traps. *Front Immunol*, 8, 184.
- Behnsen, J., P. Narang, M. Hasenberg, F. Gunzer, U. Bilitewski, N. Klippel, M. Rohde, M. Brock, A. A. Brakhage & M. Gunzer (2007) Environmental dimensionality controls the interaction of phagocytes with the pathogenic fungi *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*. *PLoS Pathog*, 3, e13.
- Ben-Ami, R., R. E. Lewis, Raad, II & D. P. Kontoyiannis (2009) Phaeohyphomycosis in a tertiary care cancer center. *Clin Infect Dis*, 48, 1033-41.
- Benedict, K. & B. J. Park (2014) Invasive fungal infections after natural disasters. *Emerg Infect Dis*, 20, 349-55.
- Bentwood, B. J. & P. M. Henson (1980) The sequential release of granule constituents from human neutrophils. *J Immunol*, 124, 855-62.
- Berbee, M. L., M. Pirseyedi & S. Hubbard. (1999) *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens inferred from ITS and glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycologia*, 91, 964-977.
- Bhatia, S., M. Fei, M. Yarlagadda, Z. Qi, S. Akira, S. Saijo, Y. Iwakura, N. van Rooijen, G. A. Gibson, C. M. St Croix, A. Ray & P. Ray (2011) Rapid host defense against *Aspergillus fumigatus* involves alveolar macrophages with a predominance of alternatively activated phenotype. *PLoS One*, 6, e15943.
- Bianchi, M., A. Hakkim, V. Brinkmann, U. Siler, R. A. Seger, A. Zychlinsky & J. Reichenbach (2009) Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood*, 114, 2619-22.
- Boeddha, N. P., D. Kerklaan, A. Dunbar, E. van Puffelen, N. M. A. Nagtzaam, I. Vanhorebeek, G. Van den Berghe, J. A. Hazelzet, K. F. Joosten, S. C. Verbruggen, W. A. Dik & G. J. Driessen (2018) HLA-DR expression on monocyte subsets in critically ill children. *Pediatr Infect Dis J*, 37, 1034-1040.
- Borregaard, N. (2010) Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*, 33, 657-70.
- Bosshart, H. & M. Heinzelmann (2016) THP-1 cells as a model for human monocytes. *Ann Transl Med*, 4, 438.
- Branzk, N., A. Lubojemska, S. E. Hardison, Q. Wang, M. G. Gutierrez, G. D. Brown & V. Papayannopoulos (2014) Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat Immunol*, 15, 1017-25.
- Brinkmann, V., U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D. S. Weiss, Y. Weinrauch & A. Zychlinsky (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303, 1532-5.
- Busch, R., C. H. Rinderknecht, S. Roh, A. W. Lee, J. J. Harding, T. Burster, T. M. Hornell & E. D. Mellins (2005) Achieving stability through editing and chaperoning: regulation of MHC class II peptide binding and expression. *Immunol Rev*, 207, 242-60.
- Butler, A. (1998) Vanadium haloperoxidases. *Curr Opin Chem Biol*, 2, 279-85.

- Butler, A., J. N. Carter & M. T. Simpson. 2001. In *Handbook of Metalloproteins*, eds. I. Bertini, A. Sigel & H. Sigel, 153–179. New York: Marcel Dekker Inc.
- Carter, E. & C. Boudreaux (2004) Fatal cerebral phaeohyphomycosis due to *Curvularia lunata* in an immunocompetent patient. *J Clin Microbiol*, 42, 5419-23.
- Cavanna, C., E. Seminari, A. Pusateri, F. Mangione, F. Lallitto, M. C. Esposto & F. Pagella (2014) Allergic fungal rhinosinusitis due to *Curvularia lunata*. *New Microbiol*, 37, 241-5.
- Chang, Y. C., E. Graf & A. M. Green (2018) Invasive *curvularia* infection in pediatric patients with hematologic malignancy identified by fungal sequencing. *J Pediatric Infect Dis Soc*.
- Chanput, W., J. J. Mes & H. J. Wichers (2014) THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *Int Immunopharmacol*, 23, 37-45.
- Chapurin, N., C. Wang, D. M. Steinberg & D. W. Jang (2016) Hyperprolactinemia secondary to allergic fungal sinusitis compressing the pituitary gland. *Case Rep Otolaryngol*, 2016, 7260707.
- Chowdhary, A., K. Agarwal, S. Kathuria, S. N. Gaur, H. S. Randhawa & J. F. Meis (2014) Allergic bronchopulmonary mycosis due to fungi other than *Aspergillus*: a global overview. *Crit Rev Microbiol*, 40, 30-48.
- Chowdhary, A., H. S. Randhawa, V. Singh, Z. U. Khan, S. Ahmad, S. Kathuria, P. Roy, G. Khanna & J. Chandra (2011) *Bipolaris hawaiiensis* as etiologic agent of allergic bronchopulmonary mycosis: first case in a paediatric patient. *Med Mycol*, 49, 760-5.
- Clark, H. L., S. Abbondante, M. S. Minns, E. N. Greenberg, Y. Sun & E. Pearlman (2018) Protein deiminase 4 and CR3 regulate *Aspergillus fumigatus* and beta-glucan-induced neutrophil extracellular trap formation, but hyphal killing is dependent only on CR3. *Front Immunol*, 9, 1182.
- Cohen, M. S., R. E. Isturiz, H. L. Malech, R. K. Root, C. M. Wilfert, L. Gutman & R. H. Buckley (1981) Fungal infection in chronic granulomatous disease. The importance of the phagocyte in defense against fungi. *Am J Med*, 71, 59-66.
- Condon, B. J., D. Wu, N. Krasevec, B. A. Horwitz & B. G. Turgeon. 2013. Comparative genomics of *Cochliobolus* phytopathogens. In *Genomics of Plant-Associated Fungi and Oomycetes*. eds. R. Dean, A. Lichens-Park & C. Kole. Springer.
- Conesa, A., P. J. Punt & C. A. van den Hondel (2002) Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. *J Biotechnol*, 93, 143-58.
- Cortez, K. J., C. A. Lyman, S. Kottlilil, H. S. Kim, E. Roilides, J. Yang, B. Fullmer, R. Lempicki & T. J. Walsh (2006) Functional genomics of innate host defense molecules in normal human monocytes in response to *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun*, 74, 2353-65.
- Couper, K. N., D. G. Blount & E. M. Riley (2008) IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol*, 180, 5771-7.
- da Cunha, K. C., D. A. Sutton, A. W. Fothergill, J. Gene, J. Cano, H. Madrid, S. Hoog, P. W. Crous & J. Guarro (2013) In vitro antifungal susceptibility and molecular identity of 99 clinical isolates of the opportunistic fungal genus *Curvularia*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 76, 168-74.
- Dale, D. C., L. Boxer & W. C. Liles (2008) The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood*, 112, 935-45.
- de Cassia, R. G. R. & S. R. Pombeiro-Sponchiado (2005) Antioxidant activity of the melanin pigment extracted from *Aspergillus nidulans*. *Biol Pharm Bull*, 28, 1129-31.

- de Waal Malefyt, R., J. Abrams, B. Bennett, C. G. Figdor & J. E. de Vries (1991) Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med*, 174, 1209-20.
- Debourgogne, A., J. Dorin & M. Machouart (2016) Emerging infections due to filamentous fungi in humans and animals: only the tip of the iceberg? *Environ Microbiol Rep*, 8, 332-42.
- Deepe, G. S., Jr. & R. S. Gibbons (2003) Protective and memory immunity to *Histoplasma capsulatum* in the absence of IL-10. *J Immunol*, 171, 5353-62.
- Drewry, A. M., E. A. Ablordeppey, E. T. Murray, E. R. Beiter, A. H. Walton, M. W. Hall & R. S. Hotchkiss (2016) Comparison of monocyte human leukocyte antigen-DR expression and stimulated tumor necrosis factor alpha production as outcome predictors in severe sepsis: a prospective observational study. *Crit Care*, 20, 334.
- Espinosa, V., A. Jhingran, O. Dutta, S. Kasahara, R. Donnelly, P. Du, J. Rosenfeld, I. Leiner, C. C. Chen, Y. Ron, T. M. Hohl & A. Rivera (2014) Inflammatory monocytes orchestrate innate antifungal immunity in the lung. *PLoS Pathog*, 10, e1003940.
- Faurschou, M., O. E. Sorensen, A. H. Johnsen, J. Askaa & N. Borregaard (2002) Defensin-rich granules of human neutrophils: characterization of secretory properties. *Biochim Biophys Acta*, 1591, 29-35.
- Fernández-Fueyo, E., M. van Wingerden, R. Renirie, R. Wever, Y. Ni, D. Holtmann & F. Hollmann (2015) Chemoenzymatic halogenation of phenols by using the haloperoxidase from *Curvularia inaequalis*. *Chem Cat Chem*, 7, 4035-4038.
- Frank, T., Y. Esquenazi, M. Nigo, A. Wanger, B. Portnoy & S. Shepard (2016) Disseminated phaeohyphomycosis with brain abscess and biliary invasion due to *Bipolaris* spp. in an immunocompetent patient. *Ann Clin Lab Sci*, 46, 439-42.
- Fuchs, T. A., U. Abed, C. Goosmann, R. Hurwitz, I. Schulze, V. Wahn, Y. Weinrauch, V. Brinkmann & A. Zychlinsky (2007) Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*, 176, 231-41.
- Gadgil, N., M. Kupferman, S. Smitherman, G. N. Fuller & G. Rao (2013) *Curvularia* brain abscess. *J Clin Neurosci*, 20, 173-5.
- Gao, J.-X. & J. Chen (2017a) Involvement of a polyketide synthetase CIPKS18 in the regulation of vegetative growth, melanin and toxin synthesis, and virulence in *Curvularia lunata*. *The plant pathology journal*, 33, 597-601.
- Gao, J.-X., C.-J. Yu, M. Wang, J.-N. Sun, Y.-Q. Li & J. Chen (2017) Involvement of a velvet protein ClVelB in the regulation of vegetative differentiation, oxidative stress response, secondary metabolism, and virulence in *Curvularia lunata*. *Scientific Reports*, 7, 46054-46054.
- Gao, J. X. & J. Chen (2017b) Involvement of a polyketide synthetase CIPKS18 in the regulation of vegetative growth, melanin and toxin synthesis, and virulence in *Curvularia lunata*. *Plant Pathol J*, 33, 597-601.
- Gao, S., Y. Li, J. Gao, Y. Suo, K. Fu & J. Chen (2014) Genome sequence and virulence variation-related transcriptome profiles of *Curvularia lunata*, an important maize pathogenic fungus. *BMC Genomics*, 15, 627.
- Gao, S. G., F. H. Zhou, T. Liu, Y. Y. Li & J. Chen (2013) A MAP kinase gene, Clk1, is required for conidiation and pathogenicity in the phytopathogenic fungus *Curvularia lunata*. *J Basic Microbiol*, 53, 214-23.
- Gazendam, R. P., J. L. van Hamme, A. T. Tool, M. Hoogenboezem, J. M. van den Berg, J. M. Prins, L. Vitkov, F. L. van de Veerdonk, T. K. van den Berg, D. Roos & T. W.

- Kuijpers (2016) Human neutrophils use different mechanisms to kill *Aspergillus fumigatus* conidia and hyphae: evidence from phagocyte defects. *J Immunol*, 196, 1272-83.
- Gersuk, G. M., D. M. Underhill, L. Zhu & K. A. Marr (2006) Dectin-1 and TLRs permit macrophages to distinguish between different *Aspergillus fumigatus* cellular states. *J Immunol*, 176, 3717-24.
- Ghuman, H. & K. Voelz (2017) Innate and Adaptive Immunity to *Mucorales*. *J Fungi (Basel)*, 3.
- Goncalves, R. C., H. C. Lisboa & S. R. Pombeiro-Sponchiado (2012) Characterization of melanin pigment produced by *Aspergillus nidulans*. *World J Microbiol Biotechnol*, 28, 1467-74.
- Gonzalez, A. S., B. W. Bardoel, C. J. Harbort & A. Zychlinsky (2014) Induction and quantification of neutrophil extracellular traps. *Methods Mol Biol*, 1124, 307-18.
- Gordon, S. & P. R. Taylor (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*, 5, 953-64.
- Groll, A. H. & T. J. Walsh (2001) Uncommon opportunistic fungi: new nosocomial threats. *Clinical Microbiology and Infection*, 7, 8-24.
- Gultekin, Y., E. Eren & N. Ozoren (2015) Overexpressed NLRC3 acts as an anti-inflammatory cytosolic protein. *J Innate Immun*, 7, 25-36.
- Gupta, R., V. Sharma, S. Sridhara, B. P. Singh & N. Arora (2004) Identification of serine protease as a major allergen of *Curvularia lunata*. *Allergy*, 59, 421-7.
- Hager, M., J. B. Cowland & N. Borregaard (2010) Neutrophil granules in health and disease. *J Intern Med*, 268, 25-34.
- Hansen, E. H., L. Albertsen, T. Schafer, C. Johansen, J. C. Frisvad, S. Molin & L. Gram (2003) *Curvularia* haloperoxidase: antimicrobial activity and potential application as a surface disinfectant. *Appl Environ Microbiol*, 69, 4611-7.
- Hasan, Z., R. Renirie, R. Kerkman, H. J. Ruijsenaars, A. F. Hartog & R. Wever (2006) Laboratory-evolved vanadium chloroperoxidase exhibits 100-fold higher halogenating activity at alkaline pH: catalytic effects from first and second coordination sphere mutations. *J Biol Chem*, 281, 9738-44.
- Hecht, H. J., H. Sobek, T. Haag, O. Pfeifer & K. H. van Pee (1994) The metal-ion-free oxidoreductase from *Streptomyces aureofaciens* has an alpha/beta hydrolase fold. *Nat Struct Biol*, 1, 532-7.
- Heinekamp, T., H. Schmidt, K. Lapp, V. Pätz, I. Shopova, N. Köster-Eiserfunke, T. Krüger, O. Kniemeyer & A. A. Brakhage (2015) Interference of *Aspergillus fumigatus* with the immune response. *Seminars in Immunopathology*, 37, 141-152.
- Heinekamp, T., A. Thywissen, J. Macheleidt, S. Keller, V. Valiante & A. A. Brakhage (2012) *Aspergillus fumigatus* melanins: interference with the host endocytosis pathway and impact on virulence. *Front Microbiol*, 3, 440.
- Hoffmann, E., O. Dittrich-Breiholz, H. Holtmann & M. Kracht (2002) Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol*, 72, 847-55.
- Hofmann, B., S. Tolzer, I. Pelletier, J. Altenbuchner, K. H. van Pee & H. J. Hecht (1998) Structural investigation of the cofactor-free chloroperoxidases. *J Mol Biol*, 279, 889-900.
- Hymery, N., O. Puel, S. Tadrist, C. Canlet, H. Le Scouarnec, E. Coton & M. Coton (2017) Effect of PR toxin on THP1 and Caco-2 cells: an in vitro study. *World Mycotoxin Journal*, 10, 375-386.

- Hynes, R. O. (1987) Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell*, 48, 549-54.
- Ibrahim-Granet, O., B. Philippe, H. Boleti, E. Boisivieux-Ulrich, D. Grenet, M. Stern & J. P. Latge (2003) Phagocytosis and intracellular fate of *Aspergillus fumigatus* conidia in alveolar macrophages. *Infect Immun*, 71, 891-903.
- Ingersoll, M. A., R. Spanbroek, C. Lottaz, E. L. Gautier, M. Frankenberger, R. Hoffmann, R. Lang, M. Haniffa, M. Collin, F. Tacke, A. J. Habenicht, L. Ziegler-Heitbrock & G. J. Randolph (2010) Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood*, 115, e10-9.
- Ivanova, E. A. & A. N. Orekhov (2016) Monocyte activation in immunopathology: cellular test for development of diagnostics and therapy. *J Immunol Res*, 2016, 4789279.
- Jacobson, E. S., E. Hove & H. S. Emery (1995) Antioxidant function of melanin in black fungi. *Infect Immun*, 63, 4944-5.
- Jakubzick, C., E. L. Gautier, S. L. Gibbings, D. K. Sojka, A. Schlitzer, T. E. Johnson, S. Ivanov, Q. Duan, S. Bala, T. Condon, N. van Rooijen, J. R. Grainger, Y. Belkaid, A. Ma'ayan, D. W. Riches, W. M. Yokoyama, F. Ginhoux, P. M. Henson & G. J. Randolph (2013) Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. *Immunity*, 39, 599-610.
- Jakubzick, C. V., G. J. Randolph & P. M. Henson (2017) Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nature Reviews Immunology*, 17, 349.
- Jhingran, A., K. B. Mar, D. K. Kumasaka, S. E. Knoblaugh, L. Y. Ngo, B. H. Segal, Y. Iwakura, C. A. Lowell, J. A. Hamerman, X. Lin & T. M. Hohl (2012) Tracing conidial fate and measuring host cell antifungal activity using a reporter of microbial viability in the lung. *Cell Rep*, 2, 1762-73.
- Johansson, M. W., M. Patarroyo, F. Oberg, A. Siegbahn & K. Nilsson (1997) Myeloperoxidase mediates cell adhesion via the alpha M beta 2 integrin (Mac-1, CD11b/CD18). *J Cell Sci*, 110 (Pt 9), 1133-9.
- Kaur, J., L. Kautto, A. Penesyan, W. Meyer, L. D. H. Elbourne, I. T. Paulsen & H. Nevalainen (2019) Interactions of an emerging fungal pathogen *Scedosporium aurantiacum* with human lung epithelial cells. *Scientific Reports*, 9, 5035.
- Keshari, R. S., A. Jyoti, M. Dubey, N. Kothari, M. Kohli, J. Bogra, M. K. Barthwal & M. Dikshit (2012) Cytokines induced neutrophil extracellular traps formation: implication for the inflammatory disease condition. *PLoS One*, 7, e48111.
- Kessenbrock, K., M. Krumbholz, U. Schonermarck, W. Back, W. L. Gross, Z. Werb, H. J. Grone, V. Brinkmann & D. E. Jenne (2009) Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med*, 15, 623-5.
- Klebanoff, S. J. (1999) Myeloperoxidase. *Proc Assoc Am Physicians*, 111, 383-9.
- Klebanoff, S. J. (2005) Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol*, 77, 598-625.
- Kolaczowska, E. & P. Kubes (2013) Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 13, 159-75.
- Koua, D., L. Cerutti, L. Falquet, C. J. Sigrist, G. Theiler, N. Hulo & C. Dunand (2009) PeroxiBase: a database with new tools for peroxidase family classification. *Nucleic Acids Res*, 37, D261-6.
- Krizsán, K., T. Papp, P. Manikandan, S. Shobana, M. Chandrasekaran, C. Vágvölgyi & L. Kredics. 2015. Clinical importance of the genus *Curvularia*. In *Medical Mycology: Current Trends and Future Prospects*, ed. S.-G. M. Razzaghi-Abyaneh M, Rai M, 147-204. Boca Raton, FL: CRC Press.

- Kuhns, D. B., D. A. Long Priel, J. Chu & K. A. Zarembler (2015) Isolation and functional analysis of human neutrophils. *Curr Protoc Immunol*, 111, 7 23 1-16.
- Kusai, N. A., M. Mior Zakuan Azmi, S. Zulkifly, M. T. Yusof & N. A. I. Mohd Zainudin (2016) Morphological and molecular characterization of *Curvularia* and related species associated with leaf spot disease of rice in Peninsular Malaysia. *Rendiconti Lincei*, 27, 205-214.
- Landaeta, M., M. Vial, C. A. Jimenez & L. G. Debiane (2017) Allergic bronchopulmonary mycosis presenting as a new lung mass. *BMJ Case Rep*, 2017.
- Lanisnik Rizner, T. & M. H. Wheeler (2003) Melanin biosynthesis in the fungus *Curvularia lunata* (teleomorph: *Cochliobolus lunatus*). *Can J Microbiol*, 49, 110-9.
- Latge, J. P. (1999) *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev*, 12, 310-50.
- Lau, D., H. Mollnau, J. P. Eiserich, B. A. Freeman, A. Daiber, U. M. Gehling, J. Brummer, V. Rudolph, T. Munzel, T. Heitzer, T. Meinertz & S. Baldus (2005) Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 431-6.
- Laupeze, B., O. Fardel, M. Onno, N. Bertho, B. Drenou, R. Fauchet & L. Amiot (1999) Differential expression of major histocompatibility complex class Ia, Ib, and II molecules on monocytes-derived dendritic and macrophagic cells. *Hum Immunol*, 60, 591-7.
- Lauvau, G., P. Loke & T. M. Hohl (2015) Monocyte-mediated defense against bacteria, fungi, and parasites. *Semin Immunol*, 27, 397-409.
- Le, T., L. Leung, W. L. Carroll & K. R. Schibler (1997) Regulation of interleukin-10 gene expression: possible mechanisms accounting for its upregulation and for maturational differences in its expression by blood mononuclear cells. *Blood*, 89, 4112-9.
- Lefkowitz, D. L., E. Roberts, K. Grattendick, C. Schwab, R. Stuart, J. Lincoln, R. C. Allen, N. Moguilevsky, A. Bollen & S. S. Lefkowitz (2000) The endothelium and cytokine secretion: the role of peroxidases as immunoregulators. *Cell Immunol*, 202, 23-30.
- Libby, R. D., J. A. Thomas, L. W. Kaiser & L. P. Hager (1982) Chloroperoxidase halogenation reactions. Chemical versus enzymic halogenating intermediates. *J Biol Chem*, 257, 5030-7.
- Liu, T., L. Liu, X. Jiang, X. Huang & J. Chen (2009) A new furanoid toxin produced by *Curvularia lunata*, the causal agent of maize *Curvularia* leaf spot. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 31, 22-27.
- Liu, T., Y. Wang, B. Ma, J. Hou, Y. Jin, Y. Zhang, X. Ke, L. Tai, Y. Zuo & K. Dey (2016) Clg2p interacts with Clf and ClUrase to regulate appressorium formation, pathogenicity and conidial morphology in *Curvularia lunata*. *Sci Rep*, 6, 24047.
- Liu, T., S. Xu, L. Liu, F. Zhou, J. Hou & J. Chen (2011) Cloning and characteristics of Brn1 gene in *Curvularia lunata* causing leaf spot in maize. *European journal of plant pathology*, 131, 211-219.
- Liu, T. N., T. M'Timkulu, J. Geigert, B. Wolf, S. L. Neidleman, D. Silva & J. C. Hunter-Cevera (1987) Isolation and characterization of a novel nonheme chloroperoxidase. *Biochem Biophys Res Commun*, 142, 329-33.
- Livak, K. J. & T. D. Schmittgen (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-8.
- Loeffler, J., Z. Haddad, M. Bonin, N. Romeike, M. Mezger, U. Schumacher, M. Kapp, F. Gebhardt, G. U. Grigoleit, S. Stevanovic, H. Einsele & H. Hebart (2009) Interaction

- analyses of human monocytes co-cultured with different forms of *Aspergillus fumigatus*. *J Med Microbiol*, 58, 49-58.
- Luther, K., A. Torosantucci, A. A. Brakhage, J. Heesemann & F. Ebel (2007) Phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* conidia by murine macrophages involves recognition by the dectin-1 beta-glucan receptor and Toll-like receptor 2. *Cell Microbiol*, 9, 368-81.
- Macedo-Ribeiro, S., W. Hemrika, R. Renirie, R. Wever & A. Messerschmidt (1999) X-ray crystal structures of active site mutants of the vanadium-containing chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis*. *J Biol Inorg Chem*, 4, 209-19.
- Madrid, H., K. C. da Cunha, J. Gene, J. Dijksterhuis, J. Cano, D. A. Sutton, J. Guarro & P. W. Crous (2014) Novel *Curvularia* species from clinical specimens. *Persoonia*, 33, 48-60.
- Manamgoda, D. S., L. Cai, A. H. Bahkali, E. Chukeatirote & K. D. Hyde (2011) *Cochliobolus*: an overview and current status of species. *Fungal Diversity*, 51, 3-42.
- Manamgoda, D. S., L. Cai, E. H. C. McKenzie, P. W. Crous, H. Madrid, E. Chukeatirote, R. G. Shivas, Y. P. Tan & K. D. Hyde (2012) A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris* - *Cochliobolus* - *Curvularia* Complex. *Fungal Diversity*, 56, 131-144.
- Manzoli, T. F., E. J. Troster, J. F. Ferranti & M. M. Sales (2016) Prolonged suppression of monocytic human leukocyte antigen-DR expression correlates with mortality in pediatric septic patients in a pediatric tertiary Intensive Care Unit. *J Crit Care*, 33, 84-9.
- Marr, K. A., M. Koudadoust, M. Black & S. A. Balajee (2001) Early events in macrophage killing of *Aspergillus fumigatus* conidia: new flow cytometric viability assay. *Clin Diagn Lab Immunol*, 8, 1240-7.
- Martinez, F. O. & S. Gordon (2014) The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*, 6, 13.
- Martinez, F. O., L. Helming, R. Milde, A. Varin, B. N. Melgert, C. Draijer, B. Thomas, M. Fabbri, A. Crawshaw, L. P. Ho, N. H. Ten Hacken, V. Cobos Jimenez, N. A. Kootstra, J. Hamann, D. R. Greaves, M. Locati, A. Mantovani & S. Gordon (2013) Genetic programs expressed in resting and IL-4 alternatively activated mouse and human macrophages: similarities and differences. *Blood*, 121, e57-69.
- McCormick, A., L. Heesemann, J. Wagener, V. Marcos, D. Hartl, J. Loeffler, J. Heesemann & F. Ebel (2010) NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Microbes Infect*, 12, 928-36.
- McGaha, T. L., Y. Chen, B. Ravishankar, N. van Rooijen & M. C. Karlsson (2011) Marginal zone macrophages suppress innate and adaptive immunity to apoptotic cells in the spleen. *Blood*, 117, 5403-12.
- McGinnis, M. R. (1983) Chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis: new concepts, diagnosis, and mycology. *J Am Acad Dermatol*, 8, 1-16.
- Messerschmidt, A., L. Prade & R. Wever (1997) Implications for the catalytic mechanism of the vanadium-containing enzyme chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis* by X-ray structures of the native and peroxide form. *Biol Chem*, 378, 309-15.
- Messerschmidt, A. & R. Wever (1996) X-ray structure of a vanadium-containing enzyme: chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 392-6.

- Mestas, J. & C. C. Hughes (2004) Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol*, 172, 2731-8.
- Metzler, K. D., T. A. Fuchs, W. M. Nauseef, D. Reumaux, J. Roesler, I. Schulze, V. Wahn, V. Papayannopoulos & A. Zychlinsky (2011) Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood*, 117, 953-9.
- Miyamoto, S., G. R. Martinez, D. Rettori, O. Augusto, M. H. Medeiros & P. Di Mascio (2006) Linoleic acid hydroperoxide reacts with hypochlorous acid, generating peroxy radical intermediates and singlet molecular oxygen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 293-8.
- Moody, M. N., J. Tschen & M. Mesko (2012) Cutaneous *Curvularia* infection of the forearm. *Cutis*, 89, 65-8.
- Morris, D. R. & L. P. Hager (1966) Chloroperoxidase. I. Isolation and properties of the crystalline glycoprotein. *J Biol Chem*, 241, 1763-8.
- Mullins, J., R. Harvey & A. Seaton (1976) Sources and incidence of airborne *Aspergillus fumigatus* (Fres). *Clin Allergy*, 6, 209-17.
- Murphy, K., P. Travers, M. Walport & C. Janeway. 2008. *Janeway's immunobiology*. New York : Garland Science,.
- Murray, P. J. & T. A. Wynn (2011) Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*, 11, 723-37.
- Nagy, E., L. Kredics, Z. Antal & T. Papp (2004) Molecular diagnosis, epidemiology and taxonomy of emerging medically important filamentous fungi. *Reviews in Medical Microbiology*, 15, 153-162.
- Nair, S., N. Kukreja, B. P. Singh & N. Arora (2011) Identification of B cell epitopes of alcohol dehydrogenase allergen of *Curvularia lunata*. *PLoS One*, 6, e20020.
- Nau, G. J., J. F. Richmond, A. Schlesinger, E. G. Jennings, E. S. Lander & R. A. Young (2002) Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 1503-8.
- Netea, M. G., L. A. Joosten, J. W. van der Meer, B. J. Kullberg & F. L. van de Veerdonk (2015) Immune defence against *Candida* fungal infections. *Nat Rev Immunol*, 15, 630-42.
- Nguyen, G. T., E. R. Green & J. Mecsas (2017) Neutrophils to the ROScues: Mechanisms of NADPH oxidase activation and bacterial resistance. *Front Cell Infect Microbiol*, 7, 373.
- Noda Milla, J. R., J. Jagirdar, S. Levine & J. Peters. 2015. Mold In The Middle. In *A83 GREAT CASES: CLINICAL, RADIOLOGIC AND PATHOLOGIC CORRELATIONS BY MASTER CLINICIANS*. Am J Respir Crit Care Med.
- Odobasic, D., A. R. Kitching, Y. Yang, K. M. O'Sullivan, R. C. Muljadi, K. L. Edgton, D. S. Tan, S. A. Summers, E. F. Morand & S. R. Holdsworth (2013) Neutrophil myeloperoxidase regulates T-cell-driven tissue inflammation in mice by inhibiting dendritic cell function. *Blood*, 121, 4195-204.
- Ohm, R. A., N. Feau, B. Henrissat, C. L. Schoch, B. A. Horwitz, K. W. Barry, B. J. Condon, A. C. Copeland, B. Dhillon, F. Glaser, C. N. Hesse, I. Kosti, K. LaButti, E. A. Lindquist, S. Lucas, A. A. Salamov, R. E. Bradshaw, L. Ciuffetti, R. C. Hamelin, G. H. Kema, C. Lawrence, J. A. Scott, J. W. Spatafora, B. G. Turgeon, P. J. de Wit, S. Zhong, S. B. Goodwin & I. V. Grigoriev (2012) Diverse lifestyles and strategies of

- plant pathogenesis encoded in the genomes of eighteen Dothideomycetes fungi. *PLoS Pathog*, 8, e1003037.
- Ouyang, W., S. Rutz, N. K. Crellin, P. A. Valdez & S. G. Hymowitz (2011) Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol*, 29, 71-109.
- Pagni, M., V. Ioannidis, L. Cerutti, M. Zahn-Zabal, C. V. Jongeneel, J. Hau, O. Martin, D. Kuznetsov & L. Falquet (2007) MyHits: improvements to an interactive resource for analyzing protein sequences. *Nucleic Acids Res*, 35, W433-7.
- Palojarvi, A., J. Petaja, S. Siitonen, C. Janer & S. Andersson (2013) Low monocyte HLA-DR expression as an indicator of immunodepression in very low birth weight infants. *Pediatr Res*, 73, 469-75.
- Papayannopoulos, V. & A. Zychlinsky (2009) NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol*, 30, 513-21.
- Parameswaran, N. & S. Patial (2010) Tumor necrosis factor-alpha signaling in macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 20, 87-103.
- Paredes, K., J. Capilla, D. A. Sutton, E. Mayayo, A. W. Fothergill & J. Guarro (2013) Virulence of *Curvularia* in a murine model. *Mycoses*, 56, 512-5.
- Park-Min, K. H., T. T. Antoniv & L. B. Ivashkiv (2005) Regulation of macrophage phenotype by long-term exposure to IL-10. *Immunobiology*, 210, 77-86.
- Park, S. J. & B. Mehrad (2009) Innate immunity to *Aspergillus* species. *Clin Microbiol Rev*, 22, 535-51.
- Parker, H., M. Dragunow, M. B. Hampton, A. J. Kettle & C. C. Winterbourn (2012) Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus. *J Leukoc Biol*, 92, 841-9.
- Pfaller, M. A. & D. J. Diekema (2004) Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol*, 42, 4419-31.
- Philippe, B., O. Ibrahim-Granet, M. C. Prevost, M. A. Gougerot-Pocidalo, M. Sanchez Perez, A. Van der Meeren & J. P. Latge (2003) Killing of *Aspergillus fumigatus* by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates. *Infect Immun*, 71, 3034-42.
- Phillips, R. J., M. Lutz & B. Premack (2005) Differential signaling mechanisms regulate expression of CC chemokine receptor-2 during monocyte maturation. *J Inflamm (Lond)*, 2, 14.
- Plantinga, M., M. Guillems, M. Vanheerswynghels, K. Deswarte, F. Branco-Madeira, W. Toussaint, L. Vanhoutte, K. Neyt, N. Killeen, B. Malissen, H. Hammad & B. N. Lambrecht (2013) Conventional and monocyte-derived CD11b(+) dendritic cells initiate and maintain T helper 2 cell-mediated immunity to house dust mite allergen. *Immunity*, 38, 322-35.
- Plonka, P. M. & M. Grabacka (2006) Melanin synthesis in microorganisms--biotechnological and medical aspects. *Acta Biochim Pol*, 53, 429-43.
- Poradzka, A., M. Jasik, W. Karnafel & P. Fiedor (2013) Clinical aspects of fungal infections in diabetes. *Acta Pol Pharm*, 70, 587-96.
- Posteraro, B., E. Scarano, M. La Sorda, R. Torelli, E. De Corso, A. Mule, G. Paludetti, G. Fadda & M. Sanguinetti (2010) Eosinophilic fungal rhinosinusitis due to the unusual pathogen *Curvularia inaequalis*. *Mycoses*, 53, 84-8.

- Raffa, R. B., N. S. Eltoukhy & K. F. Raffa (2012) Implications of climate change (global warming) for the healthcare system. *J Clin Pharm Ther*, 37, 502-4.
- Renirie, R., C. Pierlot, R. Wever & J.-M. Aubry (2009) Singlet oxygenation in microemulsion catalysed by vanadium chloroperoxidase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 56, 259–264.
- Revankar, S. G. (2007) Dematiaceous fungi. *Mycoses*, 50, 91-101.
- Revankar, S. G. & D. A. Sutton (2010) Melanized fungi in human disease. *Clin Microbiol Rev*, 23, 884-928.
- Rivera, A., T. M. Hohl, N. Collins, I. Leiner, A. Gallegos, S. Saijo, J. W. Coward, Y. Iwakura & E. G. Pamer (2011) Dectin-1 diversifies *Aspergillus fumigatus*-specific T cell responses by inhibiting T helper type 1 CD4 T cell differentiation. *J Exp Med*, 208, 369-81.
- Roebuck, K. A. (1999) Regulation of interleukin-8 gene expression. *J Interferon Cytokine Res*, 19, 429-38.
- Roilides, E. (2016) Emerging fungi causing human infection: new or better identified? *Clin Microbiol Infect*, 22, 660-1.
- Roilides, E., M. Simitsopoulou, A. Katragkou & T. J. Walsh (2009) Host immune response against *Scedosporium* species. *Medical Mycology*, 47, 433-440.
- Romani, L. (2004) Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol*, 4, 1-23.
- Romani, L., P. Puccetti, A. Mencacci, E. Cenci, R. Spaccapelo, L. Tonnetti, U. Grohmann & F. Bistoni (1994) Neutralization of IL-10 up-regulates nitric oxide production and protects susceptible mice from challenge with *Candida albicans*. *J Immunol*, 152, 3514-21.
- Romero-Martinez, R., M. Wheeler, A. Guerrero-Plata, G. Rico & H. Torres-Guerrero (2000) Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infect Immun*, 68, 3696-703.
- Rosowski, E. E., N. Raffa, B. P. Knox, N. Golenberg, N. P. Keller & A. Huttenlocher (2018) Macrophages inhibit *Aspergillus fumigatus* germination and neutrophil-mediated fungal killing. *PLoS Pathog*, 14, e1007229.
- Sabroe, I., L. R. Prince, E. C. Jones, M. J. Horsburgh, S. J. Foster, S. N. Vogel, S. K. Dower & M. K. Whyte (2003) Selective roles for Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in the regulation of neutrophil activation and life span. *J Immunol*, 170, 5268-75.
- Schaffner, A., H. Douglas & A. Braude (1982) Selective protection against conidia by mononuclear and against mycelia by polymorphonuclear phagocytes in resistance to *Aspergillus*. Observations on these two lines of defense in vivo and in vitro with human and mouse phagocytes. *J Clin Invest*, 69, 617-31.
- Schnitzler, N., H. Peltroche-Llacsahuanga, N. Bestier, J. Zundorf, R. Luttkien & G. Haase (1999) Effect of melanin and carotenoids of *Exophiala (Wangiella) dermatitidis* on phagocytosis, oxidative burst, and killing by human neutrophils. *Infect Immun*, 67, 94-101.
- Schutte, R. J., A. Parisi-Amon & W. M. Reichert (2009) Cytokine profiling using monocytes/macrophages cultured on common biomaterials with a range of surface chemistries. *J Biomed Mater Res A*, 88, 128-39.
- Schwende, H., E. Fitzke, P. Ambs & P. Dieter (1996) Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Leukoc Biol*, 59, 555-61.

- Seger, R. A. (2008) Modern management of chronic granulomatous disease. *Br J Haematol*, 140, 255-66.
- Serbina, N. V., M. Cherny, C. Shi, S. A. Bleau, N. H. Collins, J. W. Young & E. G. Pamer (2009) Distinct responses of human monocyte subsets to *Aspergillus fumigatus* conidia. *J Immunol*, 183, 2678-87.
- Sharma, V., B. P. Singh & N. Arora (2011) Cur l 3, a major allergen of *Curvularia lunata*-derived short synthetic peptides, shows promise for successful immunotherapy. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 45, 1178-84.
- Shi, C. & E. G. Pamer (2011) Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 11, 762-74.
- Spriggs, D. R., S. Deutsch & D. W. Kufe (1992) Genomic structure, induction, and production of TNF-alpha. *Immunol Ser*, 56, 3-34.
- Stappers, M. H. T., A. E. Clark, V. Aimanianda, S. Bidula, D. M. Reid, P. Asamaphan, S. E. Hardison, I. M. Dambuza, I. Valsecchi, B. Kerscher, A. Plato, C. A. Wallace, R. Yuecel, B. Hebecker, M. da Gloria Teixeira Sousa, C. Cunha, Y. Liu, T. Feizi, A. A. Brakhage, K. J. Kwon-Chung, N. A. R. Gow, M. Zanda, M. Piras, C. Zanato, M. Jaeger, M. G. Netea, F. L. van de Veerdonk, J. F. Lacerda, A. Campos, A. Carvalho, J. A. Willment, J. P. Latge & G. D. Brown (2018) Recognition of DHN-melanin by a C-type lectin receptor is required for immunity to *Aspergillus*. *Nature*, 555, 382-386.
- Stoiber, W., A. Obermayer, P. Steinbacher & W. D. Krautgartner (2015) The Role of reactive oxygen Species (ROS) in the formation of extracellular traps (ETs) in humans. *Biomolecules*, 5, 702-23.
- Sun, W., T. A. Kadima, M. A. Pickard & H. B. Dunford (1994) Catalase activity of chloroperoxidase and its interaction with peroxidase activity. *Biochem Cell Biol*, 72, 321-31.
- Taj-Aldeen, S. J., A. A. Hilal & W. A. Schell (2004) Allergic fungal rhinosinusitis: a report of 8 cases. *Am J Otolaryngol*, 25, 213-8.
- Tamoutounour, S., M. Guilliams, F. Montanana Sanchis, H. Liu, D. Terhorst, C. Malosse, E. Pollet, L. Ardouin, H. Luche, C. Sanchez, M. Dalod, B. Malissen & S. Henri (2013) Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. *Immunity*, 39, 925-38.
- Thomas, C. J. & K. Schroder (2013) Pattern recognition receptor function in neutrophils. *Trends Immunol*, 34, 317-28.
- Thuer, E. & T. Gabaldon (2017) Comparative transcriptomics of THP-1 monocytes in response to different pathogens. *bioRxiv*, 155853.
- Tokousbalides, M. C. & H. D. Sisler (1979) Site of inhibition by tricyclazole in the melanin biosynthetic pathway of *Verticillium dahliae*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 11, 64-73.
- Torda, A. J. & P. D. Jones (1997) Necrotizing cutaneous infection caused by *Curvularia brachyspora* in an immunocompetent host. *Australas J Dermatol*, 38, 85-7.
- Toth, A., E. Zajta, K. Csonka, C. Vagvolgyi, M. G. Netea & A. Gacser (2017a) Specific pathways mediating inflammasome activation by *Candida parapsilosis*. *Sci Rep*, 7, 43129.
- Toth, E. J., E. Boros, A. Hoffmann, C. Szebenyi, M. Homa, G. Nagy, C. Vagvolgyi, I. Nagy & T. Papp (2017b) Interaction of THP-1 Monocytes with Conidia and Hyphae of Different *Curvularia* Strains. *Front Immunol*, 8, 1369.

- Tsuchiya, S., M. Yamabe, Y. Yamaguchi, Y. Kobayashi, T. Konno & K. Tada (1980) Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer*, 26, 171-6.
- Urban, C. F., U. Reichard, V. Brinkmann & A. Zychlinsky (2006) Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol*, 8, 668-76.
- van der Veen, B. S., M. P. de Winther & P. Heeringa (2009) Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease. *Antioxid Redox Signal*, 11, 2899-937.
- van Duin, D., A. Casadevall & J. D. Nosanchuk (2002) Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother*, 46, 3394-400.
- van Pee, K. H. & F. Lingens (1985) Purification of bromoperoxidase from *Pseudomonas aureofaciens*. *J Bacteriol*, 161, 1171-5.
- van Schijndel, J. W., E. G. Vollenbroek & R. Wever (1993) The chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis*; a novel vanadium enzyme. *Biochim Biophys Acta*, 1161, 249-56.
- Viola, G. M. & R. Sutton (2010) Allergic fungal sinusitis complicated by fungal brain mass. *Int J Infect Dis*, 14 Suppl 3, e299-301.
- Vishnoi, S., J. Naidu, S. M. Singh & R. Vishnoi (2005) Pathogenicity of *Curvularia geniculata* (*C. senegalensis*) for albino rats: study of clinical isolate from blood of a cancer patient. *Journal de Mycologie Médicale*, 15, 97-102.
- Wang, J. & J. Chen (2011) Cloning and functional analysis of Clm1 in *Curvularia lunata*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 41, 464-472.
- Wang, X., R. Zhang, W. Wu, Y. Song, Z. Wan, W. Han & R. Li (2018) Impaired Specific Antifungal Immunity in CARD9-Deficient Patients with Phaeohyphomycosis. *J Invest Dermatol*, 138, 607-617.
- Wang, Y., P. Aisen & A. Casadevall (1995) *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. *Infect Immun*, 63, 3131-6.
- Warnatsch, A., T. D. Tsourouktsoglou, N. Branzk, Q. Wang, S. Reincke, S. Herbst, M. Gutierrez & V. Papayannopoulos (2017) Reactive oxygen species localization programs inflammation to clear microbes of different size. *Immunity*, 46, 421-432.
- Warris, A., M. G. Netea, P. E. Verweij, P. Gaustad, B. J. Kullberg, C. M. Weemaes & T. G. Abrahamsen (2005) Cytokine responses and regulation of interferon-gamma release by human mononuclear cells to *Aspergillus fumigatus* and other filamentous fungi. *Med Mycol*, 43, 613-21.
- Werner, J. L., A. E. Metz, D. Horn, T. R. Schoeb, M. M. Hewitt, L. M. Schwiebert, I. Faro-Trindade, G. D. Brown & C. Steele (2009) Requisite role for the dectin-1 beta-glucan receptor in pulmonary defense against *Aspergillus fumigatus*. *J Immunol*, 182, 4938-46.
- Wever, R. & W. Hemrika. 2001. In *Handbook of Metalloproteins*, eds. A. Messerschmidt, R. Huber, K. Wieghardt & P. T., 1417-1428. Chichester, United Kingdom: John Wiley & Sons Ltd., .
- Wheeler, M. H. & M. A. Klich (1995) The effects of tricyclazole, pyroquilon, phthalide, and related fungicides on the production of conidial wall pigments by penicillium and *Aspergillus* species. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 52, 125-136.

- Whitcomb, M. P., C. D. Jeffries & R. W. Weise (1981) *Curvularia lunata* in experimental phaeohyphomycosis. *Mycopathologia*, 75, 81-8.
- Winkelstein, J. A., M. C. Marino, R. B. Johnston, Jr., J. Boyle, J. Curnutte, J. I. Gallin, H. L. Malech, S. M. Holland, H. Ochs, P. Quie, R. H. Buckley, C. B. Foster, S. J. Chanock & H. Dickler (2000) Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. *Medicine (Baltimore)*, 79, 155-69.
- Winter, J. M. & B. S. Moore (2009) Exploring the chemistry and biology of vanadium-dependent haloperoxidases. *J Biol Chem*, 284, 18577-81.
- Wong, E. H. & S. G. Revankar (2016) Dematiaceous Molds. *Infect Dis Clin North Am*, 30, 165-78.
- Xu, S., J. Chen, L. Liu, X. Wang, X. Huang & Y. Zhai (2007) Proteomics associated with virulence differentiation of *Curvularia lunata* in maize in China. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49, 487-496.
- Yanagihara, M., N. Tachikawa, H. Hanakawa, M. Kawasaki, K. Anzawa, H. Ishizaki, T. Mochizuki, S.-i. Udagawa & Y. Sato (2010) Tiny keratotic brown lesions on the interdigital web between the toes of a healthy man caused by *Curvularia* species infection and a review of cutaneous *Curvularia* infections. *Mycoscience*, 51, 224-233.
- Yang, J., L. Zhang, C. Yu, X. F. Yang & H. Wang (2014) Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res*, 2, 1.
- Yona, S., K. W. Kim, Y. Wolf, A. Mildner, D. Varol, M. Breker, D. Strauss-Ayali, S. Viukov, M. Williams, A. Misharin, D. A. Hume, H. Perlman, B. Malissen, E. Zelzer & S. Jung (2013) Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity*, 38, 79-91.
- Yost, C. C., M. J. Cody, E. S. Harris, N. L. Thornton, A. M. McInturff, M. L. Martinez, N. B. Chandler, C. K. Rodesch, K. H. Albertine, C. A. Petti, A. S. Weyrich & G. A. Zimmerman (2009) Impaired neutrophil extracellular trap (NET) formation: a novel innate immune deficiency of human neonates. *Blood*, 113, 6419-27.
- Young, R. C., J. E. Bennett, C. L. Vogel, P. P. Carbone & V. T. DeVita (1970) Aspergillosis. The spectrum of the disease in 98 patients. *Medicine (Baltimore)*, 49, 147-73.
- Yunis, J. J., H. Band, F. Bonneville & E. J. Yunis (1989) Differential expression of MHC class II antigens in myelomonocytic leukemia cell lines. *Blood*, 73, 931-7.
- Ziegler-Heitbrock, L. (2015) Blood monocytes and their subsets: established features and open questions. *Front Immunol*, 6, 423.
- Ziegler-Heitbrock, L., P. Ancuta, S. Crowe, M. Dalod, V. Grau, D. N. Hart, P. J. Leenen, Y. J. Liu, G. MacPherson, G. J. Randolph, J. Scherberich, J. Schmitz, K. Shortman, S. Sozzani, H. Strobl, M. Zembala, J. M. Austyn & M. B. Lutz (2010) Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, 116, e74-80.

10 Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Vágvölgyi Csabának, a Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar, Mikrobiológiai Tanszék vezetőjének, hogy PhD munkámat a tanszéken végezhettem.

Hálával tartozom témavezetőmnek, Dr. Papp Tamásnak, amiért munkámat mindvégig támogatta, megosztotta velem széleskörű szaktudását. Köszönöm belém vetett bizalmát, a rengeteg segítséget, biztatást.

Köszönet illeti munkatársaimat, Dr. Csernetics Árpádot, Dr. Nyilasi Ildikót, Dr. Csonka Katalint, Dr. Papp Csabát, Zajta Eriket, amiért kérdéseimmel hozzájuk mindig fordulhattam. Köszönöm munkatársaimnak és barátaimnak, Kartali Tündének, Szebenyi Csillának, Bokor Eszternek, Pál Sárának az ötletadó beszélgetéseket, a kísérleteknél nyújtott segítséget, valamint, hogy a legnehezebb pillanatokban is mellettem álltak.

Külön köszönettel tartozom Dr. Boros Évának és Dr. Nagy Istvánnak a THP-1 monociták sejtenyésztésében, az RNS izolálásban és relatív expressziós szint meghatározásban nyújtott nélkülözhetetlen segítségéért, Dr. Varga Mónikának a melanin mérések elvégzéséért, valamint a dolgozat ábráinál nyújtott segítségéért, valamint Petkovits Tamásnak a pásztázó elektronmikroszkópos felvételek készítéséért.

Köszönet illeti Dr. Takó Miklóst és Szabó Katalint a vérvételnél nyújtott segítségükért.

Köszönöm volt szakdolgozómnak, Hoffmann Alexandrának áldozatos munkáját és szorgalmát, amivel nagyban hozzájárult a neutrofil granulocitákkal való interakció vizsgálatánál elért eredményekhez.

Köszönettel tartozom Hargitai Fanninak, Lengyel Boglárkának, Csordás Anitának, Szabó Anikónak az adminisztrációs és hivatalos ügyek intézéséért, Lele Máriának és Deákné Kulcsár Melindának a technikai segítségéért, továbbá minden munkatársamnak a munkám során nyújtott legapróbb segítségéért is.

Köszönöm barátaimnak és páromnak a megértő támogatást és szeretetet.

Végezetül, de nem utolsó sorban hálával és köszönettel tartozom szüleimnek és családomnak, akik egész életem folyamán önzetlenül, feltétel nélkül támogattak, és szeretetükkel mindvégig biztos háttérrel nyújtottak.

A kutatás az LP2016-8/2016, GINOP-2.3.2-15-2016-00035, UNKP-17-3-IV-SZTE-33 és UNKP-18-3-III-SZTE-28 számú projektek támogatásával valósult meg

11 Mellékletek

1. melléklet: A *C. lunata* haloperoxidáz szerű fehérjét kódoló génjeinek szekvenciái. Szürke szín jelöli a promoter és terminális szakaszokat, piros színnel jelölt a kódoló régió, kék szín jelöli a nem transzlálódó régiókat, fekete pedig az intronokat.

HPO1 scaffold_9:696118-697941

```
698141 TGTTCATCTGATAGCGGCGGGTAGACCATTCTTAGGAGTTGAGACTGCTAAAGGCTTTTTTTTGGCCAGAGA 698072
698071 GTGTTTGGATGCTGGTAGCCTTGAAGAGTTGGCTATAAATTCTGTTGGCTTTTCGCGTTTTTCTTCAGAA 698002
698001 TCACAACCTCAATTACTCATTTTACTCTCCACTTACACTCACACATATTATCACACTTACGATGGGGTCCG 697932
697931 TTATACCCATCCCTCTCCCAAAGATCGATGAACCCGAGGAGTATAACACGAACTACATACTCTTCTGGAA 697862
697861 CAATGTGGGTTTTGGAACCTCAACCGCGTAACCTCACACTGTGGGTGGTCCCCTGACGGGCCCTCTCTCTCT 697792
697791 GCCAGAGCTTTGGGCATGCTCCACTTGGCTATTACGACGCTACTTTTCTATCTGCCCTCCGACCGACT 697722
697721 TTACTACCTTCTCTCCCCAGATGCTGAGAATGCCGCTACCGTCTGCCAGCCCCAATGGTGACATGA 697652
697651 CGCTCGCAAGCAGTCGCTGGAGCTGCCCTCAAATGCTGTCTTCACTGTACATGAAGCCTGATTCTAAC 697582
697581 TCCGGCGGTATCATGCGCAATGCTTACGCTCAGCTTGTCTGGTTCATCGACCGATCAGTCTCTGAAAG 697512
697511 CACCTGGTGGTGTAAACGAGAGTCCGCCAGTTTCGTGTTTGGCGAGGCTGTAGCAGATGTCTCTTTGC 697442
697441 ACTCCTTAACGATCCTCGAGGTGCTTCGAGGAGGGATACCACCAACGCCAGGTGCTGCAAAATTTGAC 697372
697371 GATGAGCCTACTCACCTGTCTGCTTAGTCCCGGTTGACCCCAACAACCCCAATGGCCCTAAGAAGCCTT 697302
697301 TCCGCCAGTATCATGCCCCATTCTACGGCAAGACTACGAAGCGTTTTGCGACGCAGACCGAGCACTTCTCT 697232
697231 GGCCGACCCACCGAGTCTTCGTTCTAATGCGGATGAGACTGCCGAGTATGACGACTCTATCCGTGTCGCT 697162
697161 ATCGCCATGGGAGGGGCCAGGGTCTCACTCCACCAAGCGTAGCCCATGGCAGACGGCACAAGGCCCTAT 697092
697091 TCTGGGCTTACGATGGATCAAACCTCGTTGGTACGCCACCTCGCTTTTACAACCAATCGTGCCTGCGAT 697022
697021 TGCAGTCAGGTACAAGAAAGAGAGGACCTTGCCCAACGCGAAGTCAACAACGCAGACTTTGCCCGCCTT 696952
696951 TTCGCGCTCGTCGACGTCGCTTGTACCGACGCTGGTATCTTTTCTGGAAGGAAAAATGGGAGTATGAAT 696882
696881 TCTGGCGCCCACTTTCTGGCGTGCAGATGATGGACGTCAGACACCGAGATCCTTTCTGGCTCACCT 696812
696811 CGGTGCCCCAGCTACAAACCAACGACATCCCTTCAAGCCACCATTCCCAGCCTACCCATCGGGTCAC 696742
696741 GCGACCTTTGGTGGTGCCGTGTTCCAAATGGTACGCCGATACACTACAACGGCCGTGTAGGCACATGGAAG 696672
696671 ACGACGAGCCAGATAACATTGCCATTGACATGGTGATTTCGAGGAGCTAAACGGCCTGAACCGCGACCT 696602
696601 GCGCCAGCCCTACGACCCGACTGCCCGGATCGAAGACCAACCCGGTATCGTCCGCACACGCATCGTAGCG 696532
696531 CACTTTGACTCTGCCTGGGAAATGATGTTTGAAACGCCATTTCCCGCATCTTCTCGGTGTCCATTGGC 696462
696461 GCTTTGATGCCGCTGCCGACGCGACATCCTCATTCCTACGACGACAAAAGATGTCTACGCTATCGATAA 696392
696391 TAATGGCGCTACTGTGTTCCAGAATGTAGAGGATATTAGGTACTCGACTAAAGGAACGCGTGAGGACCGC 696322
696321 GAGGGCCTTTTCCCTATTGGTGGTGTGCCACTGGGTATTGAGATTGCGGATGAGATTTTAATAATGGAC 696252
696251 TTAGGCCTACCCCGCTGAGCTTCAGCCTATGCCGAGGAGACTCCTGTGCAGAAGCCGGTTGGGCAGCA 696182
696181 TCCGGTTTCAAGGTTGTGGCAGGATGAGGAGGACGCTGCCGGTGGTTAAGGAGGCGCGGTAGTGGAG 696112
696111 TGCTGGGCGAGTATATGGTATAGAAAGTCGGCATGGGTGAGACATGTCGGACTTGGGTGTAATGTGGAGA 696042
696041 TCTGGTTTGATTTATGCGCGCCTGATTACGGCTGCTTGGTTGATACTCTGCGATTAACTCTTATTTTA 695972
695971 ATATGAGATAGAATACTTGTATATCTAGAATGTGCTGGTTCACCCATCTTACTG 695918
```

HPO2 scaffold_11:955923-957072

```
955723 TCTAGGGCAGGGAAGAAAGGGGCTTTATGAATTACGCACTTGGCTCAAGGGTTGGTTCTACCAGACAGT 955792
955793 TCACGTGAAATGGCAATAGACAAGACGTTGTCTCTCACATTCCAATGCAACACCCGAGTGAACCCCTACC 955862
955863 ACATTGTTCTCTCCCCCTCACTCCACCCCAAAACCTACTCGGAAAACCTACGAGCCCACTATGCTCGTCC 955932
955933 TACCAAGCTCATCCCCGGTAAGCATCATTTGGCTCATGCCAGGCTACTACAACAGACCCCTCAGCGCGCCA 956002
956003 AGTCTTCAACGACAACCTGGTTAAATCTACTACAACATTGATCTGCTTTATAACAGCGGTTGTTCTCTGG 956072
956073 AAGTTGTGTCCACCAGCAGTCACTCACTATTTCCCATATTTTCGAGGGCGTCGAGAAGACTTCTGCGGGCC 956142
956143 TCAAGTATGCTCAGCCGCTACGACGAGTACCTTGACACGGTCAAGACGGCCGCTATATCGTTCTGCAT 956212
956213 TCCAGCCGGTGTGATGGTTGGTATGAATCTGTGGGTGCTGAGAGACTACTACAATGCCAGTGTCTGTG 956282
956283 AGTTCTTTGAGACCTGCCTTTCCCCCTCCTCTTCTACCTCCTCCCCCTCAATACTACCCCTGAAGTA 956352
956353 GAAAACAAAGGGAAGCTACATCACAACCTGACATACAATGAACCCCTCAAACAGCTCACAGGCCTCAGCT 956422
956423 ACGCACTCTCCACCTCGGCCCTCCTCGCTGTCTTCTGAAAATCTTCGTCGGCGGCCTCCGACCAACTT 956492
956493 CTACGAGATATGACAGACGACATACCTGGCTGCATCATCTACATCTGATACTGAAACCACTTACTCTCAC 956562
956563 TCCTATTACACCACCGCCGACGAAACGTGCACCAACACGCACAAACCTCACTCCACGACTCGCAATGA 956632
956633 GTTTTCCCTCTGGCCACGCCTCCTCCGATTCCCGGGTTCGTCTTCTCACGCTCTGGCTCAGCGCACA 956702
956703 CTTCAAGACATTTGGGCGCTCTCAAGATGATACGCCGCCACCTTTACTTACCGCCAGTATAGACGCTGAG 956772
956773 CCAGAAGACGGCCGCCAGTCTCGTTGGAATTACTCGTGCAGCCATCGTTTGGCGCAGTGCCCCACTGGA 956842
956843 AACTGCTGCTTTCCGCAACTCCGCTGTGCACGGCGGTCACTAGCGCTGTCTAAGATCAGAGACGGGTG 956912
956913 GCATCATCTGTTGATGTCGTGTGGTGGCGGCGATTGGTACCGTCTTTGCGTGTATGGCGTACAAGATG 956982
956983 AACTTTTGGAGTGTATGGGATGTAAGGGATAATCATGTGCCGAGGAGAAAGGTGCATGATTGAGGGCGG 957052
957053 GAAGGAGCGGGGTTCTGTGAAGGGATGTGGTAGTGTGTTGTTGCGTGAAGTAGATTGAGATTTCGATGT 957122
957123 CTTGGAAAGCTTTGGGTTTACGTTCTTAGACAGTGTGTTGGTAATGGTGTGGTGGGTATGTAGGGATGAGA 957192
957193 TATTACAGCTTGGGCCAGAGAAACGCCCTTTCATCAGCACTGATGTGGACTTGAGCATTGGGAAACT 957262
957263 CGGCATCCAC 957272
```

HPO3 scaffold_7:527903-529818

527703 GTGAGCGTCGCATGTCTGACTCCGTCGTCTGCGGGCTCCCCGAAATCACTCCGCTGCCGCTGACCGCGC 527772
527773 CCTCACCGCCCGCCTGTGCTCCCCCTCGTGTGCCAAGGAGAGCACTGCAACTGCCATTGTGGTTGC 527842
527843 GACCAACACAAAAGTTTCATCCATTGTCTGTCGGCGGCCGTTTTGGGCCCTGTAGTGCGCCATGGACGAGT 527912
527913 GGACGTCCTAAGCAGCTCCCTGAGCGCCTGCCCTTCTCCAAGAAGCGCCTCTCCAAGAAGGTCATCTTCTC 527982
527983 GTGCGTAGAGTCGTCTCGCCACAGCGCAGTAGATGCTGACCAGCGCAGATATATCGGTGACTATCTGAT 528052
528053 CATCATGTAAGACCACGCCGTCCGGCGCACACGACCTCCTTCTGGCTTGATTGCAAGGCTGACCACCT 528122
528123 CCCAGCGTCTTGATGCTCACCTTTGCCATTGTGCGACAAGATTCGGCCCTTCCACCAACACTTTTCGCTCG 528192
528193 ACAACTACACCCTACACTATCCCTTTGCTACCCGTGAGCGCGTACCGTCATATGGCTCTGCGTTTATGT 528262
528263 CGTCTCGCGCTGCCGTCAATTATTGCTATATACCAATGGTAATCGACGGCCTCTTCTCACACCAAAAC 528332
528333 GCCATGCTGCCAATAGGACCGGCTCAAGCGTCTCTCGGGGAGATACAGGTTCAAGGATAGGCTGTGGG 528402
528403 AGCTCAACTGCGGTATACTCGGGTTGGGCTGAGCATTGGTGTGCTCTTACAATACCGGGGCTTTGAA 528472
528473 GAATGCTATTGGAAGCCGCGGCCGATCTCATCGACCGCAAGTCAGTCTTTGGCGCGGAGGAGAGCTT 528542
528543 TGACTAACATCCACAGCTGTGAGGTGGACCGGCCAAGATCAACCACAACGCTACGCCCTTCAGACTA 528612
528613 TTGACATTGTGACGCAAAACGAACAATTACATTCTGAGGATGGCTTCAAGAGCTTTCCCTCTGGACATAG 528682
528683 CAGCGGTATGACGTACAGACTCTTTCATGTCGCCACCTGACTGACATCCCAAAGTTTCTTTTGTGGTCT 528752
528753 GTTTTACCTTTCCATTTACCTCGCAGGAAAACCTCCACGCTCGGACGCCAAGGTTGAAGTCTGGAGGACA 528822
528823 TTTATTGTCATGGTCCCTGCGCTCGGTGCTGCGCTCATACCGGAACCCGTATCATGGATGCCCGTCATC 528892
528893 ACCCATTCGATGTCATTTCCGGTGCCTGCTTGGCATGTTGTAGCATGGGGCTCGTACCGCCAACTT 528962
528963 TCCTCTGTTTCCGAGACCTGGCGCAAGGACGCGCATATCCATTTCGCGCTTGGGGCAAAGCCTCGCGC 529032
529033 GCGCGCCTCATGGTGCCTGCTTGCCGAAGATGACATCCGACAGCTACAAGAAATCAACAAACAGTAG 529102
529103 ATGAGGAGCGCGGGAAGCTTCGGGTTATTCTGCCGCGCTACGGTCCCTGCAGACGGTGAATTTGAAA 529172
529173 CAATGTGTTCCGCCAACAATCCATAACTCTCAGCGGAGGCGCAAGAGTCCGGATCTCACTATGGCGTG 529242
529243 GGCCGAAGTGACACAGGCGCTTCGAGCAACTACCGCACCGAGACCATGAATTCAGGCATCTCCTCGAAG 529312
529313 TCACAGATATACTAATCAGCTGCCATCCACCAATCCTTTCGCGCTGATGTCGCACGCCAACGCCAAT 529382
529383 GGATACCTATGATTATTCATCCTCGGAAGACGACGGCAACTACGAGCTCAACCCAGGGCGGGCGTTTAC 529452
529453 AACCCAGTGTCTGGCACACTCACGGATACAGGATACCACTCCACCCACGGGTATCTCCCAAGTTCTACAC 529522
529523 CACCTCCTCAGGCAAACACCATTTCTACATAACAGGCGACGACCATGTCTCCGACAGGCGACCTTTCTGA 529592
529593 TCGAAGAGAAGTTCCACCCATGCCTCCTCCACATGGTGGGAGCAACTTGTCTCAGCAATATGAAGTCGG 529662
529663 TTCAGGTGTACGATCATGTGTGAGTGACGTTGTTTTTGGTGGGAAGCAAGTGCATTTCTGGAAAATAC 529732
529733 CCGATCTGTTTACTCTCGCAGATTTTGGTGTGTGCCGATGAGCGTATGAGAAGCCATTACGGTTAAGC 529802
529803 GAGCCTCATGTATCACGCCCTTGCCAGGAGCAAGGAGTTGAGTGGAATTGGGAATATGACAGGAACCA 529872
529873 GATTTTTCTTTAGAGAAAGGAAATCAACACCGTGCCATGGAATTTGGCACATAACTGAATCGAATTTAC 529942
529943 CTGTAATCTTCACTTGACGTCTATGTATCCACGTGTGGTGATAAATCCCTAGATTGGCATATCAGTGTG 530012
530013 CCTGCG 530018

HPO4 scaffold_10:741379-743059

741179 AATGGGCATGTGGAGCCAGGGCCAGCACCGCGCCAGGGCTGCAAAACGAGATTGCAGCCTGCATGTGCC 741248
741249 CTCGGCCTAGTCCCGCCTCAGTTAGCCGCTCAGTCTCGCGCCCTCAGCCATCCGAAGCTTCTTCCCTTA 741318
741319 CAGCGCCTCGTCTTTTCAATCCCTAGTCCGCTCTTCCGTCTGTCTGCTCGCCCGCCCTCACCTG 741388
741389 CTCGCCCCGACTCTCTTCAAAACAAAAGTAGTCCCAACAGAGGCCGACGCAACGCCCCCACCCTCGT 741458
741459 GGTGTGCTGTGCTGTGTGCTGTAGCTGTGGTGTGTGACTTGTCTTCTTCTGCTGCTGCTGCTTAC 741528
741529 TCCCGACCGCGCCTCCGGTGCCTGCTCCCGTCGCGGTTCCCCACGCGACCCCATATATATTAC 741598
741599 ATGACCAACAAGAGCTATCTCGCCTTCTCGTACGACCAACGCGCCTCGGACATGCTCTCGCGCTCTCGG 741668
741669 TGCCAGGCTCTCGGCCCTGCCAGCCTGATCCCCACCGCGTCCGCAGAAAGTGAGGGGCCACCCGCTC 741738
741739 GCGCATACGTGGGCGCCAGTGCACCACTCGTCCATTGCTCGCTCGAGACGCTCTTCTCGCCCTCGGAT 741808
741809 ACCCTGCGCTCCCTGCGCTCCCACTCGTGGTCCATATACGACGCCAGTACCTCTTTCTCGCCATTGTG 741878
741879 CCATCTTCTCCCTGTCCGTACGCGAGTCTCTGGGCCATTTGCAAAAGACATTTATTGCAACCTGTCTT 741948
741949 GACGGGCTTGTGCTGCTTATTACCCGCCAATTTCTGTCTCCATTGCTTCCAACCTTTACCTGGCTATTC 742018
742019 CTTTCTCGAGCTGCAAGTACGTAATCTGCGCTATGTCTGTCCATGAAGTAAAAAATACTAACAATTC 742088
742089 CGCCAGATACATCTCCCCAGAATACCGACCTGCTATCTGGGTCGCGCTCTCCCCGCTCTCGAGAATTC 742158
742159 CTTTATGGCTCAACCTGAGCAACATTTCTCCGCCAACAAGCACACAGTCTCGATATCTTGTCTGGC 742228
742229 TGCCCTACGGAGTGGTCCACTATGTATCGCCGTCATTGTTAGCGGATGCATGTTTCTGTTGGGCCCTCC 742298
742299 GGGAAACCTCCCATCTGGGCTCGCGCCTTTGGCTACATGAACATCACCGCGCTCCTGATCCAGATTGTT 742368
742369 TTCCCTGCTCCCCGCCATGGTACGAGAACACATACGAGTGGCGCCCGCTACCTACAGCGTCAAGGGAG 742438
742439 ACCTGCGAGGACTCAAGGCCATTGACGCCCTCACCGGATCGATATCTACACATCTGCTTCTTGGGCTC 742508
742509 ACCCATGGTTTTTGGTGTCTTCCCTTCCCTGCATTCGGATGGGCTACTCTGGAGACGCTCTTTCATGGGC 742578
742579 CATGTTTTCCCTAGGCTCTTCCCTGTATATGTATTCTACACCATGTGGCTTTGGTGGTCTACCATGTACT 742648
742649 TTTCTCACCACTACGCGCTGACCTGGTGTGGCAGTCTCCGTAAGTTACTCAACTTCCCATTTCCACC 742718
742719 AATGTCGTGGCTAACCATGTCTCAGTCCGTGGTGTCTGTCTTCTTCGGCCGTGCCAATCTTCTGGCC 742788
742789 GCCCTCAACCCGACAAGGAGTTCGATGGGACTACGACTATGTGAGATTGGTGACCCCGCAGATGGTGC 742858
742859 TGGCTTCAGCATGCTCGACATCTACGACGAGTTCCCATCCACTCCGACTCTGAAGACTGGGCCAGTGGT 742928
742929 TCCTCTTATCTTACTCTACCGGCGGCCGAAGCCCAATTGGCGCCCGTTCCGCAACTGACGACAACCCAGA 742998
742999 GCCTCTGGGACGAGACACAGTCGGATCTGATACCGACACACCCTCCGCAAGACTAGACGGACGCTC 743068
743069 ACCTACATCTCTCACTCTCCAAACTTACACCCATCTCCAAATTTCGCACATCACCTAATCACCCCTCCAGG 743138

743139 TGACGGCCTTTTACGACCTATGCATTGGATCGGAGTTTTTTTCTTGTTTGCGAAGCATTTCAGCGTTCCA 743208
 743209 TGGACATACACATGGGCATAACGGCATAGAAATCGCGCGCTCTACC GA 743259

HPO5 scaffold_23:159813-161445

159613 GCTGAACCACCGAAACAGCACAATCTCTGTGCAAAGCCGGTTTTCTGCTTCGACCCGACACCATGGGATT 159682
 159683 GTCTGTGCCACGGGGATGATGTCCGAATGACGACGTCTACTACAAACCTTTCAAACGCTGAGGGGTGTTTG 159752
 159753 CTGGAGTATAAGGGACACACCGCGTGTGTTTGTACTTGTCTCTGTCCAGCAACACTCTCAATCCTCTCTT 159822
 159823 TCCTCCACTCTAGATACTTGCTGGCTCCCCGAGCTGACTGGGTGCCCATACGTCATTACAGTTCGGTA 159892
 159893 TACTTGCCTCGTCTGACAACCAGAACCACACCATCGTCATGGGCTTCTTCAACAAGCGCAACACGACGC 159962
 159963 CCGTCGCTGCAGACACTGCTGCTGCAACCGGCACTCAGGGGAAAAGAGACCAAGGCGCCACTCCAAATC 160032
 160033 TCACCCGTCGTCGTACAAACACGAGCCAGCTTTGGACAATGGCTCAAGGCAACTTGGCTCGACATTGTG 160102
 160103 ACCATGGCCGCTATGGGCGCCGTCGGTCTCGGTGTATACATGGCTGACCCAGCCCCAGCCGAGCTTTC 160172
 160173 CAGTCATCTTCCAGGATGGCGAGATTGTCTATCCCGAGTTCGCCCTACCCCTGCGCAACGAAATCGTCCC 160242
 160243 CATCTGGGCTGCCGCCCTCATGGCCTTTTTCATTCCCTTTTGCCGCTCTTCTCATTTGTTAGATCCGCGC 160312
 160313 CGCAGCTTCTGGGACATCAACAACGCCACCATTGGCCTACTCTACTCCCTCATCACCGCTGCTGTATTCC 160382
 160383 AAGTCTTCATCAAGTGGCTCATTGGTGGACTTCGCCCTCACTTCTCGCCGCTGCAAGCCTGTCATCC 160452
 160453 CGCCGACATTCTCGCCAGCGTTGGCAATTAGACAACGGCGTCGAGGCAGGCAGCGCCTATGGCAACGTT 160522
 160523 GCCAATGGTTACAGACAAATCATGTTTTCAGAGGAGCATCTGCACCGGTGATCGCAACGAGATCAACGACA 160592
 160593 GTCTTGAGTCCATGCCGTCCGGCCACTACTGCTGCTTTTGGCGGCTTCGTCTTCTCTACCTGTACCT 160662
 160663 CAACGCAAGCTCAAGGTCTTTTGCAAACTACCCGCCAATGTGGAAGATCATTGCATTGTAGCTCTCT 160732
 160733 ATTCTCGGTGCTGTTTGGATTGGCGGTGCCCTCACCATTGACGAATACCACAACCTGGGTATGTACTGTTT 160802
 160803 TACTTTATCAGAAATACATGATACTAATCATCAGAAATCAGTACGACATCCTCGCTGGCGCAGTGATTGGT 160872
 160873 ACCATGATGGCATTACGCGCTACCGCATGACATACGCTCCATCTGGGACTTCCGCTTCAACCACATCC 160942
 160943 CTCTTTACGCCCACTCCATTTATCTACGGCGCGGCCCTAGCTCATTGACGGCTTCCACGACGTGCT 161012
 161013 CTTTACCCGCAAGGCTGGCTGGGCAACCATGAGGGAGGTAGCTGGGGTGGCGCGCTTTTGATGCTGCT 161082
 161083 GATGGCCCCAGGGGCTCCATGATGCCACAGGCAGAGGGCCCTGCTGGTTCCACGCTGTCTAGGAAGCCTG 161152
 161153 TTGGAACCTGGTTCAGGGGAGAGCAGATGGTTTAGAGGCTGAAATCATTTCACCTGAGTGAAGAATGGA 161222
 161223 GGGAGCGAGAGTGTGATTTCAGAGGCTCAGTGGCTTTTTCCTGCTGCTGGTACTACCATGGGAT 161292
 161293 TGGCTTTACGTTTTCCTAATACCGAGATTTTATACCCGTGTATACCTAATTTGTATCATTAATGACG 161362
 161363 GCGACGATACCAACGGGCGTTTTTTTTACTTTTTCTCTGTGATAATTAGCTGAACGGATAATATCACTTT 161432
 161433 GATGTTCTACTACAAATCCAGCCATGATAGTCGAAGGCCCTGGCCATTCTGTGTGATTTAAAGCGTAGATGA 161502
 161503 GAATCTATFCCAACGATACACTAATCCTTAGTAACCCCTTCTCTGAGTCGATTGTTGGAATACCAAGCGTGA 161572
 161573 ACTAGAATCAATTTATTTCCAGCTGGAATTAATAATCACACGTACTTAACCTCTAGTTTACCGCACAG 161642
 161643 ATG 161645

HPO6 scaffold_2:197552-199940

200140 GCGATCAGTGGGAATTCTGTTTTAGTGTTACCATCATAAATTCAGAGTATGCCTGTGGCTGTTGTTTCC 200071
 200070 TACGCTTCTTCTAGTACCGTTCACTGAAACAACAGAATTACACATCCAGGACTGAAGTTTACTAAGGCGA 200001
 200000 ATGCACATGTAGCTTCGGAAGGTGGAGCCGTAGCACCTAAATATAACCACGATACTACATATGGCATTCT 199931
 199930 TCGTGTCTATAGATATCTAGATCAGAATATCAATATGGAAAAGTATACTGAGCTCTCTGCAATGCACT 199861
 199860 CTTCAATGTCAATGGCATCGTCGCGCTCATCGGGCGCGGATCAGGTAGTCTACTCGGGATCGACAAG 199791
 199790 GCCGAATCTGGCACTGAAACTCACAGGTATCGGACTGATGATGACCAAGCGCTGGCTGCAAAATGGTGCG 199721
 199720 CACCGCATCTACATCATCGGCCGTAGAGAGGATGTCTTACTTGAAGCGGCCGCCAGCATCGACCCAAAAG 199651
 199650 TCGTTATTTCTCTACCAGGAGACATAACCTCTCAAGACACACTGCTTGACATGGCAGCAAAAGTTGAAT 199581
 199580 GGAACAGGCTACGTCAATCTCGTCAATGCAACGCGCGCATATGGGCCAAGACCACTCAAGCGGCC 199511
 199510 CCGGGTAGTCCCATAACCTCAATCAGCGAGTACCGAGCACACGCCCTACAGACACCCATGCATGATTTC 199441
 199440 CGCAAACTTACGCTGTAATGCGACAGGCGTTTACTACACAGCTCTAGCTTTCTCAACCTCCTCGATGC 199371
 199370 TGGCAACACCAAGGCAACCTGGGAGCCGACATGCGCTCCCAAATCATTGCTACCTCCAGCATCGGCGGC 199301
 199300 TTCTCGCGCTCGCAGGCGCCTCATTGTCATACAACAGCAGCAAAAGCGCAGTCACGCACATGATGAAGA 199231
 199230 TGATGGCTACATCGTTTCGCTCCATATCGCATCCGCTGCAACGTGCTGGCCCCAGGCATCTTTCGCTCTGA 199161
 199160 CATCACGACTGGCATCATCGGGAACCTTGGATCCGGGGCAGAGCGGTAGCGTGAGCAAGGAGGTGATACCA 199091
 199090 GCGGAGAGGACAGGCAATGAGAGAGATCTTCCGGGGCGGTGCTATGGATGGCGGGGTTGGCGGGGGCGT 199021
 199020 ATCTGAATGGAAGTGTGATTGTGGTGGATGGAGGGAGATTGAGTATGCTACCGTCGACGTATTGACAATC 198951
 198950 TTCTGTGCGGTTTTTACCAGCCATCGCTATTGAGTCAATAGCAATCGGAGGACAGATTACAAAGAGTAAA 198881
 198880 TATATACATTGTAGTCTTAGAATAGGTATGACAACCTAGACTAGTAGTCCATTACAGACGCATGCCATGA 198811
 198810 CGCAGCATTCGCGCGCTAGCGGCAGCGGCCGTGCCATGCCTGCCGTGCGGAGTTGAAGCCACACCTCC 198741
 198740 GAAAGAAACAAAGTCTACCACGACGACTACTCGCTCCAGATTGTTCCATTTTACTAATGATGCGCGCAT 198671
 198670 GACCTGTCTAACAATAAATATGCCTGTACAAACAAACAGGCTCAGCTCTAATGAGCTCATCCATTCCC 198601
 198600 CGGGGTTTTCTTGGTGCACTAGCAGCTTCTGGCAGGTGTGTGAGTCTTGCCGACATGCTGGGCGCGTTT 198531
 198530 CGAATAGCTAATGGGGACTCTTGGGGTACAAGTAGCGCTCGTATGCTTCAGATTATATTGGAATAGCGAT 198461
 198460 GCTAGTATGCGGATATATAGGGGTATGTGAACCTACAAAGGCCAAAAGGCTAGGAATCTTGGGGACAGACG 198391
 198390 CACACTTACACCATGAACAGATACAATTCTTCGCCGAACCTTCCATCGCATGTTTTTCTGGATAACCT 198321
 198320 CGCGATCACTACCCCCACGCCGAGATCGAGCGCGTATCGGTAACTGGCTGTTTATCTACGCGGCAGCC 198251
 198250 GTGCCATTGGGTATACTTGTGTATGGGCTCTTGCAATTCGCCCCAGGAACACAAAGCGCACGTCACCTA 198181
 198180 TTCTCGGGCTGGTAATCAGTCTGATTTCAACAGCTTCATCACCAGTGTGATCAAGAACGCCCTCGGCAG 198111
 198110 ACCCCGACCCGACCTCATTGCGCGATGCAAAACCCGACCTGGCACCCCGGCCACCAGCTCGTCACGTAC 198041

198040 GAAATCTGTACTGAAACAGATCATCATACCTTGCACGATGGATGGCGCAGTTTCCACGCGGTTCATAGCA 197971
 197970 GTTTCGCCCTTCGGCGGACTGGGTACCTTTCCCTCTTCATTGCAGGCCAATGCCACGTTTATCGTCCCCG 197901
 197900 TGCCGACCTCGCTCGCGTCTGTTGGCTCTTATACCTTGTCTCGGCGCCGCGCTCATCGCCATTTCCGC 197831
 197830 TCGGAAGACTACAGACACGATGTCTACGACGTTACTGTGCGGTGCTTATCGGAATGACAATTGCGCATT 197761
 197760 ATACATACAGGAGGTATTATCCTGCTCTCAGGCACAGGCTGTGTGCTACGCCGTTTCCTAATCCTGCGGA 197691
 197690 TGACAAGGGATGGGGGAAGGTCAAAGGGGATGAGGAAAGTTTGAAGATGTGCAGGAGTTGAGTTGAGT 197621
 197620 GAGTTTGAAGAGGAGGAGAGGGAAGCGGTGAGGGGAGGCCGTTGAATGGAGGAGGAGACAGCATTGAG 197551
 197550 GAGTACAGTGGTGATATTTCGTGCTTTATGATTTTGATTCAAAGTGTTTTTGTAAACGCGTATAATCATGGC 197481
 197480 TTTTCTCGTGTGTGTCGTTGGTTTGATGTCTGCAAAGACGTCCTATGAGGTATGTAGATGGGCAGAGAC 197411
 197410 CTATGGCTTGTGTCATGAGGCACTGCCTGTTTCTTTAGTCCACGTAGAGGACTTAAAT 197352

HPO7 scaffold_14:381359-382662

382862 CAACGCTCGTCTCCAAAGACTCGCCGCACAGCGCTTGATACACGTGCCAAGGTCAATTGCGTCTAAGCCC 382793
 382792 CCGTCTATGCGCCCGTCACTTTGATCCGTCCCGGACGTTGGCGTGCTCGTGCCAGCTGCTCGACTGAACA 382723
 382722 TTTACCTCGCCTTGCCCTCCGCTCGCTGCTGGCAGCCCGCTTCTTTCACCGCGGCAAAACATGCGATCGT 382653
 382652 TCAAGACCATGAGTCGGCCGTCGTCGCGCTCATTTGCCCTCTATATCTTTGACTGGATCGTCATCATCGC 382583
 382582 CATTGCTGCCGTCGCCGCGGCTGGGAATTCTCGAGCCCTTCCGCCGACCCTTCTCTCCCGTCGATCTC 382513
 382512 AACATCTCCTACCCGCATCAGTTCAACGAAAAGATCCCCACATGGCTGCTTGTGCTCGTCTCGCTTGTCA 382443
 382442 TCCCTGCCGCATCATCTGGTCGTCTGTCTTTGTCTTTGTCCCGGTCCAACCGCTGAGCGTGGAAACGCC 382373
 382372 AAAGTCGCTCATTTGGAGGAGGAAGCTCTGGGAGTGGAACACGGGATGGATGGGCTGCTCTCTCCCTT 382303
 382302 GCCACGGCCTTTTGTATACCCAGGGTATGAAGAACTTGTTTGAAAACCGAGACCGGATCTGCTGTCTGA 382233
 382232 GATGCAAGCCCGACCTCGATCGCATTGCCGAATTCGCCATCAATCCCATTGTGCGAGACATCTTTGACCC 382163
 382162 GGCTGGGTGCTCGTTACTTCGGGTATCTGTACCCAGCCGACAACGATCTCCTGAAGGACGGCTTCAAG 382093
 382092 TCGTTACCCAGCGACACTCTAGCTGTAAGCCATCTCGTCTTCCCTTTCTTTTCGTACCCGTTCACTAAC 382023
 382022 CAGTACTCTGCAGTCTCATGGCCGGCCTGCTCTACCTCACCTCTTCTCGCTCCAAATTTCTCCGTT 381953
 381952 GCAATCCCTTCTCCCGCACCGCCCTTCTCTACGAACCCGGCTACACCTCGGCTGTGGCTCCTTCCA 381883
 381882 ATCTGAAGAGACAAGCCACCCTCCCCATGCACAAGCAAGACACCTCCCTCTCTCCCGAACTCGTACGC 381813
 381812 CGATGATGCCGTAGTCCCATCCGCTACCAAAACGCCGACACCCGCTACACGCTCGTCTCATCCCTC 381743
 381742 GTCCCATCTGCGCCGAATCTACATTACTAGCACCCGCTACACCGACTTCCGCCACTTTGGCTTCGACA 381673
 381672 TGCTCTTCGGCTCCCTCATTTGGCATCACCTGCGCCTGGTTCTCCTTCCGCTGGTACCACCTGCCCATCAC 381603
 381602 GCGGGGTGCAAGCTGGGCTGGGGTCCCGCAGCTACCAGCGCGCCTGGGGCATTTGGCGTCGGCCGCGGC 381533
 381532 TCGTACGTCGCGCACAGAGGATGGAGCAAGGCCAGGAAACGCAACGATACACGCTGCTGTGCAATCGG 381463
 381462 TCGACGAAAGCGAATTGGCGCTCTTGAATGCAATGGTGTGCCGATGCGGGGAATCCCCCTAGTTCTAG 381393
 381392 ACAGTCGAGGACAGCAGGCTCGCACGATGTTTAGAATATGCAATGCAAAATACCTAGTTGAAACCTGCCA 381323
 381322 TCCTGAATAGTTATTATATACAAGAGAAAAAGAGGCTCGCTACGTTCCGCGAGGTGAAATGGCAAAA 381253
 381252 CAGAACCAGATTTTATATACGAGACGACTTACATGATGAATTGTAATTAGATATCCCTGTCCAATGCAC 381183
 381182 CTTTTTTATTTATTTCTTGATTAT 381159

HPO8 scaffold_3:1031353-1032149

1031153 AAAGAACCCTTGAAGAGGCCCATTTGTGAAGAGTCAGAGTGACAGTATGCTAGAATCAGCAAAGTGATGCC 1031222
 1031223 CTTCCCGGCACTATTCCAGACCATGGAGGGGTTGGGGGCGCGCTTGCACGCGCCACGCCAAGGCCGGCA 1031292
 1031293 GGGTCTCGCGCGCTATGCGCCACCATCAACATCATCGTCAATTCACCTTGCAGCTCCAGCATGGACGGCC 1031362
 1031363 CCCCCGTTCGCTTCGCTTTCCCTTACCCATGTGCACTATGTTGGTAGACCCAGATGGCTGTGTGCGGCACA 1031432
 1031433 GTGCTGACATGCTTAGAACCCAGCAGACCGCTCTCTTTCTTGTGCGCATGGCTCGCCCTCGTACCGCAG 1031502
 1031503 GCGTTGTGTAGTCTATGCGAGCTGATATGGTCGAACCGGAGATTGAGATCTTCTCATGTTTCGAG 1031572
 1031573 GGCAATGTCTCGGAAGCCCTCAATTGGGTGCTGAAGAGATACATCAAGGAAGAGCGACACGGGGTAT 1031642
 1031643 GCGCAGAGCACTCTAATTTCTACCTTCCAAACAATGTACTGACGGCTACACCTCCAGAGATGCATGGCA 1031712
 1031713 AGGGCTATGGAATGCCTTCGTACATGCACAAATTCGTCTCCTTCTTCTGTCACTCTCACCTCTTCTC 1031782
 1031783 CCTTTTCCGCCAGTCCCGCACCTACCAGTACCCACACCCCTTCTCCTTCGGTGGTCGCTTGTCTC 1031852
 1031853 TCGCTTCTCGCACTAGCCAGCGCCGCTGTAGCCGTCAGTCGATTTATCTGAGCTACCACACCCCGA 1031922
 1031923 AGCAGGTTGCAGTTGGTTGTGGAGCTGGAGCCGTTTTTGCCTGGTATGGTTCTTGTTCACAACATATCT 1031992
 1031993 GCGGAGAGCTGGTTGGATTGAGTGGGCGCTCGAGACATGGCTCTTTAGAGCACTTCGTGTGAGAGATCTC 1032062
 1032063 GTGATACAAGAGGACTTGGTTGATTCTGGGTGGGCAAGATGGGAAGACAGGAGGAAGCGACAGGTGCTTG 1032132
 1032133 TGAATCAAGGCAAGAAGCTGAAGTAACTTTGGTACATACTCGGTCTATTTAACCCTAAGCATAACGCTAT 1032202
 1032203 TGCCAGTAATATTCCGTCACCTGGACGCTGTTATAGGTACATGAGACCGTTTTCAAGAATCTAGACTAGAC 1032272
 1032273 TACCGTACCGACAGCATGCAACAGCCGAAAGATATTTGATTTCATCTTCTGACATTTTGACCAGCAGTG 1032342
 1032343 CTGTTCC 1032349

HPO9 scaffold_9:213955-215764

213755 CAGCTCGGCCCTTCCGAGCCAGCGCTTACCTTAGCCCATGCGCAATACACTGCCAAACACTACTACACAG 213824
 213825 CAGCACAGCAAAACCACCACGACCACTACCCCTTTGCGCGCACGCCCCGCCCCGCGCTGGACA 213894
 213895 TGCACAGTCGACTGAACCGCCTTCGTCTCCGCTGCAACTGTTGCGACCTCGCCGCGGCCATGCAACCGC 213964
 213965 CGCAACATCAACATGAGGCGGGGCCAGCCGACTCGACGGCTCCGTTGAAACCAAGTTGGACGCAGG 214034

214035 CAATCAGGGCCACGATCACTATGCCCAGCGGCTGCCCAAATGGCGCAATTTCGCTGCGAAATCGCCTCATT 214104
214105 CCCATTGTGCGCTGGGAGACGCCGTGGCTGGCGCTGCTGCAGGACAAGCTGCGCTCGCCCTTCCTCGACT 214174
214175 CGTACTTTGGCTTACACTGCCAACCCTCGGCACCCACACCTTCTTCATGGTCTTCTGCCCATCCAGTTCTG 214244
214245 GTGCGGCTACACCAGCGTAGGCCGAGCGTACGTCGCGCGCTGTTGTCCTTGGCCGTACTGCCATGTCTGA 214314
214315 CGTGCACAGGACTGTCTTCATGCTCGCCGCCGCGCTCTACTTCACCGGCTTCTTGAAGGACCTACTCTGC 214384
214385 TTACCGAGGCGCTATCGCCGCTCTTGCTCGCATCTCCATGTCTGGTTCCGCTGCGCTTGAATACGGAT 214454
214455 TCCCTCGTCTCATTTCGGCCAATGCCGTCTCCGTAGCCTTCTACGCCATTTACATGTTGCGCCAGTCTGC 214524
214525 CCAAGAGGGCAGCACTAACCTAAACATGGGCCCTCCAGGCGCTCTTTTACTTTTATGCACTGTCCATCATC 214594
214595 GCCGGCCGCTTGTACTGCGGCATGCACGGTTTCTCGACGTCATAGTGGGCAGTGTATGGGCGCGCTCA 214664
214665 TCACGGCATTCCAACTCGTATATGGCGACTGGATGGACTCGTGGGTCTTTAGCGGCAATTCCCTGCATAT 214734
214735 CTTTATCGTACCCTGGTAATCTGTGTTCTTGTCGCGCTCCATCCGAGCCTGCCGATGACTGTCCTTGC 214804
214805 TACGACGATAGCGTGTCTGCTGGTGTCTCATAGGCATTAACCTTGGTGCCTGGCACTATGCCCCAA 214874
214875 CCGGCTACGCCCTGCAAGATGCATATCCGTCTTCGGTCCCTTCAGCTTGGAAAGAGATGGGATGGTTGAA 214944
214945 AGCAATGATTCTGTATCGTCTTGGGTGTCTGTGTCATCTTCGTCTGGAGAGCGACCATGAAGCCTGCTCTG 215014
215015 TTCACCGTACTGCCTCCCATCTTCCGTTTGGCTTGAGCAAGCTCGTTGGAATATGCCCGTGCCTTCTCT 215084
215085 TGAACGCTTCCAAGTACAGCTCCATTAACCGTTTCGCAGATGACGATAATGTATTCCACCTGCTTCGGA 215154
215155 GCTGCCGATATGCTGAAGAACCTCGCACACCCACGTAAGCGGTCCGTCTCGGTTGGTCCACAATCTGCT 215224
215225 GCAGATGCATATGAGACGCTCGCATACCGCAACCGTCGGCGACGAGAAAGCGTCAACTCGTTGGATGGCG 215294
215295 CTCTTCCAGAGAACTCCACCTGGGTCCCTAGTTCAACACCTCTACACACGCCCAAAGTGGAGAAATCGGA 215364
215365 CCCGCTGCTTGGTGCCGCGCTCCTGCCAACCAATGGCGTCTCGAGTACATTCTGTATGAACAGATGATG 215434
215435 GGCAGTGGTAAAGTGCAACTGCCCGAGAGAGCACAATGACGCCCCAGAGAGCGACAGACGTTGCAG 215504
215505 GCAATGTCTATGAAGTCACGCAGGAGCCGACCGAAGAGGAGAACGAGAGCGCGAGATTTTCATGAAGCT 215574
215575 GACGACGCCACGAGTACGATACGACGTTGAGGTTGTAACAAAGTTAATCGTTTACGCTGGTATGTCAATC 215644
215645 ATGTCAAGCACAAATAGCCCAAACGGACTGCTAATCTACATTAGGTATTGCATACATAGCGGTTGCAGGAA 215714
215715 ACCCTATTTTGTTCGAGTTCCTGGGATTAGGCATGGGCATCGAGGCATAGTTTACCTGGCTCTCATATTT 215784
215785 CGTTTTGTCTTTGTACATATACCAGTATTAGTTTATTGCTCCTAGATGGGATGCACCTAATAAAGTATT 215854
215855 CTTCTTCCAGTGCATGAGGTTCAAGATGCTCGCGGAACCTTGCACCAACATCCACCAACGAATCATGG 215924
215925 TAAGAATTGAAAATTTAAAAGAAAAAAGAAAAAAGG 215964