

XXXI. OTDK Biológia szekció

A Candida parapsilosis sensu lato csoport által kiváltott immunválasz vizsgálata

Csonka Katalin
Biológus Msc II. évfolyam

Szegedi Tudományegyetem

Témavezető: Dr. Gácsér Attila

1. TARTALOMJEGYZÉK

1. TARTALOMJEGYZÉK.....	2
2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
3. BEVEZETÉS	6
3.1. A Candida genus és Candida parapsilosis jelentősége	6
3.1.2. A C. parapsilosis sensu lato csoport felosztása	7
3.1.3. A C. parapsilosis sensu lato csoport evolúciója	8
3.1.4. A C. parapsilosis sensu lato csoport eltérő virulencia képessége	8
3.2. A Candida fajok által kiváltott természetes immunválasz	9
3.2.1. A mintázat felismerő receptorok (Pattern Recognition Receptors (PRRs))	10
3.2.2. A C. albicans indukált természetes immunrendszer és felismerés	11
3.2.3. A természetes immunrendszer effektor sejtjei és a C. albicans interakció.....	12
3.2.4. Citokinek és funkcióik	12
4. CÉLKITŰZÉSEK	15
4.15. Polimorfonukleáris sejtek ölési hatékonyságának meghatározása.....	13
4.6. Mononukleáris sejtek (PBMC) izolálása humán perifériás vérből	13
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	16
5.1. Felhasznált gombatörzsek	16
5.2. Oldatok és táptalajok.....	16
5.3. Candida törzsek tenyésztési körülményei	17
5.4. Felhasznált emlős sejt kultúrák	17
5.5. Polimorfonukleáris sejtek (PMN) izolálása humán perifériás vérből.....	18
5.6. Mononukleáris sejtek (PBMC) izolálása humán perifériás vérből	18
5.7. Makrofágok differenciálata humán perifériás vérből származó monocitákból	18
5.8. In vitro fertőzési modellek	18
5.8.1. J774.2 fertőzés	18
5.8.2. PMN fertőzés	19
5.8.3. PBMC fertőzés.....	19
5.8.4. PBMC-DM fertőzés	19
5.9. Totál RNS izolálás.....	19
5.10. cDNS szintézis.....	20
5.11. Kvantitatív valós idejű PCR (qRT-PCR).....	20
5.12. Az IL-1 β koncentrációjának meghatározása a sejt kultúrák felülszóiában (ELISA).....	20
5.13. Áramlási citometria.....	20
5.13.1. Klasszikus áramlási citometria (Attune® készülékkel)	20
5.13.2. Kvantitatív imaging (FlowSight készülékkel)	21
5.14. Fluoreszcens mikroszkópia	21
5.15. Polimorfonukleáris sejtek ölési hatékonyságának meghatározása.....	21
5.16. Statisztikai analízis.....	22
6. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK	23
6.1. C. parapsilosis sensu lato csoportba tartozó C. parapsilosis, C. metapsilosis, C. orthopsilosis fajok eltérő fagocitózis és ölés hatékonyság vizsgálata J774.2 egér és humán sejt vonalakon	23
6.1.1. C. parapsilosis sensu lato csoportba tartozó C. parapsilosis, C. metapsilosis, C. orthopsilosis fajok eltérő fagocitózis vizsgálata J774.2 egér makrofágokon akridin narancs festéssel	23
6.1.2. C. parapsilosis sensu lato csoportba tartozó C. parapsilosis, C. metapsilosis, C. orthopsilosis fajok eltérő fagocitózis mérése J774.2 egér makrofágokon Quantitative imaging\.....	24
6.1.3. C. parapsilosis sensu lato csoportba tartozó C. parapsilosis, C. metapsilosis, C. orthopsilosis fajok eltérő fagocitózis mérése humán perifériális vér mononukleáris sejtekből (PBMC) differenciált makrofágokon áramlási citometria alkalmazásával.....	25

6.2. A C. parapsilosis sensu lato csoport által kiváltott természetes immunrendszer által történt felismerés vizsgálata J774.2 egér és humán makrofág sejtekkel	28
6.2.1. Egér Toll-like receptorok mRNS expressziójának real-time PCR analízise.....	29
6.2.2. Citokinek mRNS expressziójának real-time analízise J774.2 egér makrofágokon C. parapsilosis sensu lato csoport összehasonlításában	30
6.2.3. Humán Toll-like és C-típusú lectin receptorok és mRNS expressziójának real-time PCR analízise.....	31
6.2.4 Citokinek mRNS expressziójának real-time analízise humán makrofág sejtekben.....	32
6.3. A C. parapsilosis sensu lato csoport által indukált IL-1(citokin termelés vizsgálata ELISA módszerrel.....	33
7. ÖSSZEFOGLALÁS.....	35
8. IRODALOM.....	37
9. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS.....	039
10. FÜGGELÉK.....	40
10.1. Kvantitatív valós idejű PCR (qRT-PCR) mérések során használt primerek.....	40
11.NYILATKOZAT.....	42

2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

CLR	C-típusú lectin receptorok
Cm	<i>Candida metapsilosis</i>
Co	<i>Candida orthopsilosis</i>
Cp	<i>Candida parapsilosis</i>
CR3	complement receptor 3
DC	dendritikus sejt
dsRNS	kettős szálú RNS
ELISA	enzim-kötött immunoszorbens próba
GM-CSF	granulocita-makrofág kolonia stimuláló faktor
G-CSF	granulocita kolonia stimuláló faktor
ITS	internal transcribed spacer: az 5,8S rRNS-t kódoló DNS szakasz és környéke
IKK	I κ B kináz kináz
IL-1 β	interleukin-1 β
IL-1R	interleukin-1 receptor
IL-1Ra	interleukin 1 receptor antagonist
IL	interleukin
INF	interferon
IP10	INF γ -indukált fehérje 10
IRAK	IL-1-receptorhoz kapcsolt kináz
LPS	lipopoliszacharid
LRR	leucinban gazdag ismétlődés
MBL	mannóz-kötő lectin
MIP1 α	makrofág indukáló gyulladásos protein 1 α
MIP2	makrofág indukáló gyulladásos protein 2
MR	mannóz receptor
NF- κ B	nukleáris faktor- κ B
NK-sejt	természetes ölősejt
NOD	nukleotid kötő oligomerizációs domén
NLR	nukleotid-kötő oligomerizációs domén (NOD)- szerű receptorok
PAMP	Pathogen Associate Molecular Patterns, patogénekhez kapcsolt molekuláris mintázat
PCR	polimeráz láncreakció
PGRP	peptidoglükán felismerő protein

PMN	polimorfonukleáris sejtek
PBMC	mononukleáris sejtek
PRR	Pattern Recognition Receptor mintázatfelismerő receptor
qRT-PCR	kvantitatív valós idejű PCR
RAPD	randomly amplified polymorphic DNA
RIG-1	retinasav indukálható gén 1
Th1	1-es típusú segítő T sejt
Th2	2-es típusú segítő T sejt
TIR	Toll/IL-1R homológ domén
TNF α	tumor-nekrózis faktor α
TLR	Toll-like receptor
Treg	regulátor T sejt

3. BEVEZETÉS

3.1. A *Candida* genus és *Candida parapsilosis* jelentősége

Az 1980-as évek óta a gombákat tartják a humán megbetegedések egyik fő okozóinak. Habár az oppurtunista kórokozó fajok száma széles spektrumú, a világszerte elterjedt mikózisok kialakulásáért a *Candida* fajok is felelősek.

Ezek a kórokozók nem obligát, hanem oppurtunista patogének, kommenzalisták, azaz normál körülmények között is izolálhatóak az emberi szervezetből (pl.: bőrfelületről, kézről), tehát az egészséges emberi mikrobiális flóra részei. Az invazív illetve szisztémás candidiasis a megfelelő hajlamosító tényezők, például legyengült immunrendszer esetén jelentkeznek.

Az Amerikai Egyesült Államokban 1979 óta a gombák által okozott szepszis éves elterjedése 200%-ra nőtt. Valóban több invazív (szisztémás) candidiasis kerül felismerésre, mint korábban, hiszen szaporodik a csökkent védekezőképességű betegek száma. A szerv- és csontvelőtranszplantáltak, a malignus hematológiai betegség miatt agresszív kemoterápiában részesülők, az intenzív osztályon kezelt, tartós intravaszkuláris kanült viselők, a nagy hasi műtéten átesett betegek, HIV pozitívek körében komoly kihívást jelent a candidiasis és más mycosisok fellépte (1).

A leggyakrabban izolált kórokozó, melyet egyben a legvirulensebbnek is tartanak, a *Candida albicans*. A felszíni fertőzések mellett (candidiázis, orofaringeális candidiázis és vulvovaginitisz), a *C. albicans* súlyos egyéb fertőzéseket is képes okozni, mint például a candidemia és disszeminált candidiázis, melyek magas mortalitással asszociáltak.

Az 1990-es évektől a nem-albicans *Candida* fajok által okozott megbetegedések száma is megnövekedett. A *C. parapsilosis* a második leggyakrabban izolálható faj a gomba fertőzőes egyének vérkultúrájából. Ez a faj súlyos nozokómiális kórokozónak bizonyult, amely érintett endocarditis, meningitis, ízületi gyulladások, szemfertőzés, onychomycosis, otomycosis, vulvovaginitis, és húgyuti fertőzésekben (1).

A világszerte végzett vizsgálatok kimutatták, a *C. parapsilosis* megjelenése a nozokomiális fertőzések során a katéter-asszociált fertőzésekhez valamint implantátumokhoz köthető. Ellentétben a *C. albicans*-szal, amely által okozott betegségek korai kolonizáció továbbterjedéséből alakulnak ki, a *C. parapsilosis* képes kolonizáció nélkül is fertőzni, horizontálisan terjedni fertőzött felületekről, mint pl. egészségügyben használatos eszközökről vagy folyadékokból, illetve egészségügyi dolgozók kezéről, művégtagokról és katétereikről. Ez a fő oka annak, hogy a *C.*

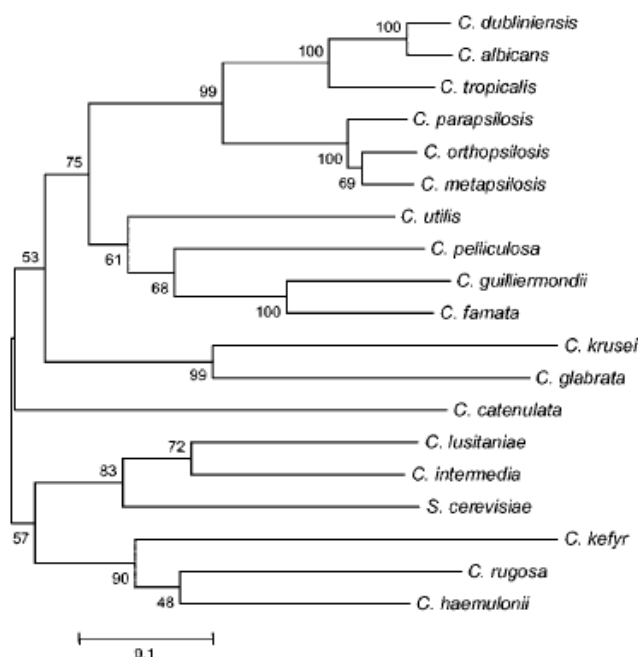
parapsilosis által okozott invazív megbetegedések főként immunológiailag legyengült személyek (AIDS-ben szenvedő betegek, leukémiás betegek, kemoterápiás kezelésben részesülő páciensek, stb.), kórházak intenzív osztályán fekvő betegek – különösen, központi vénás katéterrel ellátottak – és alacsony születési súlyú újszülöttek körében figyelhetők meg.

Továbbá a *C. parapsilosis* az a faj, amely dominánsan invazív candidiasist okoz koraszülötteknél, amely gyakran újszülöttkori halálozáshoz vezet.

3.1.2. A *C. parapsilosis sensu lato* csoport felosztása

A *C. parapsilosis*-t először Ashford izolálta 1928-ban. Bár kezdetben nem tartották patogénnek, 1940-ben, mint kórokozót azonosították egy halálos kimenetelű endocarditis esetén (1). Majd későbbi restrikciós fragment polimorfizmussal végzett vizsgálatok azt mutatták, hogy a *C. parapsilosis* izolátumok genetikailag sokkal heterogénebbek, mint más *Candida* fajok. 2005-ben *C. parapsilosis*-t három csoportra osztották: *Candida parapsilosis sensu strictio*, *Candida orthopsilosis* és *C. metapsilosis*.

Az izolátumok elkülönítése a következő vizsgálatok alapján történt: RAPD (randomly amplified polymorphic DNA), multilokus enzím elektroforézis, ITS (internal transcribed spacer: az 5, 8S rRNS-t kódoló DNS szakasz és környéke) szekvencia analízis, morfológia, különbségek a mitokondriális DNS szekvenciákban, DNS topoizomeráz II gén szekvenciája, és oligonukleotid próbák, amiket a *C. parapsilosis* törzsek azonosítására alkalmaztak (6).



1.ábra. ITS szekvencia különbségeken alapuló filogenetikai fa

3.1.3. A *C. parapsilosis sensu lato* csoport evolúciója

A *C. parapsilosis* kb. egy millió éve jelent meg az evolúciós idő-skálán. A *C. parapsilosis* globális megoszlása és a klinikai izolátumok közötti gyakoribb megjelenése széleskörű geográfiai elterjedésre utal, valószínűleg jobban képes emberről emberre terjedni, vagy jobban alkalmazkodik az emberi közösségek környezetéhez, mint a *C. metapsilosis* és *C. orthopsilosis*.

Mivel a *C. orthopsilosis*-ban szekvenciadiverzitás figyelhető meg, a *C. parapsilosis*-ban azonban nem, új hipotézis állítható fel, miszerint a *C. orthopsilosis* feltételezhetően a *C. parapsilosis* elődje lehet. A *C. metapsilosis* helye még nem ismert a 3 faj evolúciójában, de mivel a klinikai izolátumok között igen ritkán fordul elő, progenitor lehetett, együtt fejlődhetett a *C. orthopsilosis*-szal és *C. parapsilosis*-szal, és kevésbé alkalmazkodott a humán, vagy emlős niche-ekhez, mint két közeli rokona (6).

3.1.4. A *C. parapsilosis sensu lato* csoport eltérő virulencia képessége

Az adatok azt mutatják, hogy a három faj különbözik a prelevanciában, fertőzőképességben és a gyógyszerérzékenységben. Összehasonlítva a *C. parapsilosis sensu strictio*-val a 2 két új faj magasabb érzékenységet mutat az echinocandin vegyületek és az amphotericin B szerekekkel szemben, de a fluconazzal ellen alacsonyabb érzékenységet mutatnak. Így klinikai szempontból fontos a megkülönböztetésük.

A csoporton belül a *C. parapsilosis sensu strictio* a domináns faj, majd követi a *C. orthopsilosis* és a *C. metapsilosis*, melyek együtt kevesebb mint 10%-ban izolálhatóak az invazív candidiasis klinikai mintáiban (1).

Egy kutatás során, ahol 2. 128 felszíni mikózisra pozitív személyt vizsgáltak, 214 beteg esetén izolálható volta *C. parapsilosis* csoport. A 214 páciensből 16-nál (7,5%) találtak több gombafajt is, ebből 14 esetben (87,5 %) a *C. albicans* + *C. parapsilosis* fajokat izolálták, majd kisebb százalékokban a *C. tropicalis* + *C. parapsilosis*, és *C. guillirmondii* + *C. parapsilosis* populációkat. A 214 vizsgált személyből 198 személynél csak egyféle gombafajt izoláltak: 191 (96,5%) főnél *C. parapsilosis sensu strictio*, 5 (2,5%) *C. metapsilosis*, és 2 (1,0%) a *C. orthopsilosis* volt a fertőzést kiváltó kórokozó. A kutatás eredményei alapján a *C. metapsilosis* és *C. orthopsilosis* is izolálható volt bőr és köröm lésiókból, de sokkal kisebb százaléokban, mint a *C. parapsilosis sensu strictio*. Ezek az adatok is alátámasztják, hogy felületi candidiasisban a 2 új faj kisebb mértékű virulenciával rendelkezik (4).

Rekonstruált human epidermális és orális szöveteken végzett patogenitást vizsgáló kísérletek is alátámasztják azt a tényt, hogy a *Candida parapsilosis sensu lato* csoporton belül a *C. metapsilosis* és *C. orthopsilosis* kisebb patogenitást és virulenciát mutat (2).

A csoporton belül a legnagyobb fertőzőképességet a *C. parapsilosis* mutatja, majd követi a *C. orthopsilosis*, a legkisebb virulenciával végül a *C. metapsilosis* rendelkezik.

Candida fajok patogenezisében számos virulencia faktor játszik szerepet, ezek közül a leglényegesebbek az adhézió, a biofilm képzés, és különböző hidrolitikus enzimek szekréciója – például: szekretált aszpartil proteázok, foszfolipázok és lipázok.

A biofilm képzés elősegíti a gomba orvosi műszereken való megtapadását és a gazdaszervezet károsítását, emellett védi a patogént az antifungális terápiák során a felhasznált antifungális szerekkel szemben, mivel megakadályozza az hatóanyag bejutását a biofilm mélyebb részeibe. Mindemellett a biofilm struktúra védelmet biztosít a gazdaszervezet immunválaszával szemben. Ezért azok az izolátumok, amelyek képesek a biofilm képzésre súlyosabb gazdakárosító hatással rendelkeznek (1).

3.2. A *Candida* fajok által kiváltott természetes immunválasz

Egészséges egyéneknél a természetes immunrendszer képes kiiktatni a szervezetre káros ágensek ezreit, ahogyan patogén gombákat is, hogy védekezzen a fertőzés terjedésével szemben. Azonban, ha károsodott az immunrendszer (pl.: immunszuppresszív terápiák, rák, AIDS esetében), az oppurtunista gombák nagyobb valószínűséggel okoznak megbetegedéseket. A gombás betegségek nagyarányú prelevanciája felhívja a figyelmet arra, hogy fontos megérteni a gomba kórokozók és a gazda közötti interakciót.

Tudjuk, hogy a fagocita sejtek (neutrofil granulociták, monociták, mackrofágok és dendritikus sejtek) kulcsfontosságú szerepet játszanak gomba kórokozók ellen, és e sejtek vagy effektorfunkcióik hiánya nagyfokú érzékenységet eredményez a fertőzésekkel szemben. Bár az utóbbi években nagyban bővültek ismereteink az immunrendszer működéséről, még mindig sok fontos kérdést szükséges megválaszolni.

Az elmúlt évtizedben, nagy előrelépés történt a *C. albicans* indukált veleszületett immunrendszer általi felismerés megértésében. Annak ellenére, hogy a klinikai jelentősége egyre nő, még mindig keveset tudunk a *C. parapsilosis* felismeréséről és az adaptív immunrendszerben kiváltott hatásáról (8). A kutatások eredménye alapján különbség van a *C. parapsilosis* és *C. albicans* közötti immunsejtek általi érzékelésben. Ezeknek a különbségeknek a feltárása hozzájárulhat a hatékonyabb gombaellenes terápiák kifejlesztéséhez.

3.2.1. A mintázat felismerő receptorok (Pattern Recognition Receptors (PRRs))

Csak az elmúlt évtizedben lett ismeretes, hogy a természetes immunrendszer nem csak specifikusan felismeri a mikroorganizmusok különböző osztályait, hanem elindítja és modulálja a későbbi adaptív immunválaszt. A behatoló patogén felismerését és a gazda válasz aktivációját a mintázat felismerő receptorok (Pattern Recognition Receptors (PRRs)) végzik, amelyek érzékeli a konzervált patogén asszociált molekuláris mintázatot (Pathogen Associate Molecular Patterns (PAMPs)).

A mintázat felismerő receptorok olyan mikrobiális összetevőket ismernek fel, amelyek a mikróba integritásához, funkcionális működéséhez és/vagy reprodukciójához esszenciálisan szükségesek, azaz gyors megváltozásuk nem lehetséges. Ezek a receptorok képesek érzékelni a gomba sejtfa komponenseket. A mintázat felismerő receptoroknak 4 fő osztálya van:

1, Toll-like receptorok (TLR) lehetnek sejtmembrán-asszociált (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 és TLR6) vagy intracelluláris (TLR3, TLR7, TLR8 és TLR9) receptorok. Emlősökben 13 TLR-t azonosítottak: emberben TLR1-11-ig, egérben TLR1-9, TLR11-13. A különféle TLR-ek képesek érzékelni számos gomba struktúrát: TLR2 a foszfolipomannánt, TLR4 az O-kapcsolt mannánt, TLR6 a zimozánt, TLR9 a gomba DNS-t képes felismerni. A többi receptor képes más kórokozó komponenseket kötni: TLR1 triacil lipopeptideket, oldott faktorokat, TLR3 dsRNS-t, TLR5 flagellint, TLR7 ssRNS-t, TLR11 profilin szerű molekulákat köt. A TLR10 ligandja nem meghatározott.

2, A C-típusú lectin receptorok (CLR) főleg membrán-kötött formában vannak jelen és a *C. albicans* poliszacharid struktúráit ismerik fel: a Dectin 1 a β -glukánt, amíg a makrofág mannóz receptor (MR) és DC-SIGN a N-kapcsolt mannánt érzékeli.

3, A nukleotid-kötő oligomerizációs domén (NOD)- szerű receptorok (NLR) és a (4.) retinasav indukált gén 1 (RIG1) intracelluláris receptorok, melyeknek ligandjai a bakteriális peptidoglukán és a virális nukleinsavak. Nincs tanulmány, amely leírná, hogy ezek a receptorok szerepet játszanak a gombafelismerésben.

A membrán kötött receptorok közös jellemzője, hogy három fő részből állnak: egy extracelluláris, variábilis, leucinban gazdag ismétlődésekből álló (LRR) doménből, amely a ligandumok megkötéséért felelős, egy rövid transzmembrán régióból, valamint egy intracelluláris, konzervatív, a humán interleukin 1 receptorral (IL-1R) homológ, Toll/IL-1R (TIR) doménből, amely elengedhetetlen a jelátviteli folyamatok elindításához.

Léteznek más osztályba tartozó molekulák is, amelyek hasonló funkcióval rendelkeznek mint a PRR-ok. Ilyenek például a peptidoglukán felismerő proteinek (PGRP-k), melyeknek a

peptidoglukán érzékelésben van szerepük rovar és emlős sejtekben. Habár PGRP-k indukálják a defensinokat *Drosophila melanogaster*-ben, az emlős sejtekben betöltött szerepük még nem teljesen tisztázott. Létezik még néhány protein, amely képes a bakteriális struktúrák megkötésére, pl.: pentraxinok és mannóz-kötő lectinek (MBL), amelyek szintén a PPR-ekhez tartoznak (8, 9).

3.2.2. A *C. albicans* indukált természetes immunrendszer és felismerés

A gomba sejtfa főleg szénhidrátpolimerekből áll, amelyek egy rigid vázat kölcsönöznek a gombasejtnek, védve azt a környezettől. A belső réteget β -glukán és kitin alkotja, amelyet egy mannánréteg borít. A belső komponensek így csak a hasadási hegeknél kerülhetnek a felszínre. Mindemellett a sejtfa dinamikus struktúra, képes változni, így a gomba morfológiai változásokon mehet át. A *C. albicans* képes az élesztő és a fonalas forma között váltásra („switching”), ami hozzájárul az élesztő virulenciájához (8).

A Toll-like receptorok közül a TLR2 (mely képes heterodimert alkotni a TLR1 vagy TLR6-tal), a TLR4 és TLR6-t, a C-típusú lectin receptorok közül a Dectin 1-et és Dectin 2-t írták le, amely érintett a gomba patogének felismerésében (8, 9, 14).

A makrofágok felszínén a C-típusú lectin mannóz receptor (MR) a *C. albicans* sejtfaát alkotó mannánt, az α -kapcsolt mannóz struktúrákat a dendritikus sejtek az MR, TLR4, DC-SIGN, Dectin 2 receptorai kötik.

A *C. albicans* sejtfa 60 %-ban β -glukán, ami a mannoprotein réteg alatt található, de hasadási hegek helyén kikerülhet a felszínre, és így érzékelhető lesz a gazda sejtek számára. A β -glukán kötését a Dectin-1 receptorok a TLR-ek közösen végzik.

A fagocitákon lévő PPR-ek által történt felismerés intracelluláris szignalizációs útvonalakat aktivál, amely számos citokin, kemokin, eicosanoid és más szolubilis faktorok termelődéséhez vezet, melyek együttesen iniciálják és szabályozzák a gyulladásos választ és az adaptív immunitás kialakulását.

A TLR2, TLR4, TLR6, TLR9 az NF κ B szignalizációs útvonalon keresztül indukálják a citokin produkciót. Az egyensúly a szignálok között, amit a TLR2 és TLR4 indukál, kruciális az immunrendszer regulálásában. A TLR4 a gyulladásserkentő citokinek termelését idézi elő, mint például az IFN γ , ami a TH1 típusú immunválaszt mediálja.

A TLR2 gyulladáscsökkentő citokin serkentő hatása gyengébb, mint a TLR4 indukált, emellett ligandja kötésekor nem okoz IL-12 és a TH1-típusú IFN γ felszabadulást, ez előmozdíthatja a TH2 vagy a regulátor T sejt (T_{reg}) típusú immunválaszt. Tanulmányok leírták, hogy a *C. albicans* immunszuppresszív hatással lehet a TLR-2 által indukált IL-10 felszabaduláson keresztül, ami a T_{reg}

sejtek generálásához vezet (9).

A TLR 6 és TLR9 citokin indukciója kevésbé jelentős. A nem-TLR receptorok közül a Dectin1 és Dectin2 is érintett a *C. albicans* által okozott immunválaszban. A Dectin 2 köti a gomba hifát és a TNF α és az IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) produkciót fokozza. A Dectin 1 számos citokin és kemokin felszabadulást okoz érzékelve a kórokozót, ezek: a TNF α , a makrofág indukáló gyulladásos protein 2 (MIP2), a makrofág indukáló gyulladásos protein 1 α (MIP1 α), a granulocita-makrofág kolonia stimuláló faktor (GM-CSF), a granulocita kolonia stimuláló faktor (G-CSF), IL-10, IL-2, IL-1 α , IL-1 β , IL-23, és IL-6 (9).

3.2.3. A természetes immunrendszer effektor sejtjei és a *C. albicans* interakció

A természetes immunrendszer fő sejtjei, amelyek érzékelik a behatoló patogéneket a vérkeringésben lévő monociták és a neutrofil granulociták, illetve a fertőzött szövetekben található makrofágok.

A monocita sejtmembránon számos TLR és kisebb mennyiségű lectin receptor (LR) expresszálódik. A makrofággá differenciálódás során megőrzik a TLR-ek expressziójának képességét, azonban a lectin receptorokat nagyobb mennyiségben expresszálják (8, 9).

A neutrofil granulociták kisebb számban expresszálnak TLR-eket, főleg a fagocitotikus receptorokat, mint a complement receptor 3 (CR3) és Fc γ receptorokat hordozzák. A dendritikus sejteken, amelyeknek feladatuk az antigén prezentálás, szintén találhatóak a sejtmembránjukon PRR-eket.

Mintázat-felismerő receptorokkal a felsorolt sejtek mindegyike rendelkezik, és ez meghatározza a *C. albicans* felismerését és az immunválasz típusát.

A felismerést a gomba bekebelezése és fagocitózisa követi. Makrofágok esetében a fagocitózis az élő és a hővel előlt *Candida* sejtek stimulációjára a maturációs markerek gyors felgyülemelését, és a fagoszóma érését váltja ki. A fagocitáló sejtek számos oxidatív és nem oxidatív folyamattal képesek az extracelluláris térben lévő és az internalizált gombák elpusztítására. A kórokozó eliminálására használt mechanizmusok az acidifikáció, reaktív oxigéngyökök, reaktív nitrogén intermedierek, antimikrobiális peptidek, hidrolázok termelése. Ezeket számos citokin és szolubilis mediátor befolyásolja: képesek a gombaellenes effektor mechanizmusok serkentésére (IFN- γ) vagy elnyomására (IL-10).

A különböző fagociták eltérő mértékben képesek a kórokozókat eliminálni vagy növekedésüket korlátozni. A *C. albicans* esetében a leghatásosabb effektor sejtek a neutrofilek, ezeket követik a monociták, makrofágok és a dendritikus sejtek (8, 9).

3.2.4. Citokinek és funkcióik

A citokinek az immunválasz valamennyi szakaszában és mechanizmusában, valamint a gyulladásos folyamatok pathomechanizmusában jelentős szabályozó szerepet betöltő intracelluláris kommunikációs molekulák.

A tumornekrózis faktor α (TNF α) az akut gyulladásos immunválasz alapvető mediátora. Meghatározó faktor a gyulladásos folyamatok és a láz kialakításában (anti-virális, bakteriális és parazita-ellenes hatása van). Citokinkaskád elindításában van szerepe. Monociták, aktivált limfociták, természetes ölü és endothélsejtek termelik. További hatásai a granulocita aktiváció (adherencia, kemotaxis, degranuláció, oxidatív metabolizmus fokozása), az endotélsejtek adhéziónak molekuláinak expressziójának fokozása segíti a fehérvérsejtek bejutását és gyors aktiválását akut gyulladás során, monociták és endotélsejtek citokin és kemokin termelését stimulálja, és indukálja az apoptózist.

Az interleukin 1 (IL-1) legfontosabb biológiai hatásai: az antigénprezentáció során aktiválja a T sejteket (IL-2 termelés fokozása, illetve az IL-2 receptorexpresszió növelése révén) lázkeltező, hat az idegrendszerre (letargia, anorexia, aluszékonyság kialakulásáért is felelős), az endotélsejtek adhéziónak molekuláinak expresszióját növeli. Az IL-1 család IL-1ra tagja az IL-1 természetes antagonistája mely a gyulladásos reakciók során az IL-1 patológiás hatásait csökkenti.

Az interleukin 12 (IL-12) funkciója a természetes ölü sejtek (NK) stimulációja, proliferációja és ezeknek a sejteknek a citokin termelésének fokozása, segíti a T helper sejtek proliferációját.

Az interleukin 6 (IL-6) hatása a T sejt aktiválás, citotoxikus T sejtek differenciációja, B sejt differenciálás, az akut fázis fehérjék termelését indukciója, emellett szerepe van a mieloid leukémia sejtek makrofágokká differenciálódásában.

Interferon gamma (IFN γ) fokozza a monociták antigénprezentáló és citokintermelő képességét serkenti a fagocitózist, nitrogénoxid termelést, a patogének intracelluláris ölését, növeli a természetes ölü sejtek citotoxikus aktivitását, stimulálja a neutrofil granulocitákat, antivirális hatású. Az interleukin 8-at (IL-8) makrofágok termelik és a neutrofil granulociták aktiválását, végzik.

citokin	Termelő sejt	Target sejt	Elsődleges hatás
IL-1	Monociták, Makrofágok Fibroblasztok Epitéliális sejtek Endotéliális sejtek Asztrociták	T sejtek; B sejtek Endotéliális sejtek Hypothalamus Máj	Kostimulációs molekula Aktiválás (gyulladás) Láz Akut fázis reakciók
IL-2	T sejtek; NK sejtek	T sejtek B sejtek Monociták	Növekedés Növekedés Aktiváció
IL-3	T sejtek	Csontvelői progenitorok	Növekedés és differenciálódás
IL-4	T sejtek	Naive T sejtek T sejtek B sejtek	Differenciálódás Th2 sejtekké Növekedés Aktiváció és növekedés; Izotípus váltás IgE
IL-5	T sejtek	B sejtek Eosinofil granulociták	Növekedés és aktiváció
IL-6	T sejtek; Makrofágok; Fibroblasztok	T sejtek; B sejtek Érett B sejtek Máj	Kostimulációs molekula Növekedés (emberben) Akut fázis reakció
IL-8 family	Makrofágok; Epitéliális sejtek;	Neutrofil granulociták	Aktiváció és reakció
IL-10	T sejtek (Th2)	Makrofágok T sejtek	APC aktiváció gátlása Citokin produkció gátlása
IL-12	Makrofágok; NK sejtek	Naive T sejtek	Differenciáció Th1 irányba
IFN-gamma	T sejtek; NK sejtek	Monociták Endotéliális sejtek Szöveti sejtek	Aktiváció Aktiváció MHC I és II expresszió növelése
ITGF-béta	T sejtek; Makrofágok	T sejtek Makrofágok	Aktiváció és növekedés gátlása Aktiválás gátlása
GM-CSF	T sejtek; Makrofágok; Endotéliális sejtek, Fibroblasztok	Csontvelői progenitorok	Növekedés és differenciálódás
TNF-alfa	Makrofágok; T sejtek	IL-1-hez hasonló	IL-1-hez hasonló

2. ábra. Citokinek és funkcióik

4. CÉLKITŰZÉSEK

Az elmúlt évtizedben, nagy előrelépés történt a *C. albicans* indukált veleszületett immunrendszer általi felismerés megértésében. Annak ellenére, hogy a klinikai jelentősége egyre nő, még mindig keveset tudunk a *C. parapsilosis* felismeréséről és az adaptív immunrendszerben kiváltott hatásáról. A *C. parapsilosis* fajcsoport izolátumait a genetikai heterogenitásuk alapján 3 fajra osztották: *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* és *C. orthopsilosis*.

Ezek a fajok filogenetikailag közel állnak egymáshoz, virulenciájukban mégis különböznek. Munkánk célja a 3 faj által kiváltott természetes immunitás megfigyelése, mely segíthet megérteni a virulenciában mutatott különbségeket.

Munkánk során célunk volt:

1. A három fajjal szemben mutatott fagocitózis és ölés hatékonyság vizsgálata egér és humán makrofág sejteken.
2. A természetes immunrendszer felismerésében szerepet játszó Toll-like (TLR), Dectin 1, és Dectin 2 receptorok expressziójának vizsgálata egér és humán makrofágokon.
3. A három faj felismerését követő citokin termelés vizsgálata qPCR és ELISA módszerrel.

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1. Felhasznált gombatörzsek

Kísérleteink során a *Candida albicans* (SC5314), *Candida parapsilosis* (GA1), *Candida orthopsilosis* (SZMC 1545), és *Candida metapsilosis* (SZMC 1548) vad típusú izolátumokat használtuk.

5.2. Oldatok és táptalajok

PBS, pH 7,4

137 mM NaCl
2.7 mM KCl
10 mM Na₂HPO₄
2 mM KH₂PO₄

YPD tápoldat

0,5 % élesztőkivonat
1 % pepton
1 % glükóz

YPD táptalaj

0,5 % élesztőkivonat
1 % pepton
1 % glükóz
2 % agar

ACK lízis puffer

150 mM NH₄Cl
10 mM KHCO₃
0,1 mM Na₂EDTA

RPMI/PS tápoldat

RPMI 1640 tápoldat (Lonza)
1 % Penicillin-Streptomycin oldat (Sigma)

RPMI/HS/PS tápoldat

RPMI 1640 tápoldat (Lonza)
10 % hő-inaktivált humán szérum (Lonza)

1 % Penicillin-Streptomycin oldat (Sigma)

DMEM/FBS/PS tápoldat

DMEM tápoldat (Lonza)

10 % hő-inaktivált FBS (Fetal Bovine Serum, Lonza)

1 % Penicillin-Streptomycin oldat (Sigma)

Akridin narancs festék

0,01 % akridin narancs PBS-ben

Kristályibolya festék

0,05 % kristályibolya PBS-ben

FACS puffer

0,5 % FBS (Lonza) PBS-ben

5.3. *Candida* törzsek tenyésztési körülményei

A felhasznált *Candida* törzsek fenntartása YPD táptalajon történt havonkénti átoltással, az izolátumokat 4°C-on tároltuk. A kísérleteket megelőző napon a szükséges törzsekből átoltottunk 3 ml YPD tápoldatot tartalmazó félkémcsövekbe, amelyeket éjszakára 30 °C-os rázó inkubátorba helyeztünk. Másnap a sejteket centrifugálással összegyűjtöttük, kétszer PBS pufferrel mostuk, majd Bürker kamra segítségével meghatároztuk a sejtszuszpenziók koncentrációját.

5.4. Felhasznált emlős sejt kultúrák

J774.2

A BALB/C egérből származó J774.2 makrofág-szerű sejtvonal fenntartása DMEM/FBS/PS tápoldatban történt 37 °C-os inkubátorban, 5 % CO₂ és 100 % relatív páratartalom mellett.

Humán perifériás vérből izolált polimorfonukleáris sejtek (PMN)

A humán friss perifériás vérből származó polimorfonukleáris sejteket izolálást követően (ld. 5.5.) azonnal felhasználtuk.

Humán perifériás vérből izolált mononukleáris sejtek (PBMC)

A humán perifériás vérből (*buffy coat*-ból) nyert mononukleáris sejteket izolálást követően (ld. 5.6.) azonnal felhasználtuk.

Humán perifériás vérből izolált monocitákból differenciáltatott makrofágok (PBMC-DM)

A humán perifériás vérből (*buffy coat*-ból) származó monocitákból differenciáltatott makrofágokat RPMI/HS/PS tápoldatban tenyésztettük 37 °C-os inkubátorban, 5 % CO₂ és 100 % relatív páratartalom mellett (ld. 5.7.).

5.5. Polimorfonukleáris sejtek (PMN) izolálása humán perifériás vérből

A polimorfonukleáris sejtek izolálásához EDTA-s vérvételi csövekbe gyűjtött friss humán perifériás vért használtunk. A PMN sejteket Polymorphprep™ (Axis-Shield) segítségével szeparáltuk a gyártó által mellékelt előírásoknak megfelelően, majd rögtön felhasználtuk az ölési hatékonyság meghatározásához (ld. 5.15.)

5.6. Mononukleáris sejtek (PBMC) izolálása humán perifériás vérből

A perifériás vérből származó mononukleáris sejtek (PBMC) izolálása ficoll gradiens centrifugálással történt. Ehhez a vért 1:2 arányban PBS-sel hígítottuk, Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare) oldatra rétegeztük, majd centrifugálást követően összegyűjtöttük a külön réteget képező mononukleáris sejteket. Ezután az izolált sejtfrakciót PBS-sel mostuk, majd ACK lízis pufferrel kezeltük a vörösvértestek eltávolítása érdekében. Újabb, PBS-sel történt mosást követően a mononukleáris sejteket RPMI/PS tápoldatban vettük fel, majd Bürker kamra segítségével meghatároztuk a kapott sejtszuszpenzió koncentrációját.

5.7. Makrofágok differenciáltatása humán perifériás vérből származó monocitákból

Makrofágok differenciáltatásához 10⁷ sejt/ml koncentrációjú PBMC szuszpenziót osztottunk szét 24 lyukú lemezen, majd azokat 1,5 óráig inkubáltuk (37 °C, 5 % CO₂). Mivel a monociták kitapadnak a tenyésztőedény aljához, elkülöníthetők a PBMC frakcióban jelen lévő egyéb sejtípusoktól. 1,5 óra után a lemezről eltávolítottuk a médiumot és az úszó sejteket, a letapadt monocitákat PBS-sel mostuk, majd 7 napig RPMI/HS/PS tápoldatban tenyésztettük a tápoldat kétnaponkénti cseréjével.

5.8. *In vitro* fertőzési modellek

5.8.1. J774.2 fertőzés

A J774.2 sejtek stimulációja során 3×10^5 makrofágot fertőztünk ötszörös mennyiségű ($1,5 \times 10^6$) *Candida* sejtet tartalmazó szuszpenzióval (100 μ l) 24 lyukú lemezekben. Kontrollként steril PBS-t használtunk. A lemezeket a kívánt ideig inkubáltuk 37 °C-on, 5 % CO₂ tartalom mellett, majd felhasználtuk RNS izoláláshoz (ld. 5.9.), vagy áramlási citometriás méréshez (ld. 5.13.).

5.8.2. PMN fertőzés

Izolálás után a polimorfonukleáris sejteket azonnal felhasználtuk az ölési hatékonyság meghatározásához, (ld. 5.15).

5.8.3. PBMC fertőzés

A mononukleáris sejtek stimulációjához 5×10^6 sejt/ml koncentrációjú PBMC szuszpenziót (RPMI/PS tápoldatban) osztottunk szét 96 lyukú kerekaljú lemezekben (100 μ l /mintahely). Ezután a sejtekhez 100-100 μ l, 10^6 sejt/ml koncentrációjú *Candida* szuszpenziót (RPMI/PS tápoldatban) vagy RPMI/PS tápoldatot (kontroll) adtunk, majd a lemezeket 37 °C-on, 5 % CO₂ tartalom mellett inkubáltuk. 24 órával később a felülúszókat összegyűjtöttük, majd felhasználásig (ld. 5.12.) -70 °C-on tároltuk.

5.8.4. PBMC-DM fertőzés

A differenciálódott makrofágok számának meghatározása után ötszörös mennyiségű *Candida* sejtet tartalmazó szuszpenzióval (100 μ l), vagy steril PBS-sel (kontroll) oltottuk be a kultúrákat. A lemezeket a kívánt ideig inkubáltuk 37 °C-on, 5 % CO₂ tartalom mellett, majd felhasználtuk RNS izoláláshoz (ld. 5.9.), vagy áramlási citometriás méréshez (ld. 5.13.).

5.9. Totál RNS izolálás

A kísérletek során az RNS izoláláshoz Total RNS Mini Kit-et (Geneaid) használtunk, a kithez mellékelt gyártói utasításoknak megfelelően. A genomi DNS eliminációjához RNase-Free DNase Set-et (Qiagen) használtunk. Az izolált RNS integritását és koncentrációját Agilent 2100 BioAnalyzer készülék (Agilent Technologies) segítségével határoztuk meg. A cDNS-szintézishez használt RNS minták RIN (RNA Integrity Number) értéke minden esetben ≥ 9 volt.

5.10. cDNS szintézis

A reverz-transzkripcióhoz a RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit-et (ThermoScientific) használtuk a gyártó utasításainak megfelelően. Az RNS mintákat a koncentrációjuktól függően nukleáz mentes vízzel hígítottuk, majd minden reakcióban azonos mennyiségű RNS-t használtunk a cDNS szintézishez.

5.11. Kvantitatív valós idejű PCR (qRT-PCR)

A kvantitatív valós idejű PCR (qRT-PCR) során Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix-et (Fermentas) használtunk a gyártói utasításoknak megfelelően. A qRT-PCR-hez 10x hígított cDNS mintákat és 300 nM koncentrációjú primereket használtunk. Belső kontrollként J774.2 sejtvonal esetén β -aktin (BA), humán makrofágok esetében β 2-mikroglobulin (B2MG) szolgált. A méréseket CFX96™ Real-Time System detektorral felszerelt C1000™ Thermal Cycler készülék (BIO-RAD) segítségével végeztük az alábbi program szerint:

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

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

A eredményeket a $\Delta\Delta C_t$ módszer segítségével analizáltuk.

5.12. Az IL-1 β koncentrációjának meghatározása a sejtkultúrák felülszóiban (ELISA)

A szekretált IL-1 β koncentrációját a sejtkultúrák felülszóiban enzim-kötött immunoszorbens próba (ELSIA) segítségével határoztuk meg. Ehhez Human IL-1b/IL-1F2 Quantikine® ELISA Kit-et (R&D Systems) használtunk a gyártó utasításainak megfelelően.

5.13. Áramlási citometria

5.13.1. Klasszikus áramlási citometria (Attune® készülékkel)

A fagocitózis kvantitatív vizsgálatához a humán makrofágokat fluoreszcensen jelölt gombával

fertőztük. A *Candida* sejtek festéséhez 100 µl 10⁹ sejt/ml koncentrációjú szuszpenzióhoz 11 µl Na₂CO₃ oldatot (1 M, pH 10), majd 2 µl 10 mg/ml koncentrációjú Alexa Fluor® 610-X, succinimidyl ester festéket (Invitrogen) adtunk. 30 perc után a szuszpenziót négyszer PBS-sel mostuk, majd beállítottuk a megfelelő sejtszámot. A humán makrofágok fertőzéséhez tízszeres mennyiségű gombát használtunk. 2 óra inkubáció (37 °C, 5 % CO₂) után a lemezekről eltávolítottuk a tápoldatot, majd a sejteket kétszer PBS-sel mostuk a nem fagocitált gomba eltávolítása érdekében. Ezután a lemezen TrypLE™ oldatot (Gibco) osztottunk szét (0,5 ml/mintahely), majd 45 perc inkubációt (37 °C, 5 % CO₂) követően pipettázás segítségével szuszpenzióba vittük a sejteket. Centrifugálást követően a mintákat 1 ml FACS pufferben vettük fel, majd Attune® Acoustic Focusing Flow Cytometer készülék segítségével analizáltuk.

5.13.2. Kvantitatív imaging (FlowSight készülékkel)

A FlowSight (Amnis) készülékkel vizsgált mintákat hasonlóan készítettük elő, mint a klasszikus áramlási citometriához (ld. 5.13.1.), néhány különbséggel. A *Candida* sejteket ebben az esetben piros fluoreszcenciát mutató Alexa Fluor® 647 carboxylic acid, succinimidyl ester festékkel (Invitrogen) jelöltük, és ötszörös mennyiségű gombát használtunk a makrofágok (humán vagy egér) fertőzéséhez. Továbbá, a J774.2 sejteket nem kezeltük TrypLE™ oldattal, mivel ezek egyszerű pipettázással is szuszpenzióba vihetők.

5.14. Fluoreszcens mikroszkópia

A fagocitózis, illetve ölési hatékonyság vizsgálatához a J774.2 makrofágokat 24 lyukú lemez mintahelyeiben elhelyezett műanyag fedőlemezekre tapasztottuk ki, majd ötszörös mennyiségű gombával fertőztük a sejteket. 3 óra inkubáció (37 °C, 5 % CO₂) után a műanyag fedőlemezekről eltávolítottuk a tápoldatot, majd a kitapadt sejteket kétszer mostuk PBS-sel (a nem fagocitált *Candida* sejtek eltávolítása érdekében). Ezután a fedőlemezeket akridin narancsban festettük 1 percig, majd ismét kétszer mostuk PBS-sel. Ezt követően 30 másodpercig kristály ibolyával festettük, majd ismét PBS-sel mostuk a lemezeket. Végül a fedőlemezeket a sejteket tartalmazó oldalukkal lefelé üveg tárgylemezekre fektettük, és széleiket színtelen körömlakkal légmentesen lezártuk. A preparátumokat OLYMPUS fluoreszcens mikroszkóppal különböző nagyítások mellett vizsgáltuk.

5.15. Polimorfonukleáris sejtek ölési hatékonyságának meghatározása

A vizsgálat során 10^5 gazdasejtet fertőztünk ötszörös mennyiségű *Candida* sejttel. Kontrollként a fertőzéshez használt mennyiségű mikrobával oltottunk be PMN sejteket nem tartalmazó RPMI/PS tápoldatot. 1 óra inkubációs időt követően (37 °C, 5 % CO₂) a sejteket steril desztillált vízzel kezeltük, majd a szuszpenziót injekciós tűn többször átszívtuk, hogy az összetapadt gombasejtek, valamint a fagociták által bekebelezett, de még élő sejtek kiszabaduljanak. Az így kezelt szuszpenziót megfelelő mértékben hígítottuk, majd 3 párhuzamosban YPD táptalajt tartalmazó csészékre szélesztettük. 2 nap múlva a megjelenő telepeket megszámláltuk.

Az ölés százalékos hatékonyságát a következő képlet alapján számoltuk ki: az elpusztított *Candida* sejtek számát (*Candida* telepek átlagos száma a kontrollban – *Candida* telepek átlagos száma a gazda sejtekkel ko-kultúrában) elosztottuk az összes *Candida* sejt számával (*Candida* telepek átlagos száma a kontrollban), majd szoroztuk 100-zal.

5.16. Statisztikai analízis

A statisztikai számításokat a GraphPad PRISM 5 szoftverrel végeztük. Amikor elegendő adat állt rendelkezésünkre, a szignifikanciát ANOVA teszttel állapítottuk meg. Statisztikailag akkor tekintettük szignifikánsnak a különbséget, ha $p < 0,05$.

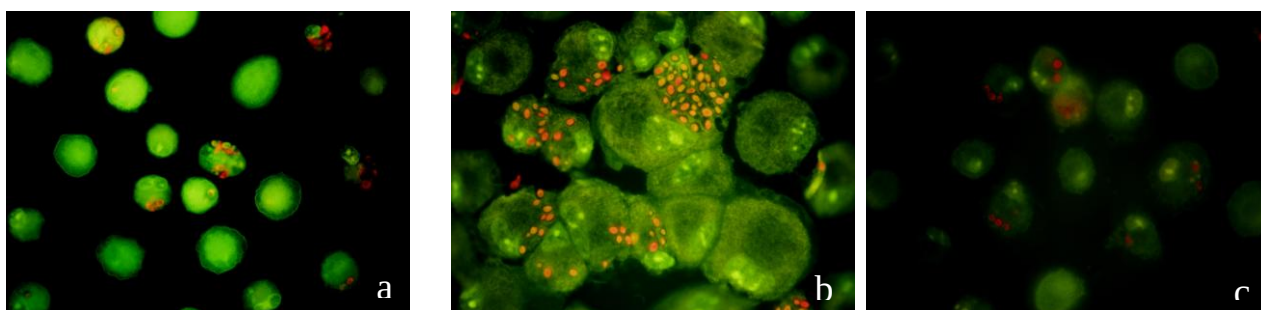
6. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

6.1. *C. parapsilosis sensu lato* csoportba tartozó *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis* fajok eltérő fagocitózis és ölés hatékonyság vizsgálata J774.2 egér és humán sejtvonalakon

6.1.1. *C. parapsilosis sensu lato* csoportba tartozó *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis* fajok eltérő fagocitózis vizsgálata J774.2 egér makrofágokon akridin narancs festéssel

Munkák során célul tűztük ki a *C. parapsilosis sensu lato* csoportba tartozó opportunistá patogén fajok gazda sejtekkel történő interakciójának összehasonlítását. A gazda-patogén kölcsönhatások vizsgálatához széles körben elterjedt modellrendszer a J774.2 egér makrofág szerű sejtvonala. Ezek a sejtek hatékonyan képesek a *Candida* sejtek felismerésére, fagocitózisára és azok ölésére is. Kutatásunk során a különböző *C. parapsilosis sensu lato* csoportba tartozó fajok sejtjeinek makrofág sejtekre gyakorolt hatását vizsgáltuk. A fagocitózis a természetes immunitáshoz tartozó folyamat, amely jelzésként szolgál számunkra, hogy megtörtént a gazda általi felismerés.

A megfigyeléshez munkacsoportunkban rutinszerűen használt festési módszert, az ún. akridin narancsfestésen alapuló módszert alkalmaztunk, mely lehetővé teszi a fagolizoszómán belül az élő és degradált gombasejtek elkülönítését: az ép kettősszájú DNS molekulákkal rendelkező sejteket zöldre, míg a degradálódott vagy egyes szájú DNS molekulával rendelkező elpusztult sejteket piros, narancsvörös színűre festi. A három faj interakcióját elemeztük J774.2 makrofágokkal szemben. 3 óra inkubációt követően fluoreszcens mikroszkópiás eljárással vizsgáltuk a fagocitózis megjelenését (3. ábra).



3. ábra. Fagocitáló makrofág sejtek UV gerjesztő fényben, (a) *C. metapsilosis* fagocitózisa 400x-os nagyításban, (b, c) *C. orthopsilosis* és *C. parapsilosis* fertőzött makrofág sejtek 100xos nagyításban. Az akridin narancsfestés lehetővé teszi a zölden fluoreszkáló ép és a pirosan

fluoreszkáló degradálódott sejtek elkülönítését. A képeket Papp Csaba Gergő biológus Msc hallgató készítette.

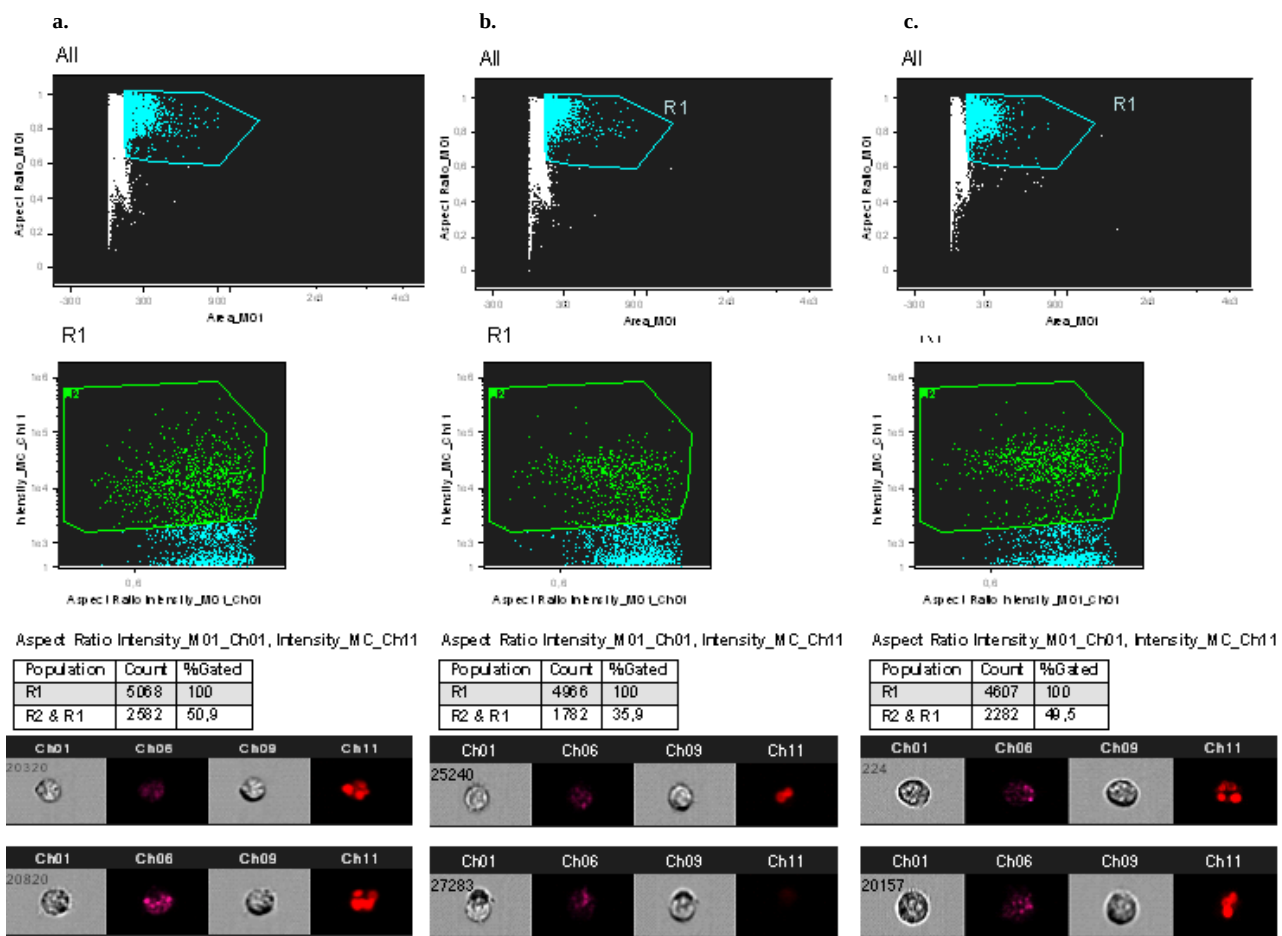
Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a makrofág sejtek mindegyike képes volt hatékonyan fagocitálni mindhárom faj sejtjeit. A festési technika alapján azt is megállapítottuk, hogy mindhárom faj esetében hatékony gombaölési mechanizmusok indulnak be, amelyek következtében a gombasejtek pusztulása figyelhető meg.

6.1.2. *C. parapsilosis sensu lato* csoportba tartozó *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis* fajok eltérő fagocitózis mérése J774.2 egér makrofágokon „Quantitative imaging” technika segítségével

A három gomba faj eltérő fagocitózisának mértékét egy új, az ún. „Quantitative imaging” technika alkalmazásával határoztuk meg. Ez az új technika az áramlási citometria statisztikai erejének és a fluoreszcens mikroszkópia részletgazdagságának házasítása, amelynek eredménye, hogy nagyszámú sejten vizsgálhatjuk a fagocitózis jelenségét. A technológia során minden vizsgált sejtről mikroszkópos felvétel készül, így mód van az egyes populációk vizualizálására, így például a valódi fagocitózis illetve a sejtfelszínhez történő adhézió elkülönítésére. A 4. ábrán látható eredmények elemzését a következő szempontok szerint hajtottuk végre. Az R1 mező a sejtméret alapján meghatározható makrofág populációt jelzi. Azokat a sejteket vettük figyelembe, amelyek területe viszonylag nagy és a két képzeletbeli tengelyük hányadosa közel 1 (ez a két paraméter határozza meg a nagyméretű egyedülálló sejteket). A makrofág populáció meghatározása után a tényleges fagocitózist mértük. Az R2 mező a gombát fagocitáló makrofágokat adja meg. Az előzetesen Alexafluor 647 fluoreszcens festékkel jelölt gomba sejteket a 11 csatornán (Ch11) mért piros fluoreszcens jel alapján detektálhatjuk. Ezzel a technikával minden sejtről készül mikroszkópos kép, ami lehetővé teszi a fagocitózis manuális ellenőrzését.

A statisztikai adatok alapján meghatározható a tényleges fagocitáló sejtek százalékos aránya. Megállapítottuk, hogy a sejtvonal mindhárom faj izolátumait képes bizonyos százalékban bekebelezni. A *C. parapsilosis*-szal inkubált J774.2 makrofág sejtek esetében az 50,9 %-os arány azokat a makrofágokat jelzi, amelyek legalább egy gomba sejtet fagocitálnak. A *C. orthopsilosis* 46,5 %-os, a *C. metapsilosis* 33,5 %-os fagocitózist indukált a sejteken. Ez az eredmény a mikroszkópos képek elemzésével is leellenőrizhető, a sejtekről készült felvételek alapján is látható, hogy a *C. metapsilosis* fertőzés esetén több olyan makrofág is található, amely nem mutat fagocitózist, nem látható a sejten belül az Alexafluor festékkel jelölt gombák piros fluoreszcens jele

(4. ábra).

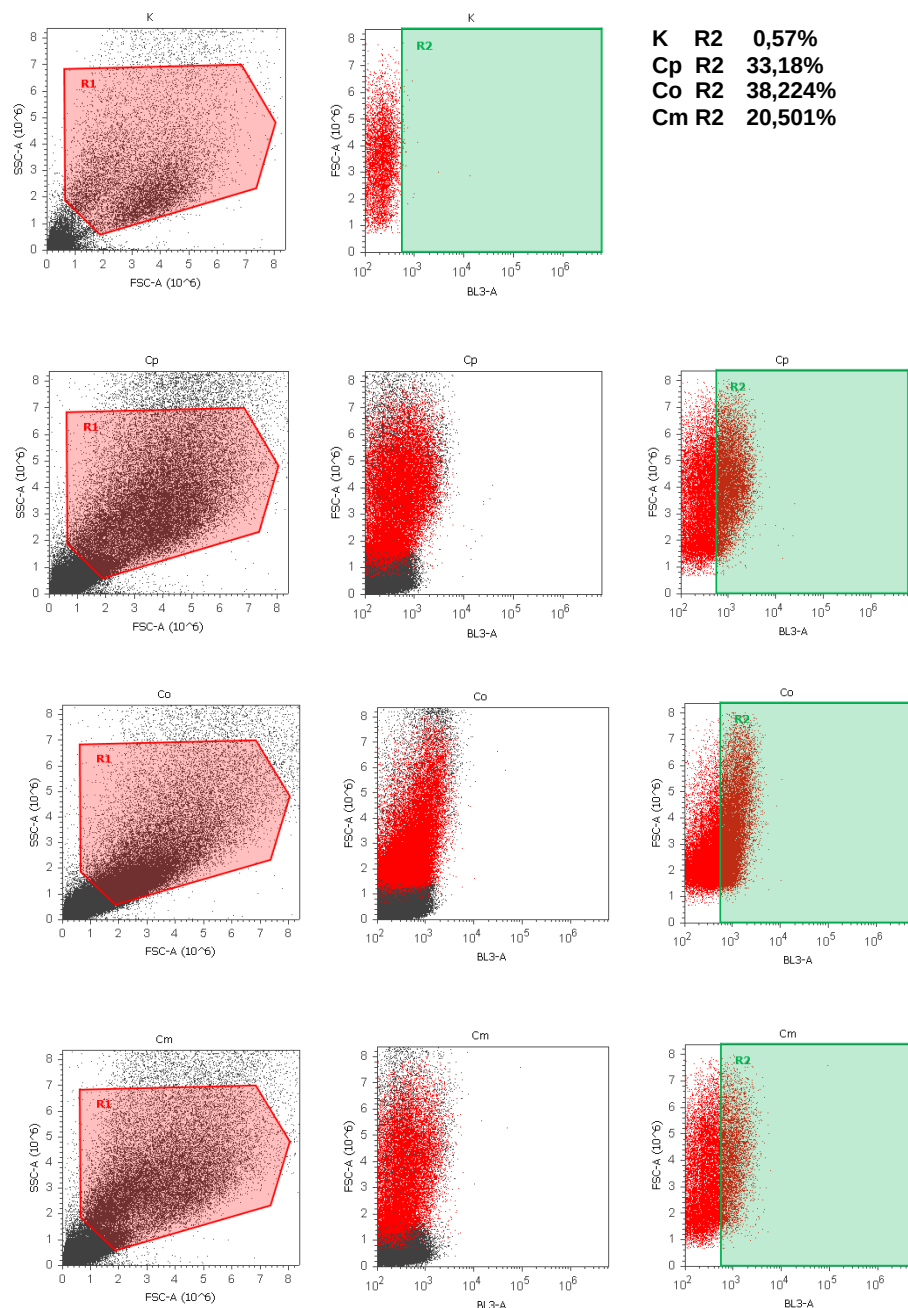


4. ábra. Quantitativ imaging. (a.) *C. parapsilosis*, (b.) *C. metapsilosis*, (c.) *C. orthopsilosis* indukált fagocitózis

6.1.3. *C. parapsilosis* sensu lato csoportba tartozó *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis* fajok eltérő fagocitózis mérése humán perifériális vér mononukleáris sejtekből (PBMC) differenciáltatott makrofágokon áramlási citometria alkalmazásával

A J774.2 egér makrofágokon végzett fagocitózis vizsgálatok lényeges eredményeket szolgáltatottak, azonban fontosnak tartottuk, hogy a gazda-patogén interakció teljesebb megismeréséhez a vizsgálatokat humán eredetű sejteken is elvégezzük. A kísérlethez humán perifériális vér mononukleáris sejtekből differenciáltatott sejteket használtunk. Az áramlási citometria használata során első lépésként a makrofág populációt határoztuk meg. A műszer információt ad a sejtmintákban áramló sejtek nagyságáról és granuláltságáról, ez alapján kijelölhető a makrofág populáció (R1). A mérés során Alexa 610 fluoreszcens festékkel jelölt gombákat használtunk. Az eredmények alapján megállapítottuk, hogy a *C. parapsilosis* és *C.*

orthopsilosis fajok estén közel azonos a gombát fagocitáló sejtek százalékos aránya, ez 33,18 % és 38,22 %, míg a *C. metapsilosis* fertőzés során mért arány jóval alacsonyabb volt: 20,5 % (5. ábra).

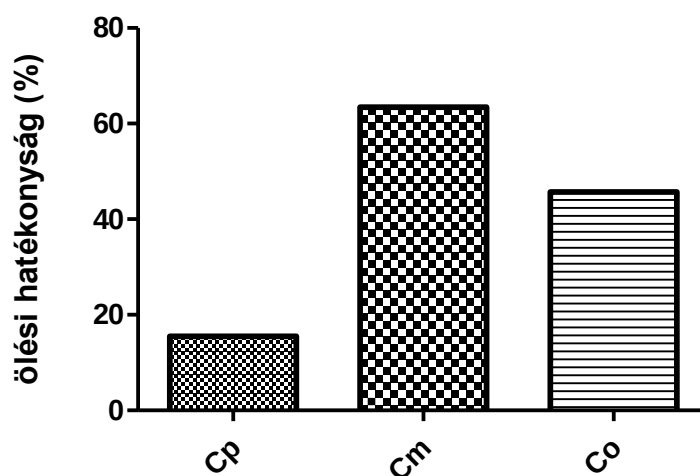


5. ábra. Áramlási citométerrel mért fagocitózis százalékos aránya a *C. parapsilosis sensu lato* csoporton belül. Kontroll: K (R2 0,57%), *C. parapsilosis*: Cp (R2 33,18%), *C. orthopsilosis*: Co (R2 38,224%), *C. metapsilosis*: Co (R2 20,501%)

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a *C. parapsilosis sensu lato* fajcsoport tagjai által kiváltott fagocitózis jelentősen eltér egymástól.

A humán eredetű sejtekkel folytatott munkánk során vérből szeparáltatott polimorfonukleáris (PMN) sejteket felhasználva ölési kísérletet végeztünk a *C. parapsilosis* csoport fajaival. Az ölési hatékonyság vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy a három gombafajt a humán PMN sejtek eltérő hatékonysággal képesek eliminálni. Az ölési hatékonyság a *C. metapsilosis*-szal történt stimulációnál mutatta a legnagyobb 63,44 %-os arányt, míg a *C. parapsilosis* és *C. orthopsilosis* fajoknál ez az érték jóval alacsonyabb volt, 15,50 % és 45,68 % (6.ábra).

Kísérleteink bizonyították, hogy a *C. parapsilosis* sejtek hatékonyabban képesek ellenállni az ölé mechanizmusoknak, mint a *C. metapsilosis* sejtek. A *C. parapsilosis* esetében a makrofágok fagocitózis hatékonysága a legnagyobb, de az ölési hatékonyságuk a legkisebb a három *Candida* faj összehasonlításában. A *C. metapsilosis* esetében viszonylag alacsony fagocita aktivációt tapasztaltunk, azonban az ölési hatékonyság magasabb volt, mint a fajcsoport más tagjainál (ez igaz nem csupán PMN sejteknél, hanem primer makrofágok sőt dendritikus sejtek esetében is, a csoportunk más tagjai által végzett vizsgálatok alapján).



6.ábra. A *C. parapsilosis sensu lato* csoport fajaival szemben mutatott humán PMN sejtek ölé hatékonysága. (Cp) *C. parapsilosis* 15,50 %, (Cm) *C. metapsilosis* (63,44%), (Co) *C. orthopsilosis* 45,68%

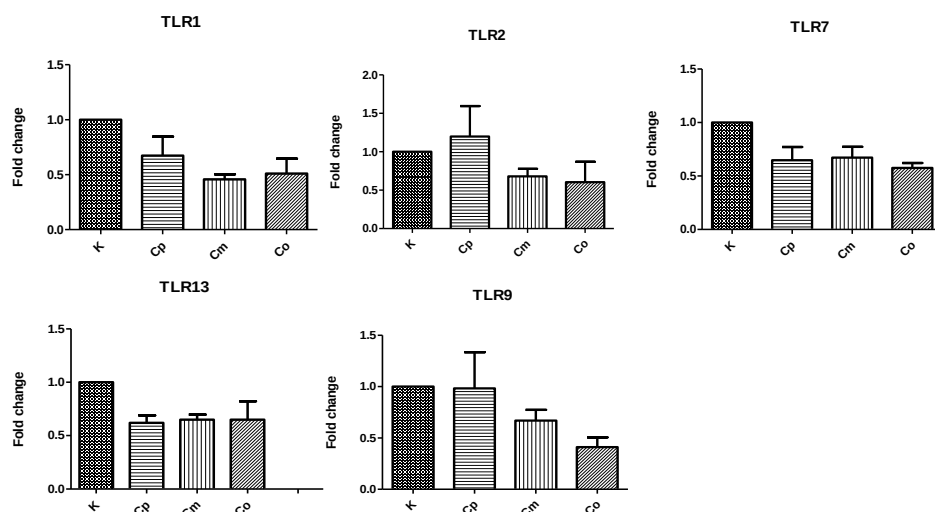
6.2. A *C. parapsilosis sensu lato* csoport által kiváltott természetes immunrendszer által történt felismerés vizsgálata J774.2 egér és humán makrofág sejtekkel

Munkák során további célul tűztük ki a *C. parapsilosis sensu lato* csoport tagjai által kiváltott természetes immunválasz, ezen belül a felismerés folyamatának vizsgálatát. A fagocitózis és ölés hatékonyság kísérletek mutatják, hogy a természetes immunrendszer képes felismerni a vizsgált izolátumokat. A további kísérleteinkben a felismerésben szerepet játszó Toll-like és C-típusú lectin (Dectin 1, Dectin 2) receptorok mRNS szintjének változását mértük valós idejű real-time módszerrel használva.

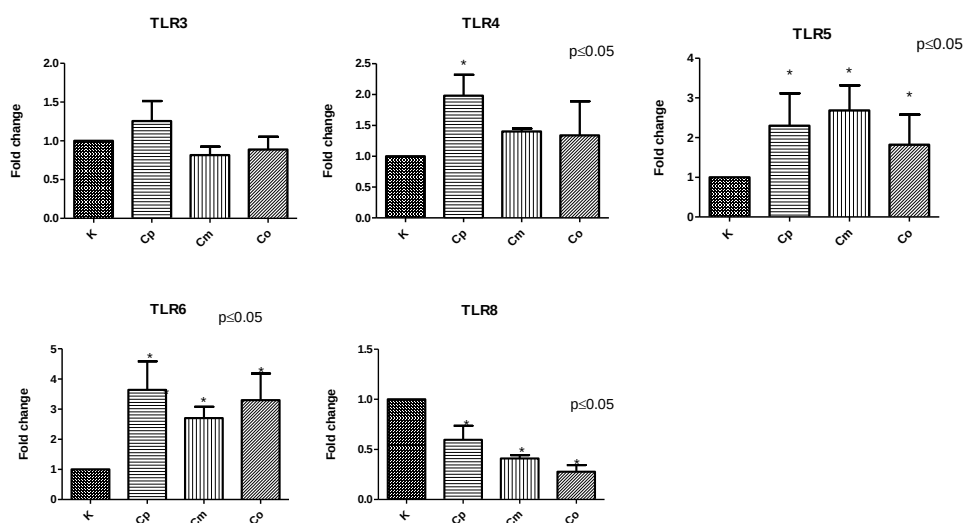
6.2.1. Egér Toll-like receptorok mRNS expressziójának real-time PCR analízise

Első lépésben az emlős modell rendszerként szolgáló J774.2 makrofág sejtek Toll-like receptorainak mRNS expresszió változását néztük a három *Candida* fajjal történt fertőzés hatására. A kísérlet adatai három párhuzamos fertőzéstől származnak. A fertőzések inkubációs ideje 12 óra volt. Az analízis során elsőként a kontrol mintához viszonyított változást figyeltük, majd összehasonlítottuk a *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* és *C. orhopsilosis* által stimulált receptorok mRNS szint különbségeit. Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy az egér TLR receptorok közül a TLR1, TLR2, TLR7, TLR9 és TLR13-nál nem találtunk növekedést mRNS expresszióban (7. ábra).

A további felismerő receptorok közül a TLR3, TLR4, TLR5, TLR6 esetében találtunk különbségeket. Összehasonlítva a három gomba fajt a *C. parapsilosis* stimulus hatására találtunk növekedést a TLR3 mRNS expresszió szintben. Ugyan ez elmondható a TLR4 esetében is. A TLR5 és TLR6 mRNS expresszió analízise során mind a három gomba faj hatására növekedést figyeltünk meg ($p < 0,05$). A TLR8 receptor mRNS szintje a fertőzés után a kontrolhoz képest csökkent (8. ábra).



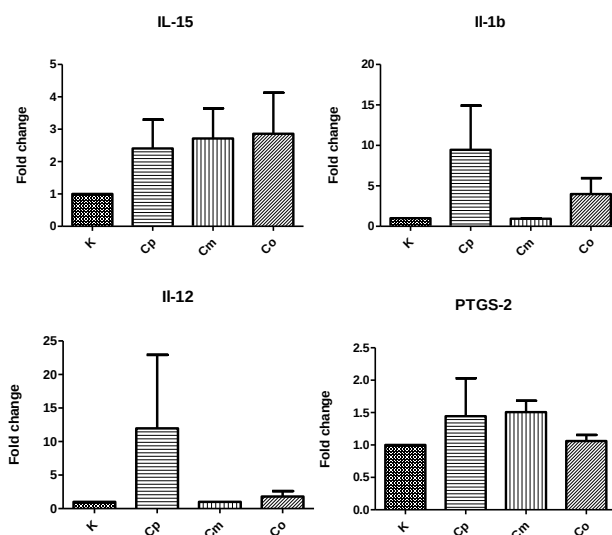
7.ábra. J774.2 egér TLR1, TLR2, TLR7, TLR9, TLR13 mRNS expresszió szintje (12óra)



8. ábra. J774.2 egér TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR8 mRNS expresszió szintje (12óra)

6.2.2. Citokinek mRNS expressziójának real-time analízise J774.2 egér makrofágokon *C. parapsilosis sensu lato* csoport összehasonlításában

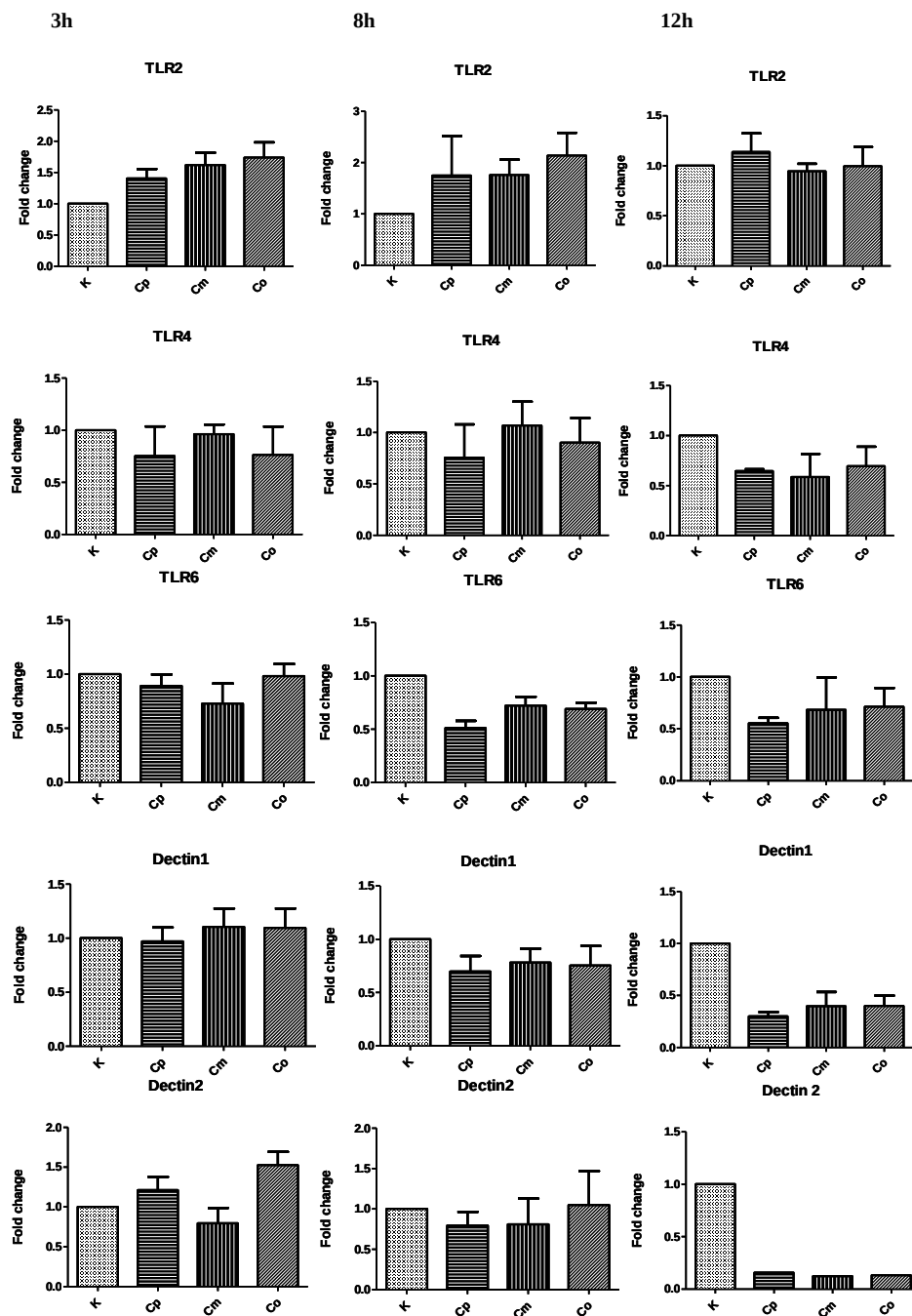
A patogén felismerésben szerepet játszó receptorok aktiválódásuk során indukálják a citokin produkciót, így munkánk során néhány citokin gén expressziós vizsgálatát is elvégeztük. Ezek: az interleukin 15 (IL-15), interleukin 1 β (IL-1 β) és az interleukin 12 (IL-12). Az interleukin 15, egy fontos fagocita aktiváló citokin, amelynek jelentőségét többek között *Candida* fertőzések során is kimutatták, a három gomba fajjal végzett fertőzés hatására expressziós szinten emelkedést mutatott. Emellett a gyulladásos citokinek, mint az IL-1 és az IL-12 expressziós szintjében is tapasztaltunk emelkedést. A teljes citokin profil felállításához további vizsgálatokat tervezünk. Az ábrán látható, hogy a PTGS2 mRNS analízisét is elvégeztük. Csoportunk egyik érdeklődési területe a szekretált lipáz enzimek működése, ezért különösen érdekes a bioaktív lipidek bioszintézisében szerepet játszó PTGS2 gén (ciklo-oxigenáz 2 (COX2)). E gén vizsgálatakor a *C. parapsilosis* és *C. metapsilosis* fertőzés hatására találtunk különbséget az expresszióban (9. ábra).



9. ábra. Az IL-15, IL-1 β , IL-12 citokin gén és a PTGS2 gén expressziós analízise

6.2.3. Humán Toll-like és C-típusú lectin receptorok mRNA expressziójának real-time PCR analízise

Fontosnak tartottuk a felismerési folyamatok vizsgálatát humán sejteket alkalmazó modellrendszerekben is. Az expressziós szint részletesebb vizsgálatához 3 egymástól független ún. biológiai párhuzamost alkalmazva 3, 8 és 12 órás fertőzéseket végeztünk humán makrofág sejteken. A különböző inkubációs idő segítségével összehasonlítható a makrofág sejtek receptorainak mRNA expressziójának változása az idő függvényében. Az analízist a TLR2, TLR4, TLR6, valamint a Dectin 1 és Dectin 2 receptrokkal végeztük el. A 3 órás inkubáció során a kontrolhoz képest a TLR2 mutatott mRNA szinten növekedést, valamint a Dectin 2 receptor differenciáltan mutatott emelkedést a három gombafaj esetében. A TLR4, TLR6 és Dectin 1 receptor nem mutatott különbséget. A 8 órás inkubációból származó TLR2 adatok ugyanúgy emelkedést mutatnak, emellett a korábban megfigyelt Dectin 2 mRNA mennyiség változás ebben az időpontban már nem tapasztalható. A TLR4, TLR6, Dectin 1 receptorok nem mutatnak eltérést. A 12 órás inkubáció esetén egyik receptornál sem figyeltünk meg szignifikáns változást (10. ábra). Az eredményeink alapján elmondható, hogy 12 óra elteltével a felismerési folyamata már megtörtént, így az érzékelést végző receptorok mRNA szinten történő szignifikáns változása sem valószínű.

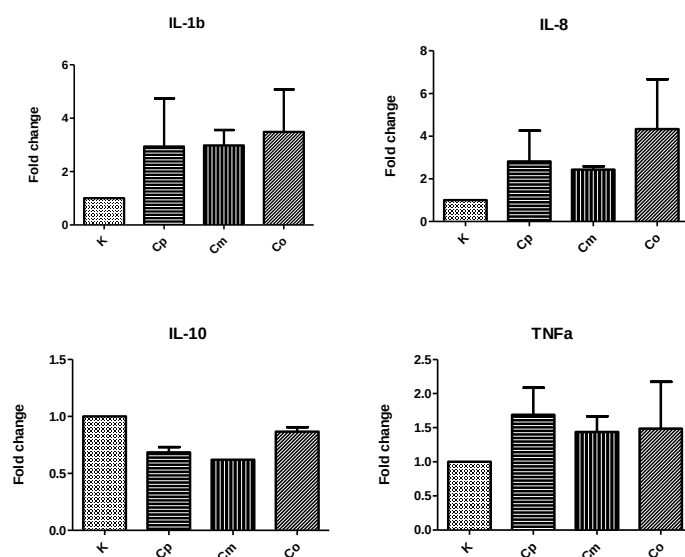


10. ábra. TLR2, TLR4, TLR6, Dectin1, Dectin2 receptorok mRNA szint vizsgálata

6.2.4 Citokinek mRNA expressziójának real-time analízise humán makrofág sejtekben

A humán makrofág sejteken is megvizsgáltuk a citokin profilt mRNA szinten. A citokin vizsgálatokhoz 12 órás fertőzésből származó mintákkal végeztük el a méréseket. Megállapítottuk, hogy az általunk vizsgált három *Candida* izolátum mindegyike indukál gyulladásserkentő

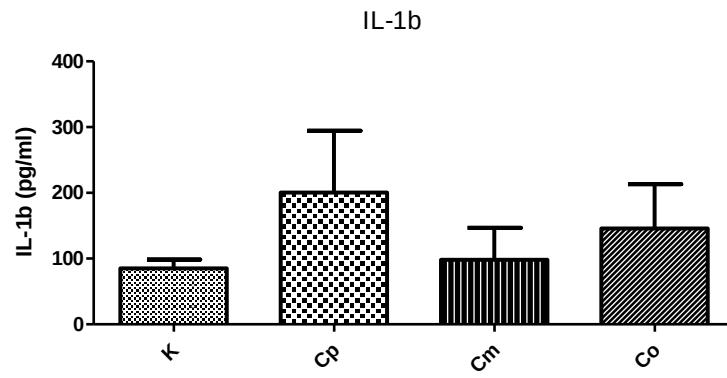
citokineket, mint az IL-1 β , IL-8 és a TNF α , azonban a három patogén gomba között nem tudtunk mRNS szinten különbséget kimutatni (11. ábra). Ez azonban nem jelenti feltétlenül azt, hogy fehérje szinten nincs közöttük különbség.



11. ábra. Humán makrofág sejtek citokin expressziójának analízise

6.3. A *C. parapsilosis sensu lato* csoport által indukált IL-1 β citokin termelés vizsgálata ELISA módszerrel

A továbbiakban a humán sejtek IL-1 β citokin termelését vizsgáltuk szendvics ELISA módszerrel. A méréshez humán PBMC sejtek felülszójából származó mintákat használtunk fel. A 24 órás fertőzés során jelentősen alacsonyabb mennyiségű gombával (10^5 / 100 μ l) stimuláltuk a sejteket. A *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* és *C. orthopsilosis* fajok által indukált humán sejtek által termelt IL-1 β gyulladásos citokin koncentrációjában különbség látható a három gomba fajt összehasonlítva: *C. parapsilosis* indukált szekréció 200.4 pg/ml, a *C. orthopsilosis* 146 pg/ml. A *C. metapsilosis*-ról elmondható, hogy ugyanúgy, ahogy a fagocitózist is kisebb mértékben indukálta, a hatására szekretált IL-1 β koncentrációja is alacsonyabb, 98.21 pg/ml volt. Vizsgálataink a citokin-profil felállításához még most is folynak. Az eredményeinket a 12. ábra mutatja.



12. ábra. IL-1 β citokin produkció vizsgálata ELISA módszerrel

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során a gazda-patogén interakciót vizsgáltuk a *Candida parapsilosis sensu lato* fajcsoport tagjait összehasonlítva. Csoportunk korábbi eredményei alapján tudjuk, hogy a *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* és a *C. metapsilosis* fajok virulenciájában jelentős eltérések figyelhetők meg. Ez a három faj különösen hasznos modellrendszer lehet a patogenitás kialakulásának vizsgálatára és segíthet megérteni, hogy a közel rokon fajok hogyan okozhatnak megbetegedéseket, illetve, hogy az immunrendszer hogyan ismeri fel a filogenetikailag közelálló, azonban virulenciájában különböző fajokat.

Vizsgálatainkat J774.2 egér és humán sejteken végeztük el, hogy megfigyeljük a fagocitózis és ölés hatékonyságát a három fajjal szemben. A fagocitózis kísérletek áramlási citometriával mért adatai alapján megállapítottuk, hogy a három faj közül a *C. parapsilosis* és *C. orthopsilosis* fajokat közel azonos mértékben képesek az egér és a humán sejtek fagocitálni, míg a *C. metapsilosis* indukált fagocitózis a másik két fajhoz képest alacsonyabb értékeket mutatott. A humán vérből izolált polimorfonukleáris (PMN) sejteken végzett ölési hatékonyság elemzése során azt tapasztaltuk, hogy a *C. parapsilosis* jobban ellenállt az ölési mechanizmusoknak, míg a *C. metapsilosis* esetén a gazda mikrobaölési hatékonysága nagyobb volt. A *C. metapsilosis*-szal szemben megfigyelt kisebb mértékű fagocitózis magyarázatául szolgálhat, hogy ez a faj a *C. parapsilosis*-hoz és *C. orthopsilosis*-hoz képest kevésbé stimulálja az immunrendszert. A már bekebelezett *C. metapsilosis* sejteket azonban a fagociták nagyobb hatékonysággal képesek eliminálni, ami a gomba gyengébb ellenálló képességével lehet összefüggésben. Ez a klinikai adatoknak is megfelel, miszerint ez a faj ritkán, ezzel szemben a *C. orthopsilosis* és a *C. parapsilosis* fajok gyakrabban okoznak nozokómiális megbetegedéseket. Ennek egyik oka lehet, hogy ez az utóbbi két faj jobban alkalmazkodott az emberhez, mint élettérhez.

Kutatásunk során a gomba kórokozók felismerésében szerepet játszó mintázat-felismerő receptorok mRNS expressziós változását mértük különböző időpontokban valós idejű PCR módszer segítségével J774.2 egér és humán makrofágokon. A méréseink során a TLR4, TLR5, TLR6 receptoroknál találtunk változást mRNS szinten, illetve a Dectin 2 receptor mRNS expressziójában találtunk differenciált növekedést. Az mRNS szinten kapott adatok a minőségi változások követésére szolgálnak, trendeket, irányvonalakat nyújtanak a további kutatásokhoz. Miután a különböző felismerő funkciók elemzését első sorban azok kiiktatásával lehet vizsgálni, receptorblokkolókkal történő kutatásokat tervezünk.

A továbbiakban a három gombafaj által indukált citokin-profil is vizsgáltuk. Az IL-1 β , IL-6, IL-8

és TNF- α gyulladásos citokin gének expresszióját szintén valósídejű PCR módszerrel mértük. Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy mind a három gomba indukál gyulladásos citokineket, azonban a fajok között nem tudtunk mRNS szinten különbséget kimutatni. Az enzim-kötött immunoszorbens próba (ELISA) alkalmazásával a szekretált IL-1 β citokin koncentrációjában, azaz fehérje szinten a különbségek látszanak a három faj között. A *C. parapsilosis* fertőzés hatására nagyobb koncentrációjú IL-1 β szekretálódott, a *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* alacsonyabb értékeket mutatott, ezért további citokinek mérését tervezzük, amely a funkcionális immunválasz monitorozására szolgálhat.

8. IRODALOM

1. Trofa D, Gacser A., Nosanchuk JD (2008) *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. Clin Microbiol Rev 21: 606–625.
2. Gácser A, Schäfer W, Nosanchuk JS, Salomon S, Nosanchuk JD. Virulence of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in reconstituted human tissue models. Fungal Genet Biol. 2007 Dec; 44 (12): 1336-41. Epub 2007 Feb 21.
3. Giek Far Chan*; Nor Zurairah Hasan; Sivaranjini Sinniah Real-Time PCR Assay for Detection of *Candida parapsilosis* and *Candida orthopsilosis*. The Journal of Bioscience and Medicine 2, 1 (2012)
4. Xiaobo Feng, Bo Ling, Guimei Yang, Xia Yu , Daming Ren , Zhirong Yao Prevalence and Distribution Profiles of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* Responsible for Superficial Candidiasis in a Chinese University Hospital
5. Stefanie Salvenmoser, Marc J. Seidler, Alexander Dalpke, Frank-Michael C. Müller, Effects of caspofungin, *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* on toll-like receptor 9 of GM-CSF-stimulated PMNs, FEMS Immunol Med Microbiol 60 (2010) 74–77
6. Tavanti A, Davidson AD, Gow NA, Maiden MC, Odds FC.: *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. J Clin Microbiol. 2005 Jan; 43 (1): 284-92.
7. I. Varga, G. Sóczó, G. Kardos, Á. Borbély, Zs. Szabó, Á. Kemény-Beke, L. Majoros, Comparison of killing activity of caspofungin against *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy doi:10.1093/jac/dkn403 Advance Access publication 28 September 2008
8. Mihai G. Netea, Gordon D. Brown, Bart Jan Kullberg, Neil A. R. Gow, An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system, Nature, Microbiology 2008

9. Gordon D. Brown, Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes, *Annu. Rev. Immunol.* 2011. 29:1-21
10. Shizo Akira, Satoshi Uematsu, Osamu Takeuchi, Pathogen recognition and innate immunity, *Cell* 124, 783-801, February 24, 2006, Elsevier Inc.
11. Ruth A. Peczyk, Elizabeth B. Fraser-Smith, Thomas R. Matthews, Efficacy of interleukin-1 α against systemic *Candida albicans* infections in normal and immunosuppressed mice, *Infection and Immunity*, Oct. 1989.
12. B. Jan Kullberg, Mihai G. Netea, Jo H. J. Curfs, Monique Keuter, Jacques F. G. M. Meis, Jos W. M. van der Meer, Recombinant murine granulocyte colony-stimulating factor protects against acute disseminated *Candida albicans* infection in nonneutropenic mice, *The Journal of Infectious Diseases* 1988;177;175;-81
13. K. Kiehne, G. Brunke, D. Meyer, J. Harder, K. H. Herzig, Oesophageal defensin expression during *Candida* infection and reflux disease
14. Elisabetta Blasi, Anna Mucci, Rachele Neglia, Francesco Pezzini, Bruna Colombari, Danuta Radzioch, Andrea Cossarizza, Enrico Lugli, Gianfranco Volpini, Giuseppe Del Giudice, Samuele Peppoloni, Biological importance of the two Toll-like receptors, TLR2 and TLR4, in macrophage response to infection with *Candida albicans* *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 44 (2005) 69–79
15. Chantal A., A. van der Graaf, Mihai G. Netea, Ineke Verschuere, Jos W. M. van der Meer, and Bart Jan Kullberg Differential Cytokine Production and Toll-Like Receptor Signaling Pathways by *Candida albicans* Blastospores and Hyphae, *Infection and Immunity*, Nov. 2005, p. 7458–7464
16. Hongnga T. Le, Vuvi G. Tran, Wonyoung Kim, Juyang, Kim, Hong R. Cho and Byungsuk Kwon, IL-33 Priming Regulates Multiple Steps of the Neutrophil-Mediated Anti- *Candida albicans* Response by Modulating TLR and Dectin-1 Signals *J Immunol* 2012; 189:287-295

17. Gácsér A, Trofa D, Schäfer W, Nosanchuk JD. Targeted gene deletion in *Candida parapsilosis* demonstrates the role of secreted lipase in virulence. J Clin Invest. 2007 Oct; 117 (10): 3049-58.
18. Tavanti A, Davidson AD, Gow NA, Maiden MC, Odds FC.: *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. J Clin Microbiol. 2005 Jan; 43 (1): 284-92.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Első sorban szeretnék köszönetet nyilvánítani témavezetőmnek Dr. Gácsér Attila tudományos főmunkatársnak, hogy munkámat irányította és tudásával nélkülözhetetlen segítséget nyújtott dolgozatom elkészítéséhez.

Hálás vagyok Prof. Dr. Vágvölgyi Csaba tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy lehetőséget biztosított számomra, hogy kutatómunkámat a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi karának Mikrobiológiai Tanszékén végezhetem.

Külön köszönettel tartozom Tóth Adél Phd hallgatónak, aki megtanított a laboratóriumi módszerek alkalmazására, és hogy tanácsaival, útmutatásával, türelmével és folyamatos biztatásával segítette a munkám, hozzájárulva a dolgozatom elkészüléséhez.

Továbbá szeretném megköszönni csoportunk tagjaink: Dr. Hamari Zsuzsannának, Németh Tibornak, Grózer Zsuzsannának, Szenzenstein Juditnak, Horváth Péternek, Tóth Renátának, Antonio Pérez Garcíanak és Papp Csaba Gergőnek az inspiráló társaságukat és hogy segítettek a munkám során.

10. FÜGGELÉK

10.1. Kvantitatív valós idejű PCR (qRT-PCR) mérések során használt primerek:

Név		Oligonukleotid	Min. mennyiség	
<u>Mm dectin1</u>	<u>ReTi frw</u>	5' - AACCACAAGCCCACAGAATC - 3'	0,025	
	<u>ReTi rev</u>	5'- TAGTTTGGGATGCCTTGGAG -3'	0,025	
<u>Mm dectin2</u>	<u>ReTi frw</u>	5'- CCATGAACCCAATCTTCCAG -3'	0,025	
	<u>ReTi rev</u>	5'- CCATTTCGAAGGATTCCAGT -3'	0,025	
<u>Mm TLR1</u>	<u>ReTi frw</u>	5'- GAAAAAGAAGACCCCGAATCTC -3'	0,025	
	<u>ReTi rev</u>	5'- GACGGGAAAACAATATGCAGAG -3'	0,025	
<u>Mm TLR2</u>	<u>ReTi frw</u>	5'- ATGTGATGCTTCTGGGGTGT -3'	0,025	
	<u>ReTi rev</u>	5'- GAGTCCGGAGGGAATAGAGG -3'	0,025	
<u>Mm TLR3</u>	<u>ReTi frw</u>	5'- TTAATTTCTGAAGGGGCTGT -3'	0,025	
	<u>ReTi rev</u>	5'- TTCATCTAAGCCGTTGGACTCT -3'	0,025	
<u>Mm TLR4</u>	<u>ReTi frw</u>	5'- ATGCACTGAGCTTTAGTGGTTG -3'	0,025	
	<u>ReTi rev</u>	5'- AGTGTCTCAGGCTGTTTGTTC -3'	0,025	
<u>Mm TLR5</u>	<u>ReTi frw</u>	5'- GACAAGGTCTGGAGTTTGGAAAC -3'	0,025	
	<u>ReTi rev</u>	5'- TTTGCTGCTGAAGCAGAAGTAG -3'	0,025	
<u>Mm TLR6</u>	<u>ReTi frw</u>	5'- CCTGACGAAGCTGACTTTCC -3'	0,025	
	<u>ReTi rev</u>	5'- CTGGGAGCAGATCCAGTTGT -3'	0,025	
<u>Mm TLR7</u>	<u>ReTi frw</u>	5'- CATCAACCACATACCAAGCATC -3'	0,025	
	<u>ReTi rev</u>	5'- GATTTCTTCCAGATGGTTCAGC -3'	0,025	
<u>Mm TLR8</u>	<u>ReTi frw</u>	5'- CAGGAAGACTTCAAAGGACTGG -3'	0,025	
	<u>ReTi rev</u>	5'- ACCTTGGACAGTTTCCACTCAG -3'	0,025	
<u>Mm TLR9</u>	<u>ReTi frw</u>	5'- CAATGCCTTTCAGAACCTAACC -3'	0,025	
	<u>ReTi rev</u>	5'- CTTCTTGCGGTAATTGAAGGAC -3'	0,025	
<u>Mm TLR11</u>	<u>ReTi frw</u>	5'- AGATTCTTCCCACAACAGCTTC -3'	0,025	
	<u>ReTi rev</u>	5'- GCATAGCTGTTTTACACCAGA -3'	0,025	
<u>Mm TLR12</u>	<u>ReTi frw</u>	5'- TTCCAAGCTATCCTTTCTTGCT -3'	0,025	
	<u>ReTi rev</u>	5'- CAACTTCCAAGGTCTGTGTCAG -3'	0,025	
<u>Mm TLR13</u>	<u>ReTi frw</u>	5'- GGTGTGAACCTGGATGCCTAAG -3'	0,025	
	<u>ReTi rev</u>	5'- CTGTAGAGATGGCACAAGCTG -3'	0,025	
<u>Mm IL-1b</u>	<u>ReTi frw</u>	5'- AACATGCACACGGACACAGACG -3'	0,025	
	<u>ReTi rev</u>	5'-ATTGCTTGGGATCCACACTCTGC -3'	0,025	
<u>Mm IL-12b</u>	<u>ReTi frw</u>	5'- ACTGGGACCAGGGCCCTATTATG -3'	0,025	
	<u>ReTi rev</u>	5'- TACGCAGCCCTGATTGAAGAGC -3'	0,025	
<u>Mm IL-15</u>	<u>ReTi frw</u>	5'-ATAACCAGCCTACAGGAGGCCAAG-3'	0,025	
	<u>ReTi rev</u>	5'-AGATGAGCTGGCTATGGCGATG-3'	0,025	
<u>Mm PTGS2</u>	<u>ReTi frw</u>	5'-AGCCAGGCAGCAAATCCTTG-3'	0,025	
	<u>ReTi rev</u>	5'-ACTGGTCAAATCCTGTGCTCATAC-3'	0,025	

Név		Oligonukleotid	Min. mennyiség	
<u>HS TLR1</u>	<u>ReTi frw</u>	5' – GCCACCCTACTGTGAACCTC – 3'	0,025	
	<u>ReTi rev</u>	5' – ATATAGGCAGGGCATCAAATG – 3'	0,025	
<u>HS TLR2</u>	<u>ReTi frw</u>	5' – GTGTCGGAATGTCACAGGAC – 3'	0,025	
	<u>ReTi rev</u>	5' – AGGATCAGCAGGAACAGAGC – 3'	0,025	
<u>HS TLR3</u>	<u>ReTi frw</u>	5' – ACATCCCTGAGCTGTCAAGC – 3'	0,025	
	<u>ReTi rev</u>	5' – CACTGGGAACCCATGATAGTG – 3'	0,025	
<u>HS TLR4</u>	<u>ReTi frw</u>	5' – TACCTGGAGTGGGAGGACAG – 3'	0,025	
	<u>ReTi rev</u>	5' – CAGGGCTTTTCTGAGTCGTC – 3'	0,025	
<u>HS TLR5</u>	<u>ReTi frw</u>	5' – AGGGCAGGTGCTTATCTGAC – 3'	0,025	
	<u>ReTi rev</u>	5' – TACTGGGACAAGGACCCAAC – 3'	0,025	
<u>HS TLR6</u>	<u>ReTi frw</u>	5' – ATGGGACTTTTCTGGTTGTCTTAG – 3'	0,025	
	<u>ReTi rev</u>	5' – AGTTACTGTCTTTCGTCAGCTTTG – 3'	0,025	
<u>HS TLR7</u>	<u>ReTi frw</u>	5' – TCCTTACCTGGCCACAGATG – 3'	0,025	
	<u>ReTi rev</u>	5' – AGATCACACTTTGGCCCTTG – 3'	0,025	
<u>HS TLR8</u>	<u>ReTi frw</u>	5' – TCCTTCAGTCGTCAATGCTG – 3'	0,025	
	<u>ReTi rev</u>	5' – GGCGCATAACTCACAGGAAC – 3'	0,025	
<u>HS TLR9</u>	<u>ReTi frw</u>	5' – GGCTTGGTAGAGGACAGGTG – 3'	0,025	
	<u>ReTi rev</u>	5' – TCTTTCCACTCCCCTCTCAG – 3'	0,025	
<u>HS TLR10</u>	<u>ReTi frw</u>	5' – CTGTGGCCTTCTGCTGTCTC – 3'	0,025	
	<u>ReTi rev</u>	5' – TGTGCATTGACCTAGCATCC – 3'	0,025	
<u>HS IL-6</u>	<u>ReTi frw</u>	5' – TGTGCATTGACCTAGCATCC – 3'	0,025	
	<u>ReTi frw</u>	5' – TGCGCAGCTTTAAGGAGTTC – 3'	0,025	
<u>HS DECTIN1</u>	<u>ReTi frw</u>	5' – GCCCACATGATTTGACTCAG – 3'	0,025	
	<u>ReTi rev</u>	5' – TTTTCTTTCTGCTCCTGAGATG – 3'	0,025	
<u>HS TNFalfa</u>	<u>ReTi frw</u>	5' – CACAGTGGATGCTGGCAC – 3'	0,025	
	<u>ReTi rev</u>	5' – GTAGGCCCCCAGTGAGTTCTG – 3'	0,025	
<u>HS IL-1b</u>	<u>ReTi frw</u>	5' – TTCCAGGAGAATGACCTGAG – 3'	0,025	
	<u>ReTi rev</u>	5' – TAAGCCTCGTTATCCCATGT – 3'	0,025	
<u>HS IL-8</u>	<u>ReTi frw</u>	5' – GCTCTGTGTGAAGGTGCATG – 3'	0,025	
	<u>ReTi rev</u>	5' – GGGTGGAAAGGTTTGGAGT – 3'	0,025	
<u>HS IL-8</u>	<u>ReTi frw</u>	5' – TTAAGGGTTACCTGGGTTGC – 3'	0,025	
	<u>ReTi rev</u>	5' – GGTCTTGGTTCTCAGCTTGG – 3'	0,025	

11. NYILATKOZAT

"Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez"

Alulírott, Csonka Katalin aláírással igazolom, hogy a dolgozatban leírt adatok a saját eredményeim és csak az Irodalomban felsorolt anyagokat használtam fel.

A dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a:

- a polimorfonukleáris sejtek (PMN), mononukleáris sejtek (PBMC) izolálását humán perifériás vérből,- a makrofágok differenciálását humán perifériás vérből származó monocitákból,
 - az egér és humán sejtek fertőzését,
 - a totál RNS izolálást,
 - a cDNS szintézist,
 - a kvantitatív valós idejű PCR (qRT-PCR) reakciót,
 - az enzim-kötött immunoszorbens próbával (ELSIA) történő méréseket,
 - a polimorfonukleáris sejtek ölési hatékonyságának meghatározását,
 - a statisztikai számításokat a GraphPad PRISM 5 szoftverrel,
- végeztem el.

Az áramlási citometriát alkalmazó gépeken (klasszikus áramlási citometria Attune® készülékkel, kvantitatív imaging FlowSight készülékkel) történő mérések Tóth Adél Phd. hallgató segítségével történtek.

.....
aláírás

Szeged, 2012. november 6.

