

Gradu Amaierako Lana
Bioteknologia Gradua

***Candida albicans*-en presentzian gibel sinusoideko endotelio zeluletan aktibatzen diren seinalizazio bideen azterketa**

Egilea:
Nahia Cazalis Bereicua
Ko-zuzendariak:
Aitziber Antorán Díaz
Andoni Ramírez García

© 2023, Nahia Cazalis Bereicua

AURKIBIDEA

AURKIBIDEA	i
LABURPENA.....	1
1. SARRERA	1
1.1. <i>Candida albicans</i> , ONDDO OPORTUNISTA	1
1. 2. GIBELAREN FUNTZIOA PATOGENOEN AURREAN	2
1. 3. <i>C. albicans</i> ONDDOAK AKTIBATURIKO SEINALIZAZIO BIDEAK.....	3
2. HIPOTESIAK ETA HELBURUAK.....	4
3. MATERIALAK ETA METODOAK.....	5
3.1. ZELULEN HAZKUNTZA ETA MANTENUA.....	5
3.2. <i>Candida albicans</i> ONDDOAREN HAZKUNTZA.....	5
3.3. RNA ERAUZKETA SEKUENTZIAZIO ANALISIRAKO.....	6
3.4. RNA SEKUENTZIAZIOA ETA DATUEN ANALISIA.....	6
3.5. RNA ERAUZKETA ETA DENBORA ERREALEKO PCR KUANTITATIBOA (RT-qPCR).....	6
3.6. SEINALIZAZIO BIDEEN INHIBIZIOA.....	7
3. 7. ANALISI ESTADISTIKOA	8
4. EMAITZAK	9
4.1. <i>C. albicans</i> -en ERAGINA LSEC-en TRANSKRIPTOMAN.....	9
4.2. <i>C. albicans</i> -en EZAGUTZAN LSEC-en Syk ETA MyD88 MOLEKULEK PARTE HARTZEN DUTE.....	9
4.3. <i>C. albicans</i> -ek MAPK/ERK ETA c-Fos-en BIDEZKO SEINALIZAZIO BIDEA AKTIBATZEN DU LSEC-etan	10
5. EZTABAIDA	13
6. ONDORIOAK.....	16
7. ESKER ONAK.....	17

8. BIBLIOGRAFIA..... 17

8. ERANSKINAK..... 21

LABURPENA

Candida albicans mikrobiotaren parte den onddo komentsala da, baina egoera zehatz batzuk ematean, disbiosia edo immunoezabaketa kasu, kandidiasia sor dezake. Infekzio sistemikoa gertatzean *C. albicans* odolean zehar banatzen da, hilkortasun tasa altuak eraginez. Horrekin lotuta, jakina da gibela odolaren garbitzaile nagusienetakoa dela, eta gibel sinusoideko endotelio zelulak (LSEC, *liver sinusoidal endothelial cell*) patogenoekin lehenengo kontaktua izango direla. Horregatik, lan honen helburua LSEC eta *C. albicans*-en arteko kontaktua ematean LSEC-etan jarraitzen den seinalizazio bidea deskribatzea da. Horretarako, LSEC-ak eta onddoa kontaktuan jarri ostean, transkriptoma eta seinalizazio bidean parte hartzen duten geneen adierazpen mailak aztertu ziren, gakoak diren proteinen inhibitzaileak erabiliz. Lortutako emaitzek ezagupena TLR eta CLR bidez ematen dela adierazten dute, eta ondoren seinalizazio bideen bitartez MAPK ERK eta c-Fos/AP-1 aktibatzen direla. Aktibazioen eraginei dagokionez, onddoak hantura zitokinen, gainazaleko molekula zehatzen eta proliferazioarekin loturiko geneen gainadierazpena dakarrela behatu da, LSEC-en defentsa-mekanismoarekin lotuta egon daitezkeenak. Nahiz eta lan honetan seinalizazio bidean parte hartzen duten molekula batzuk deskribatu diren, oraindik analisi sakonagoak egin behar dira, aktibazio zein proteina-gako asko deskribatzeke baitaude.

1. SARRERA

1.1. *Candida albicans*, ONDDO OPORTUNISTA

Candida albicans giza mikrobiotaren parte den onddo oportunistak da, aho, azal, heste eta genitaletan agertu ohi dena. Egiturari dagokionez, polimorfikoa da, inguruko faktoreen arabera hainbat morfologia ezberdin aurkeztu baititzake (Gow eta Yadav, 2017), legamia eta hifa formak infekziorako garrantzitsuenak izanik. Legamia-hifa trantsizioan aldaketa bortitzak ematen dira gene mailan, zelula paretaren egiturari, eta adierazten diren birulentzia faktoreetan (Chen et al., 2020). Era berean, aldaketa horiek ostalariko zeluletan eragina izango dute, onddoaren paretan ezagutuko dituzten antigenoak desberdinak izango baitira. Orokorrean, legamia eran errazago migratzen duela ikusi da, eta hifa eran ehunak inbaditzen dituela (Thompson et al., 2011). Nahiz eta morfologia bakoitzak bere funtzio propioak izan, biak beharrezkoak dira birulentzia ziklo osoa aurrera eramateko, komentsalismo, inbasio, adaptazio eta immunitate-sistematik ihes egiteko gaitasunarekin lotu baitira (D'Enfert et al., 2021).

Immunitate-sistemako gorabeherak, hala nola immunoeskasia, mikrobiotaren aldaketa bortitzak, eta ehunen integritate-galerak gertatzean, komentsala eta ostalariaren arteko oreka galera eman daiteke eta *C. albicans*-ek inbasio prozesua has dezake. Ohiko hazkuntza guneetatik migratu eta gorputzean zehar banatzean kandidiasia sortuko du, nagusiki bi motatan sailka daitekeena: mukokutaneo eta sistemikoa. Lehenengoak gehienbat ahoan, baginan, eta esofagoan eragiten du. Bigarren motakoak, berriz, odoletik zabaldu eta gibel, bihotz, giltzurrun eta bareraino hel daiteke (Lopes eta Lionakis, 2022). Nahiz eta terapia antifungikoak eman gaixoei, kandidiasi sistemikoa (KS) % 40 inguruko hilkortasun-tasa altuekin loturik dago, beste onddo eta bakterioek eragindako sepsiak baino heriotza gehiago sorrarazten dituelarik (Talapko et al., 2021).

1. 2. GIBELAREN FUNTZIOA PATOGENOEN AURREAN

Gibela barne-organo handiena da, eta horren anatomia eta zelula populazioei esker odoletik datozen patogenoak ezagutu eta ezabatzeko gai da. Arteria (arteria hepatikoa) eta zainetatik (porta zaina) datorren odolaren elkargunea izanik, filtro natural gisa jokatu du heste zein zirkulazio-sistematik eratorritako partikulen aurrean. Bi norabideetatik datorren odola organora sartzean sinusoideetan zehar barneratzen da, alegia, kapilar motako hodietan zehar. Egitura baskular horiek odolaren abiadura jaisteko gai dira, eta odola geldiroago mugituko denez, patogeno eta endotelio zelulen arteko kontaktua gertatzea erraztuko da. Kontuan izanda odol-bolumen osoaren % 30 gibeletik pasatzen dela minuturo, KS kasuetan izan dezakeen parte hartzea kontuan hartu beharra dago. Izan ere, gibelak aurrera eramandako garbiketa ostean patogenoekin erlazionaturiko odoleko molekulen kontzentrazioa 100 aldiz jaisten dela zehaztu da (Jenne eta Kubes, 2013).

Gibel sinusoideko endotelio zelulak (LSEC, *liver sinusoidal endothelial cell*) sinusoideen parte dira, kapilarrak estaltzen baitituzte. Osatzen duten ehunaren alde batetik odolaren bitartez garraiatutako molekula eta antigenoekin kontaktuan egongo dira. Bestetik, gibela osatzen duten izar formako makrofago hepatiko (Kupffer zelulak) eta hepatozitoekin harremanean daude (Poisson et al., 2017).

Funtzio fisiologikoei dagokienez, hainbat prozesutan hartzen dute parte. Zirkulazio sistemarekin lehenengo kontaktua direnez, endozitosian eta odolaren garbiketean ezinbestekoak dira. Orokorrean, beste endotelio ehunetan ikusten den bezala, patogenoei asoziatutako patroi molekularrak (PAMP, *pathogen associated molecular pattern*) ezagutzeko hartzaile (PRR, *pattern recognition receptor*) mota desberdinak izaten dituzte. Hauek Toll bezalako hartzaileak

(TLR, *toll-like receptor*), NOD bezalako hartzaileak (NLR, *NOD-like receptor*) edo C-motako lektina hartzaileak (CLR, *C-type lectin receptor*) izan daitezke, beste batzuen artean (Wang eta Liu, 2021). Beste endotelio zelulekin alderatuta, gainazalean immunitate-sistemako zeluletan ohikoak diren hartzaileak izaten dituzte. CLR den L-SIGN, adibidez, zelula dendritikoetan adierazten den DC-SIGN-en homologoa da, momentura arte LSEC-etan soilik aurkitu dena (Cacicedo et al., 2020). Ezaugarri horrekin loturik, ohiko endotelioak baino gaitasun endozitiko altuagoak dituzte, haien *scavenger* hartzaileen, manosa hartzaileen (MR) eta estabilina-1,2 molekulen ugaritasuna dela eta. Garbiketa funtzioa Kupffer zelulek burutzen zutela uste zen, baina azken urteetan frogatu da horien eta LSEC-en arteko kooperazioa ematen dela. LSEC-ek klatrinak bideratutako endozitosiaren bitartez makromolekula eta nanopartikulak barneratuko dituzte. Kupffer zelulek, ordea, LSEC-ek barneratu ezin dituzten partikula handiagoak fagozitatuko dituzte (DeLeve eta Maretti-Mira, 2017).

Zirkulazio sistemako hondarren ezabatzeaz gain, LSEC-ek immunitate-sistemarekin ere lotura estua daukate. Hasteko, MHC I, MHC II eta molekula ko-estimulatzaileak adierazten dituztenez, antigeno erakusle gisa jardun dezakete (Wan et al., 2022). Aldi berean, ohikoak ez diren atxikidura molekulek (VAP1), zitokinei esker erakarritako leukozitoen atxikidura baimenduko dute, hauek infiltratu eta infekzioei amaiera ematen laguntzeko (Shetty et al., 2018). Laburbilduz, LSEC zelulak haien morfologia, funtzio eta kokapen bereziak direla eta, ezinbestekoak dira gibelaren homeostasia mantentzeko.

1. 3. *C. albicans* ONDDOAK AKTIBATURIKO SEINALIZAZIO BIDEAK

Patogenoen aurkako erantzunean garrantzitsuak diren hainbat zelula motatan *C. albicans*-en eragina aztertu da, hain zuzen ere, kontaktua ematean aktibatzen diren seinalizazio bideak deskribatu dira. Horien artean, ahoko zelula epitelialetan (OEC, *oral epithelial cells*) eta giza zilborreko endotelio zeluletan (HUVEC, *human umbilical vein endothelial cells*) onddoak aktibatzen dituen seinalizazio bideak aztertu dira.

OEC-etan NF- κ B eta MAPK bideen aktibazio bifasikoa ematen dela ikusi da (**Eranskinen 1. irudia**). Lehenengo, onddoekin erlazionatutako molekulen ezagutza emango da, hala nola β -glukanoak, kitina eta mananoak, NF- κ B eta MAPK-en lehenengo fasea aktibatuz. Beranduago, *C. albicans* forma (legamia/hifa) zein dentsitatearen arabera den MAPK bidearen bigarren fasea aktibatzen da. Honetan, c-Fos transkripzio faktorea gehienbat p38 MAPK bitartez aktibatuko da, hantura zitokinen jarioa eragingo duena (Moyes et al., 2010). Epitelio zeluletan oso erregulaturiko prozesua da. Izan ere, legamiaren dentsitateak txikiak direnean ez da

hanturarik sortuko, baina inbasiorako hifa forma hartzen duenean, ezabaketa mekanismoak martxan jarriko dira.

HUVEC zelulen kasuan, *C. albicans*-ek pizturiko seinalizazio bide nagusia NF- κ B-rena dela ikusi da, eta bigarren garrantzitsuena p38 MAPK bidea. Bien bitartez hanturan parte hartzen duten zitokinen jarria sustatuko da. Zehazki, gainadierazitako zitokinak neutrofiloak erakartzeko balio dutela ikusi da, onddoen aurkako defentsan funtsezkoak baitira. Hantura molekula horien gainadierazpena egoteaz gain, PRR-en adierazpenean ere emendioak ematen dira, TLR-enak gehienbat (Müller et al., 2007). Hori guztia dela eta, ondorioztatu da MyD88/IRAK-ekiko mendekoak diren TLR-ek onddoa ezagutu eta IKK/NF- κ B-k bideraturiko seinaleen ur-jauzia pizten dela, hantura zitokinen jarria sustatuz. Gainera, MAPK bidearen bitartez, bereziki p38, koerregulazioa ematen dela ikusi da, NF- κ B bidez jariatzen diren zitokina batzuk gainadierazteko beharrezkoa izango dena, IL-8, adibidez (Hoffmann et al., 2002).

LSEC-ei dagokienez, *C. albicans*-en presentziak zitokinen jarria eta adhesio molekulen areagotzea bultzatzea ikusi da, beste endotelio zelula batzuetan gertatzen den bezala. Onddo honen paretaren parte diren manoproteinek Tumore Nekrosi Faktore (TNF)- α eta Interleukina (IL)-18-ren sintesia areagotzen dutela behatu da (Ramirez-Garcia et al., 2011; 2013), eta IL-18 zitokinak LSEC zelulen gainazalean VCAM (*Vascular Cell Adhesion Molecule*)-1 adhesio molekularen adierazpena areagotzen du (Vidal-Vanaclocha et al., 2000). Honez gain, MR-en garrantzia azpimarratu da, hauek blokeatzean hantura zitokinen jarria nabarmen jaisten baita (Ramirez-Garcia et al., 2013). Nahiz eta *C. albicans*-ek LSEC-ak estimulatuz hantura egoera sor dezakeela frogatu den, oraindik ez da kontaktua ematean jarraitzen den seinalizazio biderik deskribatu.

2. HIPOTESIAK ETA HELBURUAK

Azken urteetan, *Candida albicans*-ek sortzen dituen infekzio larriak direla eta, bere presentziaren ondorioz zelula mota desberdinetan aktibatzen diren seinalizazio bideen ikerketa egin da. Kandidiasi sistemikoaren hilkortasun tasa altuak ikusita, gibeledako endotelio zelulak ikerketa iturri interesgarriak izan daitezke, onddoa zirkulazio sisteman zehar zabaltzen baita, eta jakina da gibelaren odolaren garbitzaile garrantzitsuenetarikoa dela.

Euskal Herriko Unibertsitateko (UPV/EHU) Immunologia, Mikrobiologia eta Parasitologia saileko “Onddo eta bakterioen biomika (MICROBIOMICS)” ikerketa-taldean *C. albicans*-ek LSEC-ak hantura eta atxikipen emendia eragitera bultzatzen dituela frogatu duen arren, prozesuan zehar aktibatzen diren seinalizazio bideak ez dira aztertu. Orokorrean, sinusoideko

zelula hauetan aktibatzen diren bide molekularren zehaztea baliagarria izan daiteke, *C. albicans*-ek sortu ditzakeen eraginen informazio zabalago bat lortzeko eta onddo honek eragiten dituen infekzioei aurre egiteko.

Aurreko guztia kontuan hartuta, Gradu Amaierako Lan honen helburu nagusia ***C. albicans*-ek gibel sinusoideko endotelio zeluletan eragiten duen erantzuna eta horretan parte hartzen duten seinalizazio bideak deskribatzea** da. Honetarako, hurrengo azpi-helburuak ezarri dira:

1. *C. albicans*-ek LSEC-etan eragiten dituen erantzun eta mekanismo molekularren azterketa, analisi transkriptomikoen bitartez.
2. *C. albicans*-en ezagutzan parte hartzen duten LSEC-en PRR-en azterketa.
3. *C. albicans*-ek LSEC-etan aktibatzen dituen seinalizazio bideetan parte hartzen duten molekulen ikerketa.

3. MATERIALAK ETA METODOAK

3.1. ZELULEN HAZKUNTZA ETA MANTENUA

Ikerketa honetan SV40 T antigenoarekin hilezkortutako C57BL/6J arratoien LSEC-en lerro zelularra erabili zen (Innoprot). Esperimentuetan zehar zelulak % 5 CO₂ eta 37 °C-tan hazi ziren, RPMI 1640 medioa erabilita, % 10 (v/v) behi serum fetala (FBS, 30 minutuz 56 °C-tan deskomplementatuta (Thermo Scientific, EB), % 1 (v/v) L-glutamina, 100 U/ml penizilina, 100 µg/ml estreptomizina, eta 0,25 µg/ml anfoterizina B (Sigma-Aldrich, AEB) produktuekin osatuta.

Zelulen azpikultiboak hauek % 80-90 konfluentzia mailara heltzean egin ziren. Zelulak botilatik askatzeko *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*-arekin (DPBS; Sigma-Aldrich, AEB) garbiketa bat egin eta Tripsina-EDTA-rekin (ThermoFisher, AEB) inkubatzan utzi ziren 5 minutuz, % 5 CO₂ eta 37 °C-tan. Behin zelulak aske egonda, 2500 rpm-tan 60 segunduz zentrifugatu ziren, botila berri batean zelulak gehitzeko. Entseguetan zelulak berdin askatu ziren eta kopurua doitzeko hemozitometroa eta % 0,4 Tripan-urdina soluzioa (Thermo Fisher) erabili ziren.

3.2. *Candida albicans* ONDDOAREN HAZKUNTZA

Lan honetarako *Candida albicans* UPV1413 (CECT 13062) andui klinikoa erabili zen. Pazienteen infekzioetatik isolatutako andui klinikoaren erabilera Euskal Herriko Unibertsitatearen (UPV/EHU) etika batzordearen onarpena jaso zuen. Entsegu bakoitza burutu

baino 48 ordu lehenago, legamiak *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA; Panreac Química SLU, Espainia) medioan hazi ziren 24 orduz 37 °C-tan. Ondoren, hazitako zelulak DPBS soluzioan birsuspenditu ziren, hemozitometro bidez kontatu eta 10^5 zelula/ml-ko dentsitatean *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB; Panreac) medio likidoan inokulatu ziren eta gau osoan hazi, 37 °C eta 120 rpm-tan.

3.3. RNA ERAUZKETA SEKUENTZIAZIO ANALISIRAKO

Lehenik eta behin, *C. albicans* 30 minutuz 70 °C-tan inkubatu zen, inaktibatu zitezen. Ondoren, LSEC-ak bero bidez inaktibaturiko *C. albicans*-ekin inkubatu ziren 6 orduz, MOI 0,5 (*Multiplicity of infection, Candida:LSEC*) erabilita. RNA-ren isolamendua Total RNA Isolation Kit-aren (NzyTech, Portugal) bitartez egin zen, fabrikatzailearen instrukzioak jarraituz. RNA-ren kantitatea (Qubit 3.0) eta kalitatea (Fragment Analyzer, AATI) aztertu ostean, TruSeq Stranded mRNA Kit-a (Illumina, AEB) erabiliz RNA bilduma sortu zen 100 ng RNA totaletik abiatuz. Azkenik, laginak -80 °C-tan gorde ziren, analisisia egin arte egonkor mantentzeko.

3.4. RNA SEKUENTZIAZIOA ETA DATUEN ANALISIA

RNA-ren kuantifikazioa, sekuentziazioa eta analisisia Centro de Investigación Biomédica de la Riojaren (CIBIR) parte den Maria del Torok egin zuen. RNA molekulen sekuentziak saguen erreferentziazko genomarekin (GRCm39) parekatuak izan ziren HISAT2 erabiliz. Irakurketa kopurua, aldiz, FeatureCounts tresnaren bidez kontatua izan zen. Honez gain, gene adierazpen diferentziala (GAD) eta *fold change* (FC) EdgeR tresna erabilita zehaztu ziren, SARTools paketearen bitartez. GAD-aren balioak FC-aren arabera egokitu ziren: $FC \geq 1,5$ gainadierazitako geneentzako eta $FC \leq 0,5$ inhibituriko geneentzako, ezarritako p -balioa $\leq 0,05$ izanik.

Geneen ontologia (GO) eta KEGG bideen funtzionalitate analisisia clusterProfiler paketearen bidez analizatu ziren, ezarritako p eta q balioak $\leq 0,05$ izanik. Azkenik, hemendik ateratako datuekin STRING Database bidez proteinen asoziazioa burutu zen, proteina-proteina interakzioak (PPI) aztertuz.

3.5. RNA ERAUZKETA ETA DENBORA ERREALEKO PCR KUANTITATIBOA (RT-qPCR)

LSEC zelulak 6 putzutako plaketan 10^6 zelula/putzuko dentsitatean gehitu ziren eta 37 °C eta % 5 CO₂-tan hazi ziren. Hurrengo egunean, *C. albicans* MOI 5-ean gehitu eta 6 ordu ostean RNAm erauzketa burutu zen lehen azaldu den bezala. Azkenik, RNA-ren kalitatea Nanodrop

ND 1000-arekin (ThermoFisher Scientific) neurtu egin zen eta lorturiko erauzkinak $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -tan gorde ziren.

Ostean, cDNA LSEC-etatik erauzitako RNA-tik abiatuz sintetizatu zen, $30\text{ ng}/\mu\text{l}$ RNA erretrotranskribatuz, NZY First-Strand cDNA Synthesis Kit-a erabilia (NzyTech), fabrikatzailearen instrukzioak jarraituz. Ondoren, qPCR-a egiteko NZYSupreme qPCR Green Master Mix (2x) (NzyTech) eta CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, AEB) termozikladorea erabili egin ziren. Seinalizazio bideekin erlazionatuta dauden bost generen adierazpena neurtu zen, *Nfkb*, *Jnk*, *Erk*, *P38a*, *Cfos* eta kontrol gisa, *Rpl19 housekeeping* genearena. Kasu bakoitzean erabilitako hasle bikoteak **Eranskinen 1. taulan** erakusten dira eta termozikladoreak jarraituriko prozesua, **Eranskinen 2. taulan** deskribatu da. Ondoren, adierazpen genetikoa kalkulatzeko, Livak metodoa ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) erabili zen.

3.6. SEINALIZAZIO BIDEEN INHIBIZIOA

C. albicans-en ezagupenean aktiba daitezkeen seinalizazio bide desberdinak analizatzeko hurrengo inhibitzaileak erabili ziren: Syk tirozina kinasarentzako (Piceatannamol, $30\text{ }\mu\text{M}$), MyD88 seinale transduktorearentzako (TJ-M2010-5, $30\text{ }\mu\text{M}$), ERK bidearentzako (PD-0325901, $1\text{ }\mu\text{M}$), eta c-Fos/AP-1 transkripzio faktorearentzako (T-5224, $50\text{ }\mu\text{M}$), denak MedChem Express-etik (AEB) eskuratuak. Efektu inhibitzailea IL-6 hantura zitokinaren jarioaren neurketa bidez eta gene (*Cfos*) eta proteinen (c-Fos eta IkappaB kinasa) adierazpena aztertuz egin zen.

Inhibitzaile hauen eragina aztertu ahal izateko, LSEC-ak 12 putzutako plaketan erein ziren 5×10^5 zelula/putzuko dentsitatean. Hurrengo egunean, kasu bakoitzean beharrezko inhibitzaileak gehitu ziren, ordubetez inkubatuz % 5 CO_2 eta $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -tan, eta MOI 5 *C. albicans* gehitu zen beharrezko kondizioei. Sei ordu igaro ostean, alde batetik, gainjalkinak batu eta $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -tan gorde ziren IL-6-aren neurketa Entzimei Lotutako Immunoadsortzio-Proba (ELISA) bidez egin arte eta, bestetik, proteinen erauzketa egin zen.

IL-6 ELISA proba IL-6 Mouse Uncoated ELISA Kit-aren (Fisher Scientific) bitartez ikertu zen, fabrikatzailearen instrukzioak jarraituz. Bestalde, proteinen erauzketa egiteko, lehenik eta behin, proteasadun RIPA lisi bufferra (Sigma-Aldrich) eta fosfatasa inhibitzaileak (Perbio, Belgika) erabiliz zelulak apurtu ziren, segidan izotzetan 10 minututan inkubatzeko. Denbora hori pasatu eta gero, putzuetan zeuden zelulak mekanikoki apurtu, lagina jaso eta beste 10 minututan inkubatzeko utzi ziren, izotzetan. Azkenik, abiadura maximoan 5 minutuz zentrifugatu eta proteinak zeuzkaten gainjalkinak $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -tan gorde ziren erabili arte.

Proteinen laginak % 10 akrilamidadun geletan kargatu eta 70 mA, 100 W eta 200 V-tan 45 minutuz migratu ziren Miniprotean II-n (Bio-Rad.), estandar gisa Page Ruler Plus (Thermo Fisher) erabiliz. Ostean, proteinak Amersham Hybond-P PVDF mintzera (Thermo Fisher) transferitu ziren, 400 mA-tan, ordubetez. Hasteko, mintza ordubetez blokeatu zen TBSSM tanpoiarekin (*Tris Buffered Saline Milk*; 50 mM tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, % 0,1 (b/b) Tween 20 eta % 5 (p/b) gantz gutxiko esne lehorrarekin). Antigorputz primariotzat TBSSM-en 1:1000 diluitutako untxian ekoiztutako, anti-c-Fos (9F6), anti-Phospho I κ B α (Ser32) (14D4) eta *housekeeping* den anti- α -Tubulinarentzako (11H10) antigorputzak erabili ziren, denak Cell Signaling Technology-tik (AEB) eskuratuta. Mintza antigorputz hauekin inkubatu zen gau osoan zehar 4 °C-tan. Antigorputz sekundariotzat TBSSM-en 1:5000 diluitutako ahuntz anti-untxi IgG-a erabili zen (Invitrogen, Thermo Fisher), eta 30 minutuz giro tenperaturan inkubatu zen. Pausu guztiak irabiazioan egin ziren eta antigorputzen artean mintzak Tris indargetzaile batekin garbitu ziren. Mintzak NZY Standard ECL (NzyTech) erabiliz errebelatu egin ziren, G:BOX Chemi sistema batean (Syngene, EB). Azkenik, Western blotaren dentsitometria analisisa Image J (Bethesda, AEB) bidez egin zen.

Amaitzeko, *Cfos*-aen RT-qPCR-a burutu ahal izateko, LSEC-ak 12 putzutako plaketan hazi beharrean 6 putzutako plaketan 10⁶ zelula/putzuko dentsitatean gehitu ziren eta RNA-ren erauzketa egin zen lehen azaldu bezala.

3. 7. ANALISI ESTADISTIKOA

Analisi estatistikoa SPSS software estatistikoa erabiliz gauzatu zen (Professional Statistic, AEB). Datuen normaltasuna Shapiro Wilks testarekin, eta bariantzaren homogeneitatea Leveneren testarekin, aztertu ziren. Datu normalak bi taldeentzat Student t-testarekin, edo one-way ANOVA testarekin (Bonferroni edo Tamhane T2 zuzenketekin) talde gehiagorentzat, analizatuak izan ziren. Normalak ez ziren datuen kasuan Kruskal-Wallis test ez-parametrikoa erabili zen (Bonferri post-hoc zuzenketarekin). Esperimentuak gutxienez 3 bider errepikatu ziren, eta alderaketak egiteko p -balioa kasu guztietan $p < 0,05$ izan zen.

4. EMAITZAK

4.1. *C. albicans*-en ERAGINA LSEC-en TRANSKRIPTOMAN

Analisi transkriptomikoak 79 generen gainadierazpena erakutsi zuen *C. albicans*-ekin estimulaturiko LSEC-en kasuan, $FC \geq 1,5$ eta $p < 0,05$ balioentzako (**Eranskinen 2. a) irudia**). Emaitzak argiago interpretatzeko, prozesu biologikoen (PB) eta funtzio molekularren (FM) GO analisisia egin zen, eta horietan zein geneek parte hartzen duten aztertu ziren.

Gainadierazitako geneek lau FM talde nagusitan banatu ziren: zitokina aktibitatea, errezeptore-ligando aktibitatea, zitokina-errezeptore aktibitatea eta kimiokina aktibitatea (**Eranskinen 2. b) irudia**). PB-ei dagokienez, *C. albicans*-ek gehien bat hurrengo prozesuetan eragin zezakeela behatu zen: zitokinen ekoizpena, estimuluaren erantzuna, zelulen adhesioa, immunitate-sistemaren prozesuak eta zelulen proliferazioa (**Eranskinen 2. d) irudia**). Zehazki, gainadierazitako gene kopuru altuena zuen PB-a zitokinen erregulazio positiboarena zela ikusi zen, eta horien artean azpimarratzekoak dira *Tnf*, *Il6*, *Clec4e*, *Ptgs2* eta *Ifny* geneen gainadierazpena.

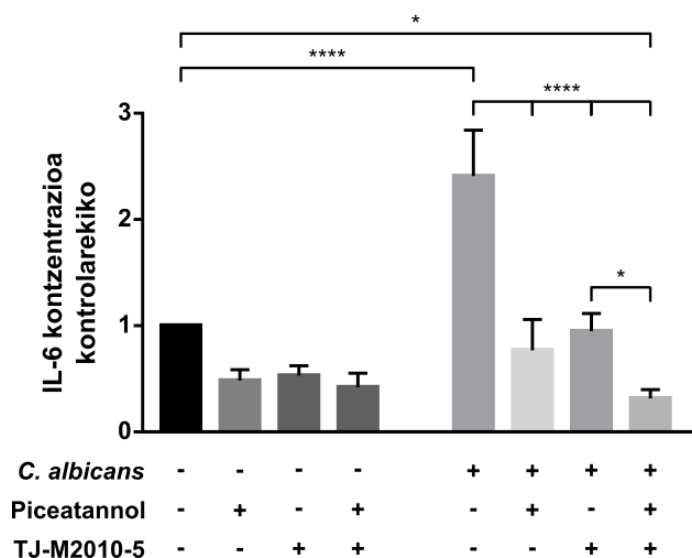
Eranskinen 2. c) irudian adierazten den bezala, KEGG bideen funtzionalitate analisisien emaitzek, gainadierazitako geneen parte hartzea kontuan izanda, *C. albicans*-en estimulazioaren ondorioz aktibatutako bost seinalizazio bide erakutsi zituzten: zitokina-zitokina errezeptore interakzioak, Jak-STAT bidea, TLR-en bidea, antigenoen prozesamendu eta aurkezpena eta DNA zitოსolikoa ezagutzeko bidea.

Azkenik, STRING Database bidez PPI-ak aztertuz intereseko geneen asoziazio analisisia egin zen, **Eranskinen 2. e) irudian** ikusi daitekeena. Azterketaren emaitza gisa *Il10*, *Tnf*, *Il6*, eta *Ifny* nodoen interakzioak nabarmendu zitezkeen. Gene hauek interakzio kopuru altuenak erakutsi zituzten, guztiek bost PB-etan parte hartzen dutelako.

4.2. *C. albicans*-en EZAGUTZAN LSEC-en Syk ETA MyD88 MOLEKULEK PARTE HARTZEN DUTE

Seinalizazioan zein PRR-k parte hartzen duen jakiteko asmoz MyD88 (TJ-M2010-5) eta Syk-en (Piceatannol) inhibitzaileak erabili ziren. **1. irudian** erakusten den bezala, *C. albicans*-ekin kontaktuan egondako LSEC-etan, estimulatu gabeko kontrolarekiko desberdintasun esanguratsuak hauteman ziren. Hala ere, *C. albicans* eta inhibitzaileekin kontaktuan egondako LSEC-etan beherakada adierazgarria antzeman zen inhibitzailerik gabe eta onddoarekin kontaktuan egondakoekin alderatuz. Izan ere, *Candida* eta inhibitzaile bakarra erabilitako

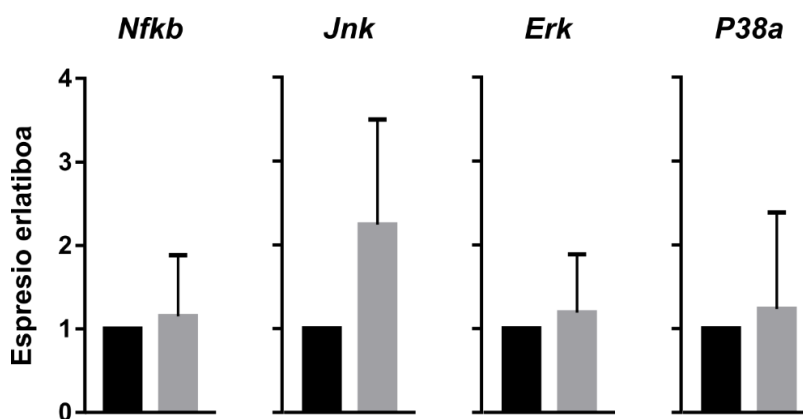
kasuetan, onddoaren presentzia inhibitzaile gabe jariatzen zuena baino IL-6 maila txikiagoak detektatu ziren, ezberdintasunak esangarriak izanik eta are gehiago LSEC-ak inhibitzaile biek in eta onddoarekin inkubatu zirenean.



1. irudia. ELISA bidez detektaturiko IL-6-ren kontzentrazioak, estimatu gabeko kontrolarekin alderatuta. LSEC-ak inhibitzaileekin (edo medioarekin) orubete inkubatu eta jarraian 6 orduz MOI 5 *C. albicans*-ekin estimatuak izan ziren % 5 CO₂ eta 37 °C-tan. Erabilitako inhibitzaileak hurrengoak dira: Piceatannol (Syk) eta TJ-M2010-5 (MyD88). * $p < 0.05$ eta **** $p < 0.0001$ (n = 3).

4.3. *C. albicans*-ek MAPK/ERK ETA c-Fos-en BIDEZKO SEINALIZAZIO BIDEA AKTIBATZEN DU LSEC-etan

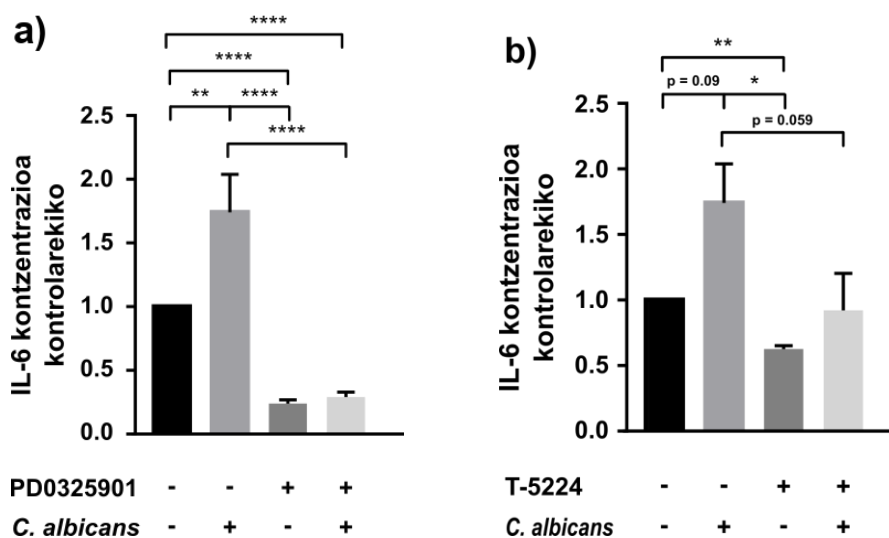
RT-qPCR-aren bitartez MAPK (ERK, JNK eta p38) eta NF-κB bideen parte diren lau generen azterketa gauzatu zen. **2. irudiak** adierazten duenez, ez zen emaitza esanguratsurik lortu estimazioa jasan zuten LSEC-etan kontrolarekin alderatuz. Hori dela eta, hasteko MAPK/ERK seinalizazio bidean zentratzea erabaki zen, PB-en GO analisisian gainadierazita agertzen baitzen ERK1/2 kaskadaren erregulazio positiboa (**Eranskinen 2. d) irudia**).



2. irudia. RT-qPCR bidez aukeraturiko geneen adierazpen erlatiboaren analisia: *Nfkb*, *Jnk*, *Erk*, eta *P38a*.

Bi baldintza ezarri ziren: kontrola, *C. albicans*-en estimulazio gabe (beltza); eta, 6 orduz MOI 5 *C. albicans*-ekin estimulatutakoak (grisa), % 5 CO₂ eta 37 °C-tan (n = 6).

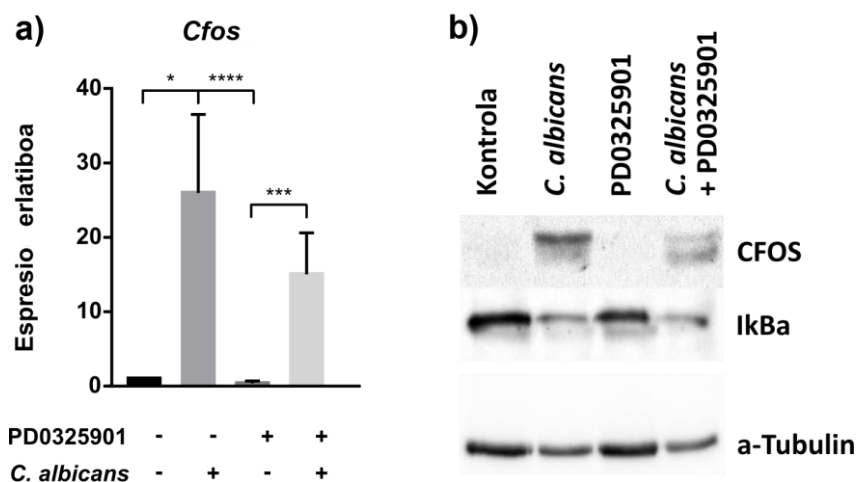
C. albicans-en presentzian MAPK/ERK seinalizazio bidea aktibatzen den ala ez frogatzeko, PD0325901 inhibitzaile espezifikoa erabili zen, eta adierazle bezala IL-6 zitokinaren jariapena neurtu zen. **3. irudian** islatutako datuetan *C. albicans* gehituriko laginean IL-6 mailen igoera esanguratsua azaldu zen, **1. irudian** erakutsi den moduan. **3. a) irudian** hauteman daitekeen bezala, ERK-aren inhibitzailea eta onddoa batera jartzean LSEC-ek jariatutako IL-6 kantitateak *C. albicans* bakarrik duen kondizioarekiko jaitsiera nabarmena hautematen da. Bestalde, MAPK bidearekin lotura duten beste molekula batzuk aztertu nahian, c-Fos/AP-1 inhibitzailea, T-5224, erabili zen. Inhibitzaile hau eta onddoa LSEC-ekin kontaktuan jartzean, *Candida* soilik duen baldintzarekin konparatuz, IL-6 jariapenaren jaitsiera nabaria izan zen, baina ez estatistikoki esangarria (**3. b) irudia**). Emaitza hauek bi molekula hauek, batez ere ERK, *C. albicans*-en aurkako erantzunean garrantzitsuak izan daitezkeela iradokitzen dute.



3. irudia. ELISA bidez detektaturiko IL-6-ren kontzentrazioak, estimatu gabeko kontrolarekin alderatuta. LSEC-ak inhibitzaileekin (edo medioarekin) ordubete inkubatu eta jarraian 6 orduz MOI 5 *C. albicans*-ekin estimatuak izan ziren, % 5 CO₂ eta 37 °C-tan. Erabilitako inhibitzaileak hurrengoak dira: a) PD-0325901 (ERK); b) T-5224 (c-Fos/AP-1). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, eta **** $p < 0.0001$ (n = 6).

Bestalde, c-Fos ERK-en menpekua den jakiteko RT-qPCR analisia bideratu zen. **4. a) irudiak** erakusten duen bezala, onddoaren estimazioa ematean *Cfos*-aren adierazpen erlatiboa kontrolarekiko baino askoz handiagoa izan zen. *C. albicans*-ekin estimazioa eta PD-0325901 (ERK) bidezko inhibizioa batera ematean, nahiz eta eskuratutako *Cfos*-en espresio maila nabarmenki murrizten den soilik onddoarekin estimatu diren LSEC-en balioekin alderatuta, ezin da esan ezberdintasun esangarririk dagoenik. Bestalde, **4. b) irudian** irudikatzen den bezala, CFOS proteinaren fosforilazio mailak (proteinaren aktibazio maila alegia) RNA-ren joera bera erakusten du, hau da, onddoaren presentzia CFOS estimazioa ematen dela eta ERK inhibitzaileak estimazio hau murrizten duela baina ez du ezabatzen.

Inhibitzaileen bitartez bideen analisiari amaiera emateko, IκBα proteinaren fosforilazioa neurtu zen, NF-κB-ren aktibatzaile zuzen gisa jarduten duena (**4. b) irudia**). Nahiz eta egoera guztietan detektatu, *Candida*-ren estimaziorik gabeko egoeretan proteina honen fosforilazio maila altuagoa nabari da.



4. irudia. CFOS molekularen eta IκBα proteinaren adierazpenaren azterketa. a) RT-qPCR bidez Cfos genearen adierazpen erlatiboaren analisia. b) Western blot bidezko CFOS eta IκBα proteinen analisia. LSEC-ak inhibitzailearekin (edo medioarekin) ordubete inkubatu eta jarraian 6 orduz MOI 5 *C. albicans*-ekin estimatuak izan ziren, % 5 CO₂ eta 37 °C-tan. Kasu guztietan erabilitako inhibitzailea PD-0325901 (ERK) izan zen. * $p < 0.05$, eta *** $p < 0.001$ (n = 3).

5. EZTABAIDA

Gaur egun, *Candida albicans* da KS-aren eragile nagusia. Berez mikrobiotaren parte den arren, immunosupresioak eta ehunen hesien disfuntzioak direla eta, beste faktore batzuen artean, odolaren bitartez zabaldu eta ohikoak ez diren zonaldeak inbaditu ditzake (Pilmis et al., 2017). Gibelak funtzio filtratzailea duenez, zirkulazio-sistemarekin kontaktuan dago etengabe, eta, horrenbestez, odolean dauden antigenoen ezagutza ezinbestekoa izango da. LSEC-ek, konkretuki, endotelioan ohikoak ez diren azaleko PRR-ak erakusten dituzte, immunitate-sistemarekin loturiko funtzio bereziak izatea ahalbidetuko dienak (Cacicedo et al., 2020). Hainbat ikerketatan mota desberdineko zeluletan onddoak duen eragina aztertu izan bada ere, epitelio edo endotelioan (Moyes et al., 2010; Müller et al., 2007), kasu, *C. albicans* LSEC-ekin kontaktuan jartzean aktibatzen den seinalizazio bidea oraindik ezezaguna da. Lan honetan lortutako emaitzek *C. albicans*-ek LSEC-etan eragiten dituen mekanismo molekularrak zeintzuk diren argitzen lagundu du.

Azterketa transkriptomikoaren emaitzek *C. albicans*-ek gehienbat immunitate-sistemarekin loturiko prozesuetan eragiten zuela erakutsi zuten. Alde batetik, zitokinen erregulazio positiboa abiarazten zuela aztertu zen, PRR zein hantura zitokinen gainadierazpenak eraginez. Hantura

bultzatzen duten zitokina jarioaren emendioa ez da berria, jakina da TNF- α , adibidez, LSEC (Ramirez-Garcia et al., 2011) zein epitelio zeluletan (Tanaka et al., 2011) gainadierazten dela *C. albicans*-ekin kontaktuan jartzean. Interferon (IFN)- γ zitokinaren presentzia ere emendatzen dela aztertu zen, zeina, beste funtzio batzuen artean, endotelioaren permeabilitate aldaketekin eta p38 MAPK bidearen aktibazioarekin lotu den (Ng et al., 2015). Zitokina guztien artean, bereziki, IL-6-ren garrantzia aipatzekoa da, hantura zitokina izateaz gain prozesu biologiko anitzetan parte hartzen baitu (Luo eta Zheng, 2016). TNF- α zein IL-6 *C. albicans*-ekin kontaktua eman eta gutxira askatzen direla ikusi da, ahoko epitelio zeluletan horien geneen aktibazio maximoa 2-4 eta 8 orduara gertatzen baita, hurrenez hurren (Mostefaoui et al., 2004). Hori dela eta, hurrengo probetan IL-6 *C. albicans*-en eragina aztertzeko indikatzaile gisa erabili da. PRR-en espresioari dagokienez, transkriptoman *Clec4e* genearen gainadierazpena behatu daiteke, Mincle izenarekin ere ezagutzen dena. Hau CLR mota bat da, orokorrean zelula mieloideetan adierazten dena, eta *C. albicans*-en kontrako erantzunean ezinbestekoa da. Gainera, TNF- α -ren ekoizpenarekin estuki loturik dago, makrofagoetan adibidez, Mincle-k onddoarekin kontaktua izan ostean, zitokina honen ekoizpena bultzatzen duela frogatu baita (Wells et al., 2008). Beste alde batetik, gernu-epitelioan gertatzen den bezala (Wang et al., 2017), proliferazioarekin erlazionaturiko geneen gainadierazpena ere behatu da, *Ptgs2*-k kodetzen duen COX-2 kasu. Nahiz eta hantura sortzeko seinalizazio bidean parte hartzen duten molekulen azterketan zentratu den lana, interesgarria izango litzateke sakonago ikertzea aipatu diren bestelako ezaugarriak eta transkriptoma analisisian gainadierazita zeuden beste gene batzuk, ostalariaren defentsarako gakoak izan baitaitezke.

Erantzun immunea *Candida*-rekin kontaktua ematean hasten denez, LSEC-ek ezagutza emateko erabilitako PRR-ak zehazteko MyD88 eta Syk-en inhibitzaileak erabili ziren. MyD88 zitoplasman ageri den proteina adaptatzailea da, TLR-en bidezko seinalizazioan parte hartzen duena. Patogenoen aurreko makrofagoen erantzunean, adibidez, MyD88-k MAPK zein NF- κ B bideen aktibazioan parte hartu dezakeela ikusi da, emaitza bezala hantura zitokinak askatuz (Zou eta Shankar, 2015). Syk, ostera, CLR motako hartzaileekin lotu izan da, eta honek ere zelula mieloideetan NF- κ B zein MAPK bideetan eragin dezakeela behatu da (Kerrigan eta Brown, 2011). Emaitzetan MyD88 zein Syk-en parte hartzea hauteman zen, hots, *C. albicans* TLR eta CLR bidez ezagutu dela ondorioztatu daiteke, nahiz eta zehazki hartzaile mota horien artean zeintzuk diren ez jakin. Gainera, Syk eta MyD88 bakarka inhibitzean zitokina mailak jaitsi arren, bien funtzionamendua blokeatzean *C. albicans*-ek eragindako IL-6-aren igoera ia gutiz ezabatzen da. Literaturan, makrofagoen bidezko onddoen ezagutzan CLR eta TLR-en

arteko kolaborazioa deskribatu da (Dennehy et al., 2009), Dectin-1 eta TLR2-rena adibidez, eta biek parte hartzen duten bideek batera funtzionatzean efektu sinergikoa dutela zehaztu da, zelulei immunitate optimoa eskainiz. Hala ere, analisi transkriptomikoek soilik CLR motako Mincle-ren gainadierazpena erakutsi zuen. Honen arrazoa *Candida*-ren forma izan daiteke, transkriptoma aztertzeko onddoa inaktibatuta baitzegoen, hots, legamia forman, eta gainerako probak egitean bizirik eta hifa forman. Sarreran aipatu den bezala, onddoaren formaren arabera zelularen pareta eta bertan azaltzen diren molekulak aldatu daitezke (Chen et al., 2020), eta, beraz, haren ezagutzan parte hartzen duten hartzailak desberdinak izan daitezke.

Jakina da, arestian azaldu bezala, TLR eta CLR bidez NF- κ B eta MAPK bideen aktibazioa eman ohi dela. Hala ere, bide hauetan parte hartzen duten geneen RNA-ak RT-qPCR bidez aztertzean, ez zen estimulatu gabeko kontrolarekiko desberdintasun estatistikoki esangarririk behatu. Zelula endotelialetan *C. albicans*-ek sortutako transkripzio mailako erantzuna hiru fasetan sailkatu izan da: atxikidura fase goiztiarra (1-3 ordu), inbasio fasea (3-12 ordu) eta infekzio fase berantiarra (12-24 ordu) (Moyes et al., 2014). RNAm-ren izaera iragankorra ezagututa, baliteke 6 ordu igaro ostean hasieran aktibaturiko geneen RNA molekula jadanik degradatu izana. Horregatik, GO analisisietan oinarrituz, ikerketak MAPK/ERK bidean zentratu ziren. Horretaz aparte, bibliografian oinarrituta, c-Fos/AP-1-en parte hartzea aztertzea erabaki zen, hainbat ikerketek bide honen garrantzia deskribatu baitute *C. albicans*-en erantzun immunean (Moyes et al., 2010, 2014; Pellon et al., 2020). Bide hauen inhibizio esperimientuen emaitzek ERK zein c-Fos/AP-1-en parte hartzea islatzen dute. Alabaina, emaitzei erreparatuz c-Fos ez dela ERK-en menpekoa susmatu daiteke, MAPK/ERK-en inhibizioak ez zuelako c-Fos proteinaren fosforilazioan edo *Cfos* genearen adierazpenean aldaketa estatistikoki esangarririk ekarri. Hori jakinda ere, ERK inhibitzean c-Fos-en beherakada bat ikusi daiteke, eta beraz, nolabait c-Fos aktibatzeke gai dela aditzera ematen du. ERK-ek eragindako aktibazioaz gain c-Fos-en fosforilazioa eragiten duen beste bideren bat egon daiteke, eta epitelio eta endotelioaren inguruko bibliografia aztertuta, p38-ren parte hartzea susmatu daiteke, hainbat lanetan deskribatua izan baita (Moyes et al., 2010; Müller et al., 2007; Zhang et al., 2022). Hala ere, zelula mota bakoitzean jarraituko den bidea desberdina denez, p38-ren aktibazio gaitasuna eta JNK-k inplikaziorik duen ala ez sakonago aztertu beharko litzateke, orain arte c-Fos-en aktibazioan JNK-ren parte hartze zuzenik ez bada deskribatu ere.

Amaitzeko, sarreran aipatu bezala, zelula batzuetan *C. albicans*-en kontaktuaren ondorioz NF- κ B bidea aktibatzen da. Beraz, LSEC-etan molekula honen aktibazioa ikertzea erabaki zen, bere aktibatzailea den I κ B α proteinaren adierazpena aztertuz. Zelula hauen kasuan, *C. albicans*-en

erantzunean NF- κ B seinalizazio bideak parte hartzen ez duela esan daiteke, nahiz eta ERK bidea inhibitua egon. Gainera, alde batera utz daiteke NF- κ B-ren eragina c-Fos proteinaren aktibazioan. NF- κ B bidezidorraren parte hartze eza ez zen esperotakoa, esan bezala epitelio zein beste endotelio mota batean eginiko esperimentuetan guztiz kontrako emaitzak lortu baitira. Aurretik azaldu den bezala, OEC-etan ezagutza bifasikoa ematen da, eta onddoekin erlazonaturiko molekula orokorren ezagutzako lehenengo fasean hartuko du NF- κ B-k parte, MAPK bidearekin batera (Moyes et al., 2010). Baliteke LSEC-etan NF- κ B-ren aktibazio ezaren arrazoa onddoaren forma eta dentsitatean egotea, OEC-etan NF- κ B bidea *C. albicans* legamia forman eta hifa forman dentsitate baxuetan dagoenean aktibatzen dela ikusi baita. Aldiz, azterketa transkriptomikoa ez ezik, lan honetako gainerako esperimentuak hifa formadun *Candida*-rekin dentsitate altuetan egin dira. Bestalde, endotelio motaren barnean, HUVEC zelulen kasuan, NF- κ B *C. albicans*-ek eragindako hanturarekin erlazonaturiko seinalizazio bide zentralizat deskribatu da, nahiz eta MAPK bideek ere parte hartu (Müller et al., 2007).

Laburbilduz, onddoak aktibatzen duen erantzuna zelula motaren arabera dela esan daiteke. Ikusi den bezala, endotelio mota barnean ere *C. albicans*-en ezagutzak bide desberdinak pizten ditu. LSEC zeluletan, zehazki, *C. albicans* TLR eta CLR bidez ezagutu daiteke, eta hanturarekin lotutako seinalizazio ur-jauzia piztuko da. Aztertutako emaitzen arabera, seinalizazioan zehar ERK eta c-Fos/AP-1 aktibatuko dira, nahiz eta oraindik ze mekanismoren menpe dagoen sakonki ez jakin. Seinaleen ondorioz, aldaketa transkriptomikoak eman eta zitokinen ekoizpenean, zelularen gainazaleko molekula desberdinetan, zitokinetan eta proliferazioan parte hartzen duten geneetan, beste batzuen artean, gainadierazpenak emango dira. Azkenik, seinalizazio bide honen azterketan jarraitu beharra dago LSEC-etan, oraindik aktibazioaren erantzule diren gene asko deskribatzeke baitaude.

6. ONDORIOAK

1. *Candida albicans* LSEC zeluletan erantzun immunea hasteko gai da, hainbat zitokinen (*Il6*, *Tnf*) eta bestelako geneen (*Clec4e*, *Ptgs2*) gainadierazpena bultzatuz, analisi transkriptomikoetan oinarrituta.
2. *Candida albicans*-en ezagutza LSEC zeluletan TLR eta CLR hartzailen bidez ematen da.
3. *Candida albicans*-en ezagutzak LSEC zeluletan MAPK/ERK eta c-Fos/AP-1-en aktibazioa eragiten du.

7. ESKER ONAK

Eskerrak eman nahi dizkiot UPV/EHU-ko Immunologia, Mikrobiologia eta Parasitologia saileko “Onddo eta bakterioen biomika (MICROBIOMICS)” ikerketa-taldearen parte den Leire Apariciori, Gradu Amaierako Lan hau aurrera eramateko emandako laguntzagarik. Horrez gain, eskerrak Joana Márquez doktoreari eta Centro de Investigación Biomédica de la Riojaren (CIBIR) parte den Maria del Torori, proiektuan izandako kolaborazioagarik.

8. BIBLIOGRAFIA

Cacicedo, M. L., Medina-Montano, C., Kaps, L., Kappel, C., Gehring, S., eta Bros, M. (2020). Role of Liver-Mediated Tolerance in Nanoparticle-Based Tumor Therapy. *Cells*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/cells9091985>

Chen, H., Zhou, X., Ren, B., eta Cheng, L. (2020). The regulation of hyphae growth in *Candida albicans*. *Virulence*, 11(1), 337–348. <https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1748930>

DeLeve, L. D., eta Maretta-Mira, A. C. (2017). Liver Sinusoidal Endothelial Cell: An Update. *Seminars in Liver Disease*, 37(4), 377–387. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1617455>

D’Enfert, C., Kaune, A. K., Alaban, L. R., Chakraborty, S., Cole, N., Delavy, M., Kosmala, D., Marsaux, B., Fróis-Martins, R., Morelli, M., Rosati, D., Valentine, M., Xie, Z., Emritloll, Y., Warn, P. A., ... Brown, A. J. P. (2021). The impact of the fungus-host-microbiota interplay upon *Candida albicans* infections: Current knowledge and new perspectives. *FEMS Microbiology Reviews*, 45(3). <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa060>

Dennehy, K. M., Willment, J. A., Williams, D. L., eta Brown, G. D. (2009). Reciprocal regulation of IL-23 and IL-12 following co-activation of dectin-1 and TLR signaling pathways. *European Journal of Immunology*, 39(5), 1379–1386. <https://doi.org/10.1002/eji.200838543>

Gow, N. A. R., eta Yadav, B. (2017). Microbe profile: *Candida albicans*: A shape-changing, opportunistic pathogenic fungus of humans. *Microbiology (United Kingdom)*, 163(8), 1145–1147. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000499>

Hoffmann, E., Dittrich-Breiholz, O., Holtmann, H., eta Kracht, M. (2002). Multiple control of interleukin-8 gene expression. *Journal of Leukocyte Biology*, 72(5), 847–855. <https://doi.org/10.1189/jlb.72.5.847>

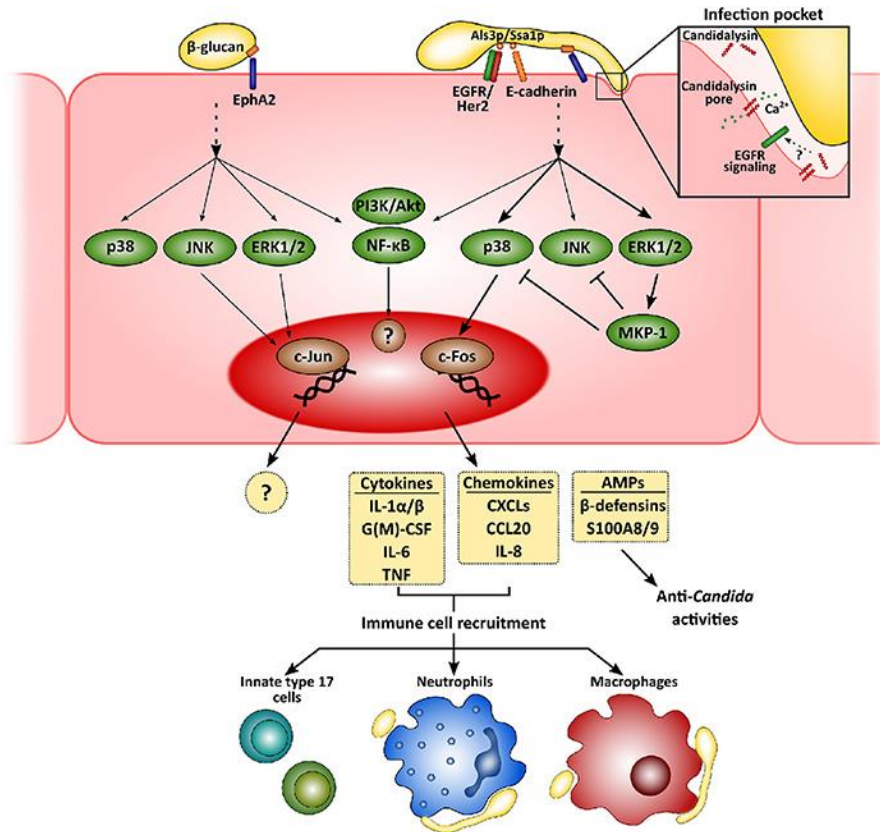
Jenne, C. N., eta Kubes, P. (2013). Immune surveillance by the liver. *Nature Immunology*, 14(10), 996–1006. <https://doi.org/10.1038/ni.2691>

- Kerrigan, A. M., eta Brown, G. D. (2011). Syk-coupled C-type lectins in immunity. *Trends in Immunology*, 32(4), 151–156. <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.01.002>
- Lopes, J. P., eta Lionakis, M. S. (2022). Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Virulence*, 13(1), 89–121. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.2019950>
- Luo, Y., eta Zheng, S. G. (2016). Hall of fame among pro-inflammatory cytokines: Interleukin-6 gene and its transcriptional regulation mechanisms. *Frontiers in Immunology*, 7(DEC). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00604>
- Mostefaoui, Y., Bart, C., Frenette, M., eta Rouabhia, M. (2004). *Candida albicans* and *Streptococcus salivarius* modulate IL-6, IL-8, and TNF-alpha expression and secretion by engineered human oral mucosa cells. *Cellular Microbiology*, 6(11), 1085–1096. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00420.x>
- Moyes, D. L., Runglall, M., Murciano, C., Shen, C., Nayar, D., Thavaraj, S., Kohli, A., Islam, A., Mora-Montes, H., Challacombe, S. J., eta Naglik, J. R. (2010). A Biphasic Innate Immune MAPK Response Discriminates between the Yeast and Hyphal Forms of *Candida albicans* in Epithelial Cells. *Cell Host & Microbe*, 8(3), 225–235. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.08.002>
- Moyes, D. L., Shen, C., Murciano, C., Runglall, M., Richardson, J. P., Arno, M., Aldecoa-Otalora, E., eta Naglik, J. R. (2014). Protection against epithelial damage during *Candida albicans* infection is mediated by PI3K/Akt and mammalian target of rapamycin signaling. *Journal of Infectious Diseases*, 209(11), 1816–1826. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit824>
- Müller, V., Viemann, D., Schmidt, M., Endres, N., Ludwig, S., Leverkus, M., Roth, J., eta Goebeler, M. (2007). *Candida albicans* Triggers Activation of Distinct Signaling Pathways to Establish a Proinflammatory Gene Expression Program in Primary Human Endothelial Cells 1. *The Journal of Immunology*, 179. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.12.8435>
- Ng, C. T., Fong, L. Y., Sulaiman, M. R., Moklas, M. A. M., Yong, Y. K., Hakim, M. N., eta Ahmad, Z. (2015). Interferon-Gamma Increases Endothelial Permeability by Causing Activation of p38 MAP Kinase and Actin Cytoskeleton Alteration. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 35(7), 513–522. <https://doi.org/10.1089/jir.2014.0188>
- Pellon, A., Sadeghi Nasab, S. D., eta Moyes, D. L. (2020). New Insights in *Candida albicans* Innate Immunity at the Mucosa: Toxins, Epithelium, Metabolism, and Beyond. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00081>

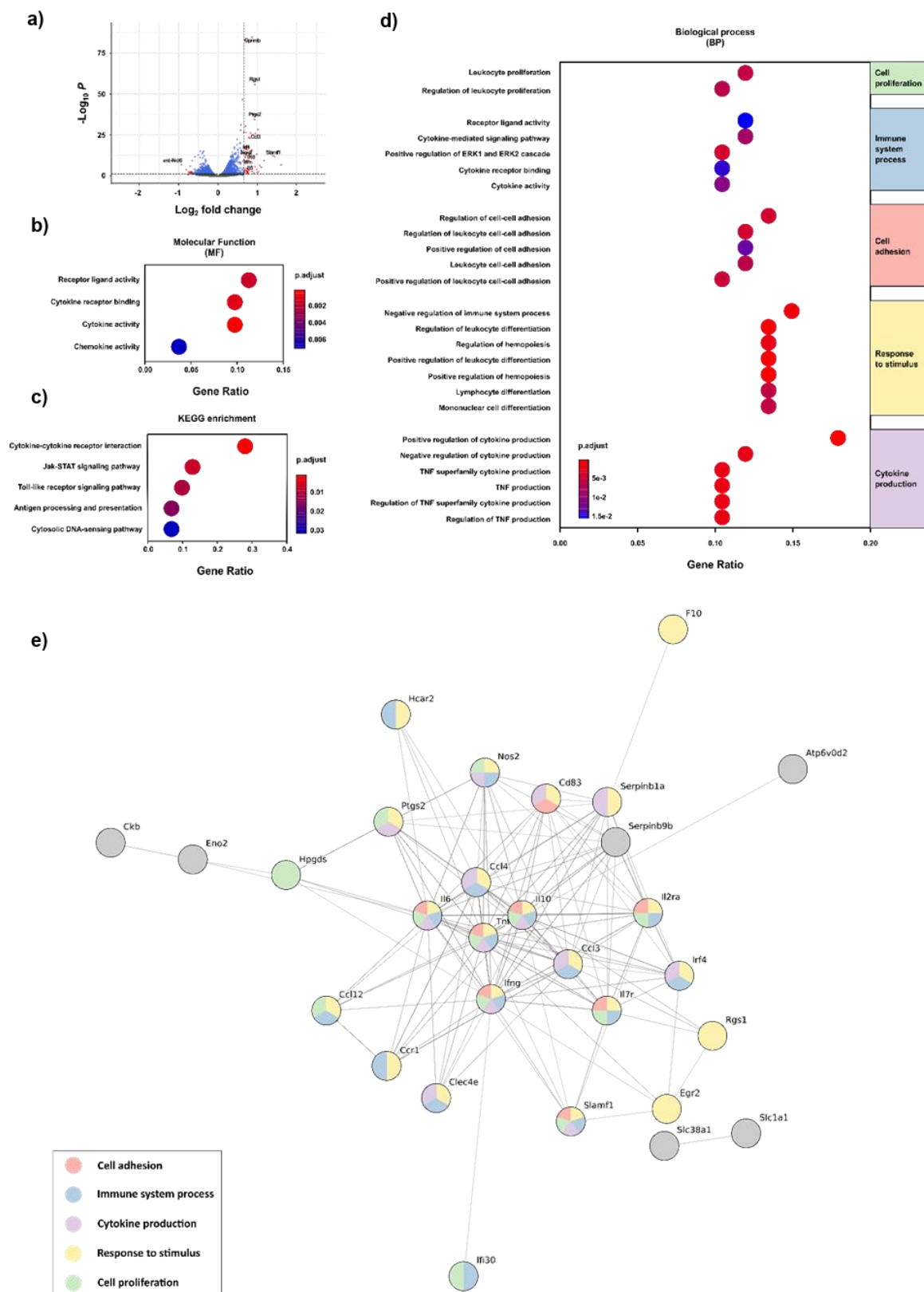
- Pilmis, B., Yang, Z., Lanternier, F., et al Lortholary, O. (2017). Systemic Candidiasis. *Infectious Diseases*, 439-445.e1. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6285-8.00049-6>
- Poisson, J., Lemoine, S., Boulanger, C., Durand, F., Moreau, R., Valla, D., et al Rautou, P. E. (2017). Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases. *Journal of Hepatology*, 66(1), 212–227. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.07.009>
- Ramirez-Garcia, A., Arteta, B., Abad-Diaz-de-Cerio, A., Pellon, A., Antoran, A., Marquez, J., Rementeria, A., et al Hernando, F. L. (2013). *Candida albicans* Increases Tumor Cell Adhesion to Endothelial Cells In Vitro: Intraspecific Differences and Importance of the Mannose Receptor. *PLoS ONE*, 8(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053584>
- Ramirez-Garcia, A., Gallot, N., Abad, A., Mendoza, L., Rementeria, A., et al Hernando, F. L. (2011). Molecular fractionation and characterization of a *Candida albicans* fraction that increases tumor cell adhesion to hepatic endothelium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(1), 133–145. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3540-8>
- Shetty, S., Lalor, P. F., et al Adams, D. H. (2018). Liver sinusoidal endothelial cells — gatekeepers of hepatic immunity. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 15(9), 555–567. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0020-y>
- Talapko, J., Juzbašić, M., Matijević, T., Pustijanac, E., Bekić, S., Kotris, I., et al Škrlec, I. (2021). *Candida albicans* - The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. *Journal of Fungi*, 7(2), 79. <https://doi.org/10.3390/jof7020079>
- Tanaka, Y., Zhang, L., Ikuta, T., Omori, J., Omine, H., Mega, J., Kuboyama, N., et al Abiko, Y. (2011). TNF- α Expression in Oral *Candida albicans*-Infected Human Gingival Epithelial Cells. *International Journal of Oral-Medical Sciences*, 10(2), 77–82. <https://doi.org/10.5466/ijoms.10.77>
- Thompson, D. S., Carlisle, P. L., et al Kadosh, D. (2011). Coevolution of Morphology and Virulence in *Candida* Species. *Eukaryotic Cell*, 10(9), 1173–1182. <https://doi.org/10.1128/EC.05085-11>
- Vidal-Vanaclocha, F., Fantuzzi, G., Mendoza, L., Fuentes, A. M., Anasagasti, M. J., Martín, J., Carrascal, T., Walsh, P., Reznikov, L. L., Kim, S.-H., Novick, D., Rubinstein, M., et al Dinarello, C. A. (2000). IL-18 regulates IL-1 β -dependent hepatic melanoma metastasis via vascular cell adhesion molecule-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(2), 734–739. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.2.734>

- Wan, Y., Li, X., Slevin, E., Harrison, K., Li, T., Zhang, Y., Klaunig, J. E., Wu, C., Shetty, A. K., Dong, X. C., et al Meng, F. (2022). Endothelial dysfunction in pathological processes of chronic liver disease during aging. *FASEB Journal*, 36(1). <https://doi.org/10.1096/fj.202101426R>
- Wang, S. H., Wang, S. C., Chen, P. C., Wang, S. T., et al Liu, Y. W. (2017). Induction of cyclooxygenase-2 gene by *Candida albicans* through EGFR, ERK, and p38 pathways in human urinary epithelium. *Medical Mycology*, 55(3), 314–322. <https://doi.org/10.1093/mmy/myw082>
- Wang, Y., et al Liu, Y. (2021). Gut-liver-axis: Barrier function of liver sinusoidal endothelial cell. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 36(10), 2706–2714. <https://doi.org/10.1111/jgh.15512>
- Wells, C. A., Salvage-Jones, J. A., Li, X., Hitchens, K., Butcher, S., Murray, R. Z., Beckhouse, A. G., Lo, Y.-L.-S., Manzanero, S., Cobbold, C., Schroder, K., Ma, B., Orr, S., Stewart, L., Lebus, D., ... Ashman, R. B. (2008). The Macrophage-Inducible C-Type Lectin, Mincle, Is an Essential Component of the Innate Immune Response to *Candida albicans*. *The Journal of Immunology*, 180(11), 7404–7413. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.11.7404>
- Zhang, J., Peng, J., Li, D., Mei, H., Yu, Y., Li, X., She, X., et al Liu, W. (2022). Divergent EGFR/MAPK-Mediated Immune Responses to Clinical *Candida* Pathogens in Vulvovaginal Candidiasis. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.894069>
- Zou, J., et al Shankar, N. (2015). Roles of TLR/MyD88/MAPK/NF- κ B Signaling Pathways in the Regulation of Phagocytosis and Proinflammatory Cytokine Expression in Response to *E. faecalis* Infection. *PLOS ONE*, 10(8), e0136947. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136947>

8. ERANSKINAK



Eranskinen 1. irudia. *C. albicans*-ek aktibatuturiko bideak epitelio zeluletan. Aktibazio bideak ondoaren formaren arabekoak dira. Legamiak NF- κ B eta MAPK bideen aktibazio leuna eragingo du. Hifak, aldiz, NF- κ B zein MAPK bideen aktibazio gogorra piztuko du. Pellon et al. (2020) artikulutik hartutako irudia.



Eranskinen 2. irudia. Análisi transkriptomikoan lortutako emaitzak. a) Adierazpenaren inguruko análisisia. b) Funtzio Molekularren análisisia. c) KEGG bideen funtzionalitate análisisia. d) Prozesu Biologikoen análisisia. e) STRING Database tresnaren bidez eraikitako geneen asoziazio análisisia. Kolore bakoitza Prozesu Biologiko bati dagokio.

Eranskinen 1. taula. RT-qPCR bidez aztertu ziren geneak amplifikatzeko erabilitako hasleen sekuentziak.

Genea	Aurreranzko haslea (5' → 3')	Atzeranzko haslea (3' → 5')
Nfkb1	ACAGCCCACTGCTATCTCTGA	GTCAGGGCTTTGGTTTACACA
Jnk	CAATGTCCACAGATCCGACTT	AGTCATCTACAGCAGCCCAGA
Erk	ACACCAACCTCTCGTACATCG	GTCTGGTGCTCAAAAGGACTG
P38	GCTGAACAAAGGGAGAGACGA	GGGCCTTGATGACTTGGTTTG
Cfos	ACTTCGACCATGATGTTCTCG	GCTGGGGAATGGTAGTAGGAA
Rpl19	GACCAAGGAAGCACGAAAGC	CAGGCCGCTATGTACAGACA

Eranskinen 2. taula. qPCRak egiteko erabilitako CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) termozikladoreko programa.

Pausoa	Temperatura (°C)	Denbora (s)	Ziklo kopurua
Entzimaren aktibazioa	95	120	1
Desnaturalizazioa	95	5	39
Hibridazioa / elongazioa	60.6	20	