

Tomasz Jagielski<sup>1\*</sup>, Elżbieta Rup<sup>2†</sup>, Anna B. Macura<sup>2</sup>, Jacek Bielecki<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

<sup>2</sup>Zakład Mykologii, Katedra Mikrobiologii, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

Wpłynęło w styczniu 2013 r.

Spis treści: 1. Wprowadzenie. 2. Taksonomia i klasyfikacja grzybów z rodzaju *Malassezia*. 3. Mikrobiologia grzybów z rodzaju *Malassezia*. 3.1. Charakterystyka ogólna. 3.2. Metabolizm. 3.3. Aktywność enzymatyczna. 4. Interakcje grzybów *Malassezia* sp. z innymi mikroorganizmami. 5. Interakcje grzybów *Malassezia* sp. z układem immunologicznym. 5.1. Serologia i budowa antygenowa. 5.2. Interakcje z układem dopełniacza. 5.3. Wpływ grzybów *Malassezia* sp. na różne populacje komórek w skórze. 6. Podsumowanie

#### Characterization of fungi of the *Malassezia* genus. I. Microbiological and immunological aspects

**Abstract:** The yeasts of the *Malassezia* genus, first described over a century ago, belong to the physiological microflora of the human skin. However, they may occasionally act as opportunistic pathogens resulting in different dermatological pathologies, of which pityriasis versicolor is most frequently diagnosed. Two principle features of the genus *Malassezia* are distinctive morphology and requirement for external lipid source for growth. To date, the genus accommodates 14 species, all but one being lipid-dependent species. The very recently completed sequencing of the *M. globosa* genome disclosed the presence of multiple secreted lipases to help the yeasts to utilize cutaneous lipids. Very little is known about interactions between *Malassezia* organisms and the human host. It is clear however that *Malassezia* fungi display two phenotypes within the skin, one – immunostimulatory, and the other immunosuppressive, which are responsible for commensal and pathogenic behavior of the fungi, respectively.

This article provides a concise and up-to-date description of the *Malassezia* genus, with particular attention to the microbiology of the fungi and their interactions with the immune system of the human host.

**Content:** 1. Introduction. 2. Taxonomy and classification of *Malassezia* fungi. 3. Microbiology of *Malassezia* fungi. 3.1. General characteristics. 3.2. Metabolism. 3.3. Enzymatic activity. 4. Interactions of *Malassezia* fungi with other microorganisms. 5. Interactions of *Malassezia* fungi with the immune system. 5.1. Serology and antigenic structure. 5.2. Interactions with the complement system. 5.3. Influence of *Malassezia* fungi on different cell populations within the skin. 6. Conclusions

**Słowa kluczowe:** atopowe zapalenie skóry (AZS), grzybice, łuszczyca, *Malassezia* sp., zakażenia skóry

**Key words:** atopic dermatitis (AD), *Malassezia* sp., mycoses, psoriasis, skin infections

## 1. Wprowadzenie

Grzyby z rodzaju *Malassezia* należą do patogenów oportunistycznych o istotnym znaczeniu klinicznym dla ludzi i niektórych zwierząt. Mogą być izolowane ze zdrowej skóry oraz powodować pewne choroby dermatologiczne, a w przypadku znacznego obniżenia odporności, mogą także przyczynić się do wystąpienia zakażeń ogólnoustrojowych. Do najczęściej występujących dermatoz związanych z infekcją grzybami z rodzaju *Malassezia* u ludzi należą łupież pstry (*pityriasis versicolor*) oraz zapalenie mieszków włosowych (*Malassezia folliculitis*). Grzyby z rodzaju *Malassezia* mogą również nasilać zmiany chorobowe w schorzeniach, takich jak łojotokowe zapalenie skóry (*dermatitis seborrhoica*) oraz zaostrzać przebieg łuszczycy (*psoriasis*) i atopowego zapalenia skóry (*dermatitis atopica*) [3, 9, 17, 28, 37, 38]. Częstość powierzchniowych zakażeń grzybiczych wywołanych przez grzyby z rodzaju *Malassezia* zależy

od wielu różnorodnych czynników, w tym od warunków socjoekonomicznych, klimatycznych czy geograficznych. Dzięki badaniom z zakresu biologii molekularnej zidentyfikowano obecnie 14 gatunków *Malassezia*, w tym 13 lipidozależnych (*M. furfur*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. sympodialis*, *M. slooffiae*, *M. nana*, *M. dermatitis*, *M. restricta*, *M. equina*, *M. japonica*, *M. yamatoensis*, *M. caprae* i *M. cuniculi*) oraz jeden gatunek lipidoniezależny (*M. pachydermatis*) [17, 38, 39, 60, 61].

Łuszczyca (*psoriasis*) jest jedną z najczęściej występujących przewlekłych zapalnych chorób skóry. Szacuje się, że około 1–5% populacji europejskiej choruje na łuszczycę. Patogeneza łuszczycy nie jest do końca poznana. Istnieje wiele czynników predysponujących do wystąpienia choroby, wśród których ważne miejsce zajmują czynniki genetyczne. Zakażenia zarówno systemowe jak i miejscowe wywołane przez paciorkowce beta-hemolizujące, czy grzyby z rodzaju *Candida* stanowią znany czynnik inicjujący epizod łuszczycy wysiewnej czy

\* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski; ul. I. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel.: +48 (0) 22 55-41-312; fax: +48 (0) 22 55-41-402; e-mail: t.jagielski@biol.uw.edu.pl.

† Autorzy w równym stopniu przyczynili się do powstania pracy.

zaostarzający przebieg łuszczycy plackowatej. W wielu badaniach wykazano, że stymulacja leukocytów jednojądrzastych krwi obwodowej pacjentów z łuszczycą przez superantygeny paciorkowców grupy A wiązała się ze znacznie zwiększoną odpowiedzią proliferacyjną oraz uwalnianiem cytokin prozapalnych przez leukocyty [6, 13, 41]. Wiele badań klinicznych i przedklinicznych potwierdza udział grzybów z rodzaju *Malassezia* w rozwoju zmian łuszczycowych, zwłaszcza w przypadku łuszczycy owłosionej skóry głowy oraz okolicy narządów płciowych [49, 63]. Obecnie uważa się, że grzyby z rodzaju *Malassezia* mogą nasilać przebieg łuszczycy poprzez uwalnianie cytokin prozapalnych, aktywację czynników przyspieszających proliferację keratynocytów oraz wydzielanie enzymów hydrolitycznych [3].

Atopowe zapalenie skóry (*atopic dermatitis*, AD, AZS) jest przewlekłą, nawrotową dermatozą świądową dotyczącą głównie wieku dziecięcego. AZS może przebiegać jako izolowane schorzenie lub stanowić manifestację ogólnoustrojowych zaburzeń o podłożu alergicznym wraz z katarą sienną, astmą oskrzelową czy alergiami pokarmowymi. Wśród osób dorosłych AZS obserwuje się u 1–3% populacji. Choroba może pojawić się po raz pierwszy w wieku dorosłym, utrzymywać się od okresu dziecięcego lub nawrócić po wieloletniej remisji [42, 64]. Grzyby z rodzaju *Malassezia* wydają się stanowić istotny czynnik w patogenezie AZS u osób dorosłych, zwłaszcza ze zmianami skórnymi zlokalizowanymi na głowie i szyi [24]. Częstość występowania grzybów z rodzaju *Malassezia* na skórze dorosłych pacjentów z AZS oraz w populacji zdrowej jest podobna i wynosi między 50% a 80%, w zależności od zastosowanej metody badawczej. Natomiast w przypadku pacjentów z AZS znacząco częściej obserwuje się dodatnie testy skórne z alergenami *Malassezia* sp. oraz wysokie miana swoistych przeciwciał w klasie IgE przeciwko *Malassezia* sp. w surowicy chorych w porównaniu do grup kontrolnych [5, 45, 56]. Stąd, obecnie uważa się, że grzyby *Malassezia* sp. stanowią raczej czynnik alergizujący niż infekcyjny w przypadku pacjentów z AZS. Nasilenie zmian skórnych u pacjentów z AZS

może nastąpić również na drodze aktywacji procesów zapalnych poprzez uwalnianie przez grzyby *Malassezia* sp. enzymy hydrolityczne [1, 58].

Dokładne poznanie mechanizmów immunomodulacyjnych u grzybów z rodzaju *Malassezia* wymaga dalszych badań. Dostępne obecnie dane sugerują, że u osób ze zdrową skórą (z prawidłową barierą skórno-naskórkową) grzyby *Malassezia* sp. wywierają efekt immunosupresyjny, co pozwala im przetrwać w roli komensala, natomiast w przypadku pacjentów z łuszczycą lub atopowym zapaleniem skóry grzyby stymulują odpowiedź zapalną, która nasila przebieg choroby podstawowej i przyczynia się do podtrzymywania zmian skórnych [3].

## 2. Taksonomia i klasyfikacja grzybów z rodzaju *Malassezia*

Grzyby z rodzaju *Malassezia* są uznawane za składnik mikroflory skóry u ludzi i niektórych zwierząt od ponad 150 lat. *Malassezia* sp. należą do grzybów dimorficznych, występujących zarówno w fazie mycelialnej, jak i drożdżowej. Przez wiele lat obie formy morfologiczne uznawano za odrębne gatunki. Związek pomiędzy występowaniem *Malassezia* sp. a zmianami skórnymi po raz pierwszy zaobserwował E i c h s t e d t w 1846 roku. Uczony ten w łuskach pobranych ze skóry chorobowo zmienionej pacjenta z łupieżem pstrym zaobserwował strzępki grzybni. Następnie, w 1874 roku M a l a s s e z zaobserwował i opisał obecność komórek o kształcie owalnym i okrągłym w zeszkobinach naskórka od pacjentów z łupieżem. Nazwę *Malassezia* zaproponował w 1889 roku B a i l l o n na cześć wspomnianego wcześniej badacza. W warunkach *in vitro* grzyby z rodzaju *Malassezia* wyhodowali po raz pierwszy C a s t e l l a n i i C h a l m e r s w 1913 roku. Badacze ci scharakteryzowali ich właściwości wzrostowe oraz wprowadzili nazwę *Pityrosporium ovale*. W 1925 roku W e i d m a n n wyodrębnił w hodowli gatunek – *Malassezia pachydermatis*. (Gatunek ten nie należy do fizjologicznej flory skóry człowieka; izolowany jest natomiast ze skóry

Tabela I

Pozycja taksonomiczna grzybów z rodzaju *Malassezia*

<b>Królestwo:</b>	Fungi			
<b>Typ:</b>	Basidiomycota			
<b>Klasa:</b>	Ustilagomycetes			
<b>Podklasa:</b>	Exobasidiomycetidae			
<b>Rząd:</b>	Malasseziales			
<b>Rodzaj:</b>	<i>Malassezia</i>			
<b>Gatunki:</b>	<i>M. furfur</i>	<i>M. restricta</i>	<i>M. pachydermatis</i>	<i>M. nana</i>
	<i>M. sympodialis</i>	<i>M. globosa</i>	<i>M. japonica</i>	<i>M. yamatoensis</i>
	<i>M. slooffiae</i>	<i>M. obtusa</i>	<i>M. dermatis</i>	<i>M. equine</i>
	<i>M. caprae</i>			

ptaków i ssaków, w tym często – zwierząt domowych). W 1951 roku G o r d o n wyizolował ze zmian skórnych u chorych z łupieżem pstry, a także ze zdrowej ludzkiej skóry – komórki przypominające drożdże – kuliste lub owalne, otoczone podwójną otoczką i nadał im nazwę *Pityrosporum orbiculare* [33, 69]. Dopiero w 1977 roku udało się w warunkach *in vitro* wykazać konwersję z fazy drożdżopodobnej do mycelialnej, przy czym okazało się, że zarówno komórki okrągłe jak i owalne mogą wytwarzać grzybnię. Odkrycie to umożliwiło zatwierdzenie jednego gatunku – *Malassezia furfur* w 1984 roku, zawierającego wcześniej opisywane stadia: *P. ovale*, *P. orbiculare* i *M. furfur* [68]. Kolejnym przełomem w taksonomii grzybów z rodzaju *Malassezia* były badania G u i l l o t i G u e h o w 1995 roku, które umożliwiły wyodrębnienie 7 gatunków *Malassezia*: *M. furfur*, *M. pachydermatis*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. slooffiae* [36]. W wyniku dalszych badań opisano kolejne gatunki: *M. dermatitis* (S u g i t a i w s p. 2002) [62], *M. equine* (N e l l i w s p. 2002) [52], *M. japonica* (S u g i t a i w s p. 2003) [61], *M. nana* (H i r a i i w s p. 2003) [40], *M. yamatoensis* (S u g i t a i w s p. 2004) [60], *M. caprae* (C a b a ñ e s i w s p. 2007) [18] oraz *M. cuniculi* (C a b a ñ e s i w s p. 2011) [19]. Obecnie obowiązującą pozycję taksonomiczną grzybów z rodzaju *Malassezia* przedstawiono w tabeli I.

### 3. Mikrobiologia grzybów z rodzaju *Malassezia*

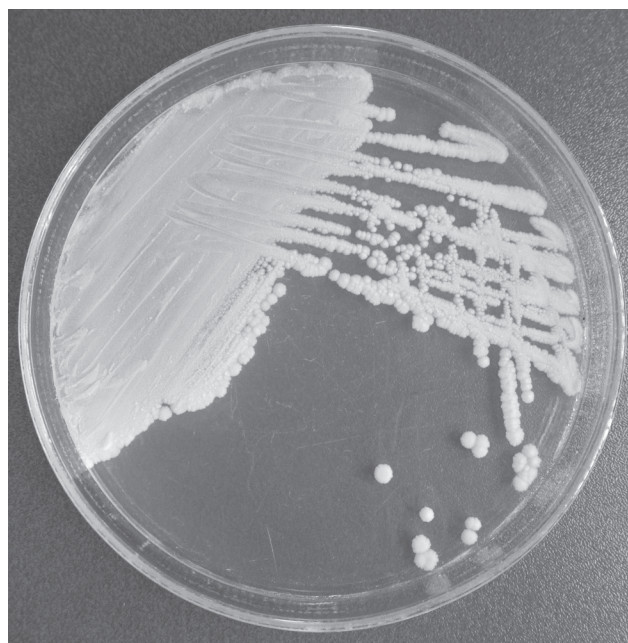
#### 3.1. Charakterystyka ogólna

*Malassezia* sp. jako grzyby dimorficzne mogą występować w warunkach naturalnych zarówno w fazie mycelialnej jak i drożdżowej. W warunkach hodowlanych dominuje postać drożdżowa, przy czym opisywano również spontaniczne tworzenie formy mycelialnej przez niektóre gatunki *Malassezia* także w warunkach *in vitro* [23, 30, 51]. Zaobserwowano, że niektóre składniki podłoży mogą stymulować tworzenie grzybni przez *Malassezia* sp. D o r n i R o e h n e r t [30] obserwowali wzrost formy mycelialnej *Malassezia* sp. po dodaniu do podłoża glicyny, natomiast N a z z a r o i w s p. [51] uzyskali ten sam efekt wykorzystując cholesterol i estry cholesterolu. Rozmnażanie bezpłciowe grzybów z rodzaju *Malassezia* zachodzi przez pączkowanie drożdżowej komórki macierzystej.

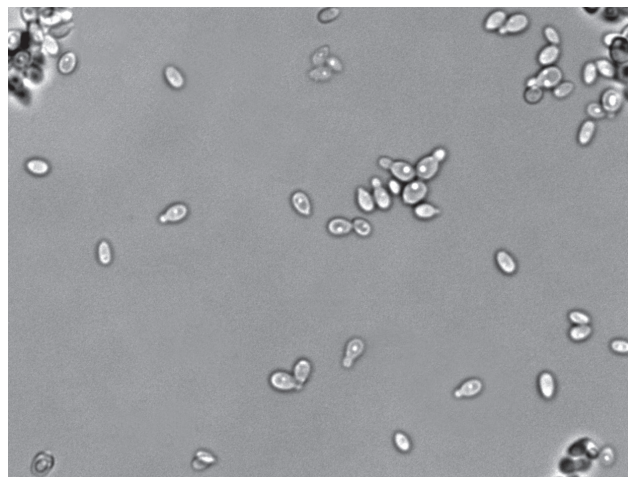
Ze względu na znaczne trudności w hodowli *Malassezia* sp., grzyby te w warunkach *in vitro* łatwo giną. (Jako, że grzyby z rodzaju *Malassezia* wymagają do wzrostu długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, do hodowli używa się specjalnych podłoży agarowych, wg formuły D i x o n a lub L e e m i n g a - N o t m a n a, suplementowanych żółcią bydlęcą oraz oksyetylenowanymi estrami sorbitolu i kwasów tłuszczowych (tzw. Tween-y) [34]).

Kształt i wielkość komórek różnią się między poszczególnymi gatunkami. Rozmiar komórek waha się od ok. 1,5 do 8  $\mu\text{m}$ . Również w wyglądzie kolonii są wyraźne różnice międzygatunkowe. Cechy morfologii kolonii i komórek grzybów *Malassezia* sp. stanowią kryteria diagnostyczne w identyfikacji gatunkowej (Rys. 1–2) (Tabela II).

Na poziomie ultrastrukturalnym, kluczową cechą charakteryzującą wszystkie podstawczaki (*Basidiomycota*) jest wielowarstwowa ściana komórkowa. Ściana grzybów *Malassezia* sp. jest jednak unikalna w królestwie grzybów. Jest znacznie grubsza (około 0,12  $\mu\text{m}$ ) niż ściana innych drożdży i zawiera znacząco większy odsetek tłuszczów w porównaniu na przykład z grzybami z rodzaju *Saccharomyces* (15–20% vs 1–2%). Ściana



Ryc. 1. Kolonie *Malassezia* sp. na podłożu Dixona po 10 dniach hodowli



Ryc. 2. Pączkujące komórki *Malassezia* sp. Preparat mikroskopowy z hodowli



Tabela II

Charakterystyka wybranych gatunków grzybów z rodzaju *Malassezia*

Cecha	<i>M. furfur</i>	<i>M. sympodialis</i>	<i>M. globosa</i>	<i>M. slooffiae</i>	<i>M. restricta</i>	<i>M. obtusa</i>	<i>M. pachydermatis</i>
Morfologia kolonii	gładkie, miękkie, kruche	gładkie, miękkie, płaskie	szorstkie, serowate, kruche	pofałdowane, kruche	gładkie, nieregularne kruche	gładkie,	gładkie, miękkie, kruche, wypukłe
Barwa	kremowa	kremowa / beżowa	kremowa / beżowa	kremowa / beżowa	kremowa	kremowa	kremowa
Kształt, wielkość komórki	owalne, kuliste, średnica: 6 µm	kuliste, elipsoidalne, średnica: 2,5–5 µm	kuliste, średnica: 6–8 µm	cyldryczne długość: 1,5–3,5 µm	kuliste, owalne, średnica: 2–4 µm	cyldryczne długość: 4–6 µm	cyldryczne długość: 2,5–5 µm
Typ pączkowania	szeroka podstawa	sympodialne	wąska podstawa	szeroka podstawa	wąska podstawa	szeroka podstawa	szeroka podstawa
Wytwarzanie katalazy	+	+	+	+	+	–	zmienne
Wytwarzanie ureazy	+	+	+	+	+	+	+
Wzrost w temp. 37°C	dobry	dobry	słaby	dobry	słaby	słaby	dobry
Max. temp. wzrostu [°C]	40–41	40–41	38	40–41	38	38	40–41
Asymilacja Tween 20	+	–	–	+	–	–	+
Asymilacja Tween 40 lub 60	+	+	–	+	–	–	+
Asymilacja Tween 80	+	+	–	–	–	–	+
Rozdział eskuliny	–	+	–	–	–	+	zmienny

*Malassezia* sp. ma wielowarstwową strukturę, w obrębie której wyróżnia się zewnętrzną powłokę o budowie lamelarnej, właściwą ścianę komórkową oraz błonę cytoplazmatyczną (nie należy do ściany komórkowej *sensu stricto*) o charakterystycznym pofałdowanym wzorze, widocznym w mikroskopie elektronowym. Głównymi składnikami ściany komórkowej *Malassezia* sp. są wielocukry – 70%, tłuszcze – 15–20% i białka – 10%. Struktura ściany komórkowej *Malassezia* sp. oraz wysoka odsetkowa zawartość lipidów odpowiadają najprawdopodobniej za znaczącą odporność *Malassezia* sp. na warunki zewnętrzne, w tym czynniki mechaniczne czy osmotyczne [4, 35, 59] oraz stanowią istotny czynnik wirulencji grzyba. Lipofilność ściany komórkowej *Malassezia* sp. ułatwia adhezję komórek grzyba do komórek gospodarza, utrudnia fagocytozę patogenu oraz hamuje odpowiedź zapalną [43, 50].

Liczba i kształt mitochondriów w każdej komórce *Malassezia* sp. wykazuje dużą zmienność. Jądro komórkowe posiada wyraźnie zaznaczoną błonę jądrową, otaczającą ziarna homogennej nukleoplazmy [59].

### 3.2. Genetyka

Badanie chromosomowego DNA grzybów z rodzaju *Malassezia* techniką pulsacyjnej elektroforezy żelowej (PFGE, *pulsed field gel electrophoresis*) wykazało istotne różnice międzygatunkowe zarówno w zakresie kariotypu, jaki i wielkości genomu (Tabela III) [11, 12].

Ogólnie, genom grzybów *Malassezia* sp. należy do najmniejszych spotykanych u grzybów wolno żyjących. Jego wielkość waha się między 6,4 a 14 Mbp. Liczba chromosomów wynosi od 5 w szczepach *M. pachydermatis* do 11 w szczepach *M. furfur*. Różna jest też zawartość par G+C rozpięta między 53,5% (*M. globosa*) a 68,7% (*M. slooffiae*).

Spośród 14 gatunków *Malassezia*, pełną sekwencję nukleotydową genomu ustalono jedynie dla *M. globosa* (szczep referencyjny CBS 7877) [67]. Genom *M. globosa* (8,9 Mbp) zawiera tylko 4.285 sekwencji kodujących białka, czyli mniej niż jakkolwiek inny poznany genom grzybów wolno żyjących. W genomie *M. globosa* stwierdza się także niewielką liczbę intronów (obecnych w 27% genów) oraz sekwencji repetytywnych (<0.8% wielkości genomu). Niewielki genom *M. globosa*, podob-

Tabela III

Wybrane właściwości genomu *Malassezia* sp.

Gatunek	Liczba chromosomów	Wielkość genomu [Mbp]	Zawartość par G+C [%]
<i>M. pachydermatis</i>	5	6,7–9,3	55,6
<i>M. furfur</i>	7–11	8,5–14	66,4
<i>M. globosa</i>	8	8,5–8,9	53,5
<i>M. obtusa</i>	6	7,4	60,7
<i>M. sympodialis</i>	7	6,4–7,8	62,2
<i>M. slooffiae</i>	7	8,6	68,7
<i>M. restricta</i>	9	8,0	59,9

nie jak innych gatunków z rodzaju *Malassezia*, traktuje się jako przejaw adaptacji tych grzybów do wzrostu w bardzo wąskiej niszy ekologicznej, tj. na skórze zwierząt ciepłokrwistych [22].

Cechą charakterystyczną genomu *M. globosa* jest nieobecność wielu genów związanych z metabolizmem kwasów tłuszczowych, w tym genów kodujących syntazę kwasów tłuszczowych (FAS),  $\Delta 9$ -desaturazę, czy izomerazę  $\Delta^{2,3}$ -enoilo CoA. Braki te kompensowane są obecnością, występujących w wielu kopiach, genów kodujących sekrecyjne lipazy i fosfolipazy, umożliwiające asymilację kwasów tłuszczowych z zewnętrznych źródeł.

Analiza genomowa (i proteomiczna) wykazała, że genom *M. globosa* niesie geny kodujące białka podobne wszystkim dotąd opisanym białkom alergizującym *M. furfur* (Mala f2-4) i *M. sympodialis* (Mala s1, s5-13) [67].

W genomie *M. globosa* wykryto geny homologiczne do genów *TAM1* i *SIR1*, opisanych wcześniej dla głównej kukurydzy (*Ustilago maydis*), fitopatogenicznego grzyba, z którym – jak wykazała analiza porównawcza sekwencji genomowych – *M. globosa* dzieli wysokie pokrewieństwo filogenetyczne. Gen *TAM1* koduje aminotransferazę tryptofanową, enzym odpowiedzialny za przekształcenie tryptofanu do pirogronianu indolu, którego pochodne wykrywa się w szczepach *M. furfur*. Te barwne związki (pigmenty, m. in. pityriarubiny, pityrialakton, malassezyna) wykazują różne działanie biologiczne, które wiąże się ze zmianami zabarwienia skóry w przebiegu łupieżu pstrego. W powstawaniu barwnych pochodnych indolowych uczestniczy też enzym reduktaza siarczynowa. Mutacje w kodującym ją genie *SIR1* znacząco ograniczają tworzenie się tych związków [70].

W końcu, mimo, że grzyby *Malassezia* sp. znane są wyłącznie jako formy anamorficzne (haploidalne, rozmanażające się bezpłciowo), analiza sekwencyjna genomu *M. globosa* pozwoliła zidentyfikować region genetyczny (*MAT*, *mating type locus*) związany z rozmnażaniem płciowym tych grzybów. W obrębie omawianego locus wykryto geny kodujące feromony, ich błonowe receptory oraz homeodomenowe czynniki transkrypcyjne [67].

### 3.3. Metabolizm

Z wyjątkiem *M. pachydermatis*, wszystkie poznane gatunki *Malassezia* są lipidozależne, tj. wymagają zewnętrznych źródeł lipidów do wzrostu. Zapotrzebowanie *Malassezia* sp. na tłuszcze zaobserwowano po raz pierwszy już w 1939 roku [10]. Obecnie wiadomo, że lipidozależność *Malassezia* sp. wynika z braku zdolności syntezy kwasu mirystynowego, który stanowi prekursor długołańcuchowych kwasów tłuszczowych [57]. Skład lipidowy *Malassezia* sp. jest zmienny i w dużej mierze zależy od źródła dostępnych tłuszczów. *Malassezia* sp.

najczęściej wykorzystują trójglicerydy, wolne kwasy tłuszczowe oraz estry kwasów tłuszczowych. Opisano również asymilację fosfolipidów oraz cholesterolu i estrów cholesterolu [25].

Wiedza na temat metabolizmu grzybów z rodzaju *Malassezia*, z wyjątkiem metabolizmu lipidów, jest ograniczona. Z uwagi na lipidozależność większości gatunków, wyniki testów asymilacji węglowodanów znane są wyłącznie dla *M. pachydermatis*. Wykazano, że gatunek ten ma zdolność wykorzystywania jako źródło węgla mannitolu, sorbitolu i glicerolu. Żaden z gatunków *Malassezia* nie fermentuje cukrów. Wzrost tych grzyby nie zależy również od obecności w podłożu witamin [10, 48]. Jako źródło siarki *Malassezia* sp. najczęściej wykorzystują metioninę, rzadziej cystynę i cysteinę, natomiast źródło azotu mogą stanowić zarówno organiczne (różne aminokwasy) jak i nieorganiczne związki, przy czym *Malassezia* nie asymilują azotanów potasu [48].

W warunkach naturalnych i standardowej hodowli *Malassezia* sp. rosną tlenowo. Mogą jednak tolerować również warunki mikroaerofilne lub nawet beztlenowe [31].

### 3.4. Aktywność enzymatyczna

Brak zdolności syntetyzowania własnych kwasów tłuszczowych przez *Malassezia* sp. i konieczność wykorzystywania zewnątrzpochodnych źródeł lipidów znajduje swoje odzwierciedlenie w produkcji licznych zewnątrzkomórkowych enzymów hydrolitycznych, w tym lipaz oraz fosfolipaz.

Badania dotyczące właściwości lipolitycznych grzybów z rodzaju *Malassezia* są prowadzone od wielu lat. Już w 1978 roku C a t t e r a l l i wsp. wykazali obecność zewnątrzkomórkowej lipazy w warunkach *in vitro* [21]. W badaniach przeprowadzonych w latach 90. ubiegłego wieku M a y s e r i wsp. zaobserwowali istotne różnice w aktywności lipolitycznej między poszczególnymi gatunkami *Malassezia* oraz zróżnicowanie w asymilacji odmiennych kwasów tłuszczowych [46, 47]. W badaniu wykazano znacząco szybszy wzrost *Malassezia* sp. po dodaniu do podłoża nienasyconych kwasów tłuszczowych w porównaniu z nasyconymi kwasami tłuszczowymi. Różnice w aktywności lipolitycznej grzybów z rodzaju *Malassezia* wykorzystane zostały do opracowania testów diagnostycznych (testy asymilacji „Tweenów”, czy kremoforu EL), które stanowią obecnie ważne kryterium klasyfikacji gatunkowej *Malassezia* sp. (Tabela II) [47].

W 2006 roku B r u n k e i H u b e po raz pierwszy sklonowali i w pełni scharakteryzowali gen lipazy *M. furfur* i opisali go jako *MfLIP1* [14]. *MfLIP1* składa się 1464 par zasad i koduje enzym o masie cząsteczkowej 54,3 kDa. Maksymalną aktywność lipazy obserwowano w temperaturze 40°C, a optymalne dla niej pH

wynosiło 5,8. Badany enzym hydrolizował Tween'y, a także wykazywał nieznaczną aktywność fosfolipazy. W niedługim czasie po MfLIP1 wykryto geny dwóch kolejnych lipaz: gen lipazy sekrecyjnej *M. pachydermatis*, kodujący enzym o aktywności esterazy i masie cząsteczkowej 48,1 kDa oraz optymalnym pH 7,5 [54] oraz gen *LIP1* kodujący lipazę *M. globosa* – enzym o masie cząsteczkowej 32 kDa i optymalnym pH 5,5 [27]. W warunkach *in vitro*, oczyszczona, rekombinowana lipaza *M. globosa* hydrolizowała monogliceridy i dwugliceridy, a nie rozkładała trójglicerydów, natomiast w badaniach enzymatycznych z wykorzystaniem hodowli *M. globosa* wykazano również hydrolizę trójglicerydów, co wskazywało na obecność dodatkowych lipaz u *M. globosa*. Jak już wspomniano, analiza sekwencyjna genomu *M. globosa* wykazała obecność wielu kopii genów kodujących zewnątrzkomórkowe hydrolazy, w tym 14 lipaz, 9 fosfolipaz, 2 oksydoreduktaz cholinowych, sfingomielinaz i licznych proteaz, ulegających ekspresji w momencie kolonizacji tkanek gospodarza przez grzyb [67]. Według wielu badaczy aktywność lipolityczna *Malassezia* sp. jest jednym z podstawowych czynników prowadzących do rozwoju łupieżu i łojotokowego zapalenia skóry. Hydrolizując trójglicerydy grzyby *Malassezia* sp. uwalniają wolne kwasy tłuszczowe, które stanowią istotny czynnik drażniący i nasilający reakcję zapalną w tkankach gospodarza [55].

Zdolność produkcji fosfolipaz i aktywacja kaskady kwasu arachidonowego może stanowić dodatkowy czynnik prowadzący do uszkodzenia tkanek gospodarza w przebiegu infekcji *Malassezia* sp. Wytwarzanie fosfolipaz przez grzyby z rodzaju *Malassezia* zaobserwowano zarówno w warunkach *in vivo* jak i *in vitro* w hodowlach linii komórkowych Hep-2, przy czym stwierdzono, że szczepy patogenne *Malassezia* sp. wykazują znacząco większą aktywność fosfolipazy [53]. Cafarchia i Ontranto w badaniach nad szczepami *M. pachydermatis* izolowanymi od psów ze zmianami grzybiczymi i zdrowych zaobserwowali, że szczepy *M. pachydermatis* pochodzące ze zmian skórnych znacząco częściej wykazywały aktywność fosfolipazy od szczepów izolowanych ze skóry psów zdrowych (94% versus 10,6%) [20].

Grzyby *Malassezia* sp. produkują również enzymy o właściwościach lipooksygenazy i lipoperoksydazy. Zwiększony poziom nadtlenników lipidowych i ich pochodnych obserwowano w skórze chorobowo zmienionej u pacjentów z łupieżem pstym oraz w warunkach *in vitro* po dodaniu do podłoża hodowlanego dla *Malassezia* sp. wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Badacze sugerują, że depigmentacja skóry u pacjentów z łupieżem pstym może wynikać z uszkodzenia błon komórkowych melanocytów przez nadtlenniki lipidowe. Lipoperoksydaza *Malassezia* sp. dotychczas nie została wyizolowana [26].

#### 4. Interakcje grzybów *Malassezia* sp. z innymi mikroorganizmami

Grzyby z rodzaju *Malassezia* uwalniają różne metabolity o działaniu sprzyjającym lub hamującym kolonizację innymi mikroorganizmami, przy czym antagonistyczna aktywność szczepów *Malassezia* sp. wykazuje dużą zmienność gatunkową. W badaniach rosyjskich autorów najbardziej aktywnym antagonistycznie gatunkiem i równocześnie najmniej wrażliwym na działanie metabolitów innych szczepów był gatunek *M. furfur*. Związki uwalniane przez *M. furfur* znacząco hamowały wzrost grzybów należących do klasy *Ascomycetes* (*Geotrichum* sp., *Candida albicans*) i w mniejszym stopniu drożdży należących do klasy *Basidiomycetes* (*Cryptococcus albidus*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula aurantica*, *Trichosporon cutaneum*, *Trichosporon ovoides*) [2].

#### 5. Interakcje grzybów *Malassezia* sp. z układem immunologicznym

##### 5.1. Serologia i budowa antygenowa

Grzyby z rodzaju *Malassezia* mają złożoną budowę antygenową. Obecnie, za pomocą technik immunoelektroforetycznych wykazano obecność ponad 80 antygenów o budowie białkowej i cukrowej u poszczególnych gatunków *Malassezia* sp. Antygeny białkowe są w większości składnikami ściany komórkowej lub cytoplazmy i ulegają ekspresji we wczesnych fazach wzrostu grzyba. Antygeny wielocukrowe (głównie mannany) oraz cząsteczki o budowie glikoprotein (głównie mannoproteiny), są trudniejsze do wykrycia i występują podczas całego cyklu rozwojowego komórki [3, 4].

Pierwszy antygen *Malassezia* – Mala f1 – został opisany i zsekwencjonowany w 1997 roku. Mala f1 to białko o masie 36 kDa, zawierające 22 aminokwasy i występujące na powierzchni komórki grzyba. Reaktywność rekombinowanego Mala f1 była porównywalna z naturalnie występującym antygenem [4]. Kolejne opisane antygeny: Mala f2 i Mala f3 to cząsteczki o masie, odpowiednio 21 kDa i 20 kDa, wykazujące około 50% homologii sekwencji aminokwasowych. Zaobserwowano również homologię między Mala f2 i Mala f3 a białkami błonowymi *Candida boidinii* i jednym z alergenów *Aspergillus fumigatus* [4]. Antygen Mala f4 stanowi istotny alergen dla pacjentów z atopowym zapaleniem skóry, u których występuje kolonizacja *Malassezia* sp. Surowica pacjentów z AZS wykazuje swoistą reakcję z Mala f4 w 80% przypadków. Białko Mala f4 ma masę 35 kDa i wykazuje 57% homologii z mitochondrialną dehydrogenazą maleinową *Saccharomyces cerevisiae*. Kolejne antygeny białkowe: Mala f6, Mala f7, Mala f8



i Mala f9 oraz glikoproteinowy antygen *M. globosa* również reagują swoiście z surowicą pacjentów z atopowym zapaleniem skóry, co sugeruje ich rolę jako czynników alergizujących. Produkowane obecnie zestawy rekombinowanych antygenów *Malassezia* sp. są najczęściej wykorzystywane w punktowych testach skórnych (*skin prick test*, SPT). W badaniach klinicznych zaobserwowano, że znacząco większy odsetek pacjentów z AZS ma pozytywne wyniki SPT z antygenami *Malassezia* sp. w porównaniu z pacjentami zdrowymi lub osobami z innymi chorobami dermatologicznymi związanymi z obecnością grzybów z rodzaju *Malassezia*, przy czym najczęściej dodatnich wyników testów obserwuje się w grupie pacjentów z AZS ze zmianami skórnymi zlokalizowanymi na głowie i szyi [3, 4].

Zróznicowanie opisywanych przez poszczególnych badaczy antygenów jest bardzo duże – od drobnych białek do wielkocząsteczkowych glikoprotein. Niektóre z nich, o podobnej masie cząsteczkowej mogą, w wyniku dalszych badań, okazać się identyczne. Ekspresja poszczególnych antygenów *Malassezia* sp. zależy w dużej mierze od czasu hodowli grzyba. Zaobserwowano również, że wiele antygenów wiążących IgE jest labilnych w temperaturze pokojowej lub wyższej i ulega degradacji po około miesiącu przechowywania [3, 4].

Przeciwciała w klasie IgE swoiste dla *Malassezia* sp. obserwowano w przypadku 20–100% pacjentów z AZS, jednak jak dotąd nie stwierdzono większej korelacji pomiędzy poziomem przeciwciał i stopniem nasilenia objawów klinicznych [4, 37, 56].

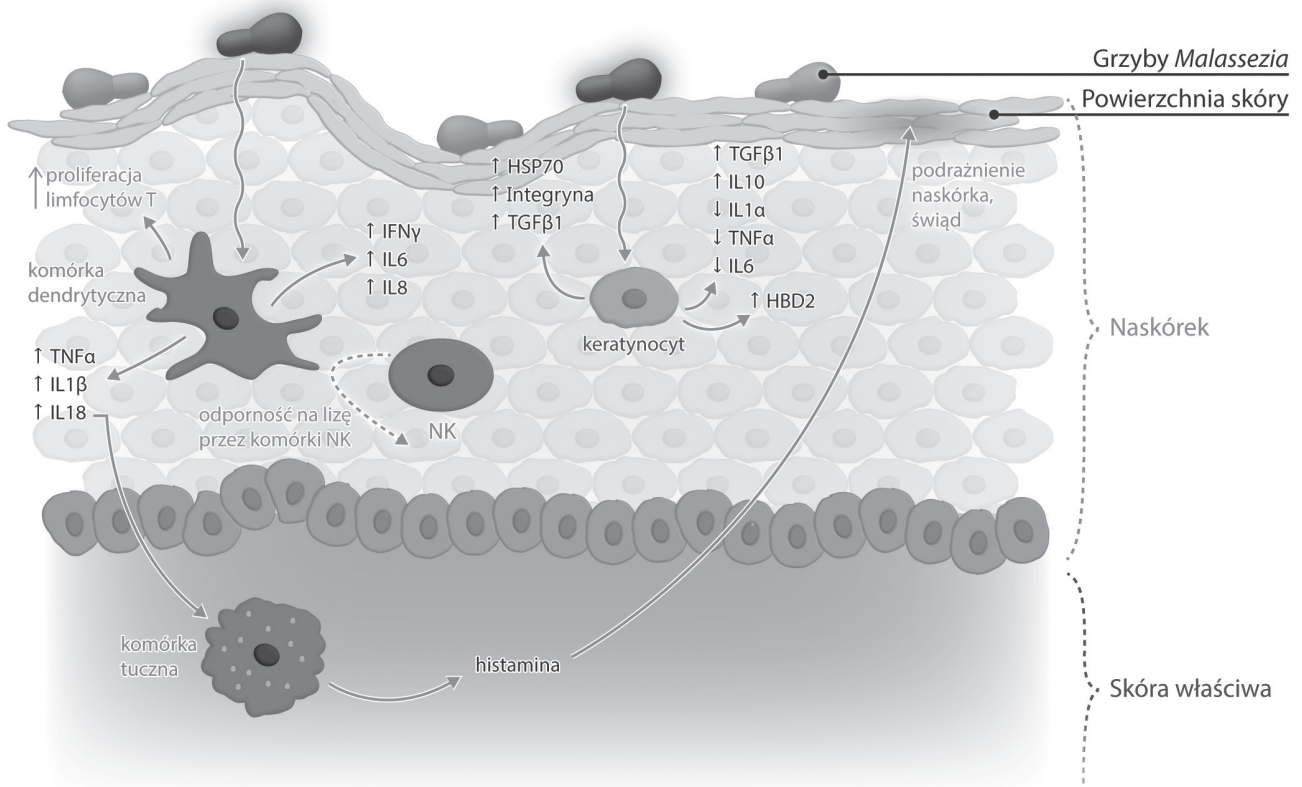
### 5.2. Interakcje grzybów z rodzaju *Malassezia* sp. z układem dopełniacza

Grzyby z rodzaju *Malassezia* mają zdolność aktywacji kaskady dopełniacza zarówno na drodze klasycznej, jak i alternatywnej. Alternatywna droga aktywacji dopełniacza zależy od stężenia komórek grzybiczych i czasu stymulacji. Cząsteczką najprawdopodobniej odpowiedzialną za aktywację drogi alternatywnej jest  $\beta$ -glukan ściany komórkowej *Malassezia* sp. Stymulacja klasycznej drogi aktywacji dopełniacza również zależy od czasu i stężenia komórek grzybiczych, przy czym większe znaczenie mają komórki martwe niż żywe. Zdolność aktywacji dopełniacza przez *Malassezia* sp. może stanowić jeden z mechanizmów powstawania stanu zapalnego u pacjentów z łojotokowym zapaleniem skóry (SD). W badaniach immunohistochemicznych wycinków pobieranych ze zmian skórnych w przebiegu SD wykazano odkładanie się fragmentów C3 dopełniacza wokół komórek *Malassezia* sp. W wycinkach ze skóry niezmięnionej nie stwierdzano obecności białka C3 [4].

### 5.3. Wpływ grzybów *Malassezia* sp. na różne populacje komórek w skórze

Interakcje między komórkami *Malassezia* sp. a układem odpornościowym człowieka są przedmiotem badań od wielu lat. W latach 90. ubiegłego wieku oceniano głównie swoistą odpowiedź humoralną i komórkową na podstawie zmian we krwi obwodowej u pacjentów z chorobami związanymi z obecnością grzybów z rodzaju *Malassezia*. Wyniki przeprowadzonych badań były często rozbieżne. Od kilku lat badacze skupiają się głównie na ocenie interakcji między komórkami *Malassezia* sp. i różnymi populacjami komórek obecnych w skórze (Rys. 3).

Watanabe i wsp. jako pierwsi badali relacje między grzybami z rodzaju *Malassezia* i keratynocytami, stanowiącymi naliczniejszą populację komórek w naskórku i pełniącymi funkcję zarówno strukturalną jak i immunologiczną [65]. W badaniu wykorzystano komórki *M. furfur*, *M. pachydermatis*, *M. slooffiae* oraz *M. sympodialis*. W supernatancie z hodowli komórkowej składającej się z keratynocytów i komórek grzybiczych w proporcji 1:1 oceniano stężenie IL1 $\beta$ , IL6, IL8, TNF $\alpha$  oraz białka chemotaktycznego monocytów (MCP1). Hodowlę komórkową prowadzono przez 24 godziny, przy czym poziom badanych cytokin oceniano w odstępach jednogodzinnych od pierwszej do 24 godziny. Poziom MCP1 w przypadku wszystkich badanych gatunków był niski lub niewykrywalny. W supernatancie z hodowli *M. furfur* również nie stwierdzono obecności pozostałych cytokin, lub poziom ich był bardzo niski. Najwyższe stężenie cytokin obserwowano w supernatancie z hodowli *M. pachydermatis*, co może tłumaczyć większe nasilenie reakcji zapalnej w przebiegu infekcji *M. pachydermatis* u zwierząt w porównaniu z objawami u ludzi. W kolejnym badaniu, przeprowadzonym w 2001 roku, Baroni i wsp. zaobserwowali zmniejszenie produkcji IL1 $\alpha$  oraz zwiększenie wydzielania IL10 i TGF $\beta$ 1 przez keratynocyty pod wpływem *M. furfur*, co prowadziło do zahamowania wydzielania IL6 i TNF $\alpha$  [8]. Komórki *Malassezia* były wchłaniane przez keratynocyty, ale zabijane tylko w niewielkim odsetku. Badacze postulowali, że supresja wydzielania IL1 $\alpha$ , IL6 i TNF $\alpha$  przez *Malassezia* sp. pozwala przetrwać komórkom grzyba w komórkach gospodarza bez wywoływania reakcji zapalnej. Zahamowanie wydzielania IL1 $\beta$ , IL6 i TNF $\alpha$  przez jednojądrzaste leukocyty krwi obwodowej (PBMNC) w hodowli z komórkami *Malassezia* sp. wykazał Kesavan w 1998 roku [44]. Również w tym badaniu zaobserwowano, że supresja produkcji cytokin prozapalnych zależała od IL10. Immunosupresyjny wpływ grzybów z rodzaju *Malassezia* na keratynocyty w warunkach *in vitro* potwierdzono w kolejnym badaniu przeprowadzonym w 2004 roku [29]. Donnaraum i wsp. po inkubacji komórek

Ryc. 3. Interakcje grzybów *Malassezia* sp. z komórkami skóry gospodarza

*M. furfur* z keratynocytami w proporcji 30:1 zaobserwowali zwiększoną ekspresję genów dla IL10, TGFβ1 oraz genu ludzkiej β defensyny (HBD2) w keratynocytach. Obecnie sugeruje się, że immunosupresyjny wpływ *Malassezia* sp. na keratynocyty tłumaczy ich występowanie na skórze jako komensali oraz może stanowić przyczynę niewielkiego odczynu zapalnego w przebiegu łupieżu pstrego, mimo masywnej kolonizacji skóry przez *Malassezia* sp. [66]. Immunosupresyjny efekt wywołany przez *Malassezia* sp. na PBMNC udało się odwrócić pozbawiając komórki grzyba lipidowej otoczki, stąd wydaje się, że to właśnie lipidy odpowiadają za immunomodulujący wpływ *Malassezia* sp. [3].

W badaniu przeprowadzonym w 2004 roku B a r o n i i wsp. oceniali wpływ *Malassezia* sp. na keratynocyty u pacjentów z łuszczycą zwyczajną [7]. Badacze zaobserwowali znaczący wzrost ekspresji cząsteczek zaangażowanych w hyperproliferyację i migrację komórek (HSP 70, integryna, TGFβ1) w keratynocytach pobranych z wycinków skórnych ze zmian łuszczycowych po inkubacji z komórkami *Malassezia* sp. w porównaniu z keratynocytami ze skóry osób zdrowych. W przypadku, gdy zmiany łuszczycowe były dodatkowo skolonizowane przez *Malassezia* sp. ekspresja badanych białek była większa. Nasilenie hyperproliferyacji keratynocytów przez *Malassezia* sp. u pacjentów z łuszczycą może przyczyniać się do zaostrzenia choroby podstawowej i powodować utrzymywanie się zmian skórnych [3, 7].

Interakcje pomiędzy grzybami z rodzaju *Malassezia* i komórkami dendrytycznymi były przedmiotem licznych badań od 2000 roku. Większość badaczy oceniała wpływ *Malassezia* sp. na komórki Langerhansa w zmianach skórnych u pacjentów z atopowym zapaleniem skóry. B u e n t k e i wsp. w badaniu przeprowadzonym w 2000 roku badali zdolność komórek dendrytycznych CD 1a (+) izolowanych z krwi obwodowej do wychwytywania całych komórek *M. furfur*, różnych fragmentów komórek grzyba oraz rekombinowanego antygeny M a l a f 5 [16]. W badaniu wykazano, że niedojrzałe komórki dendrytyczne znacząco efektywniej niż komórki dojrzałe wychwytywały komórki *Malassezia* sp., głównie na drodze endocytozy zależnej od receptora mannozowego. Endocytoza antygenów grzybiczych indukowała dojrzewanie komórek dendrytycznych skutkując również wzmożoną produkcją TNFα, IL1β oraz IL18. Dojrzałe komórki dendrytyczne stymulowały następnie proliferację autologicznych limfocytów T. W kolejnym badaniu, ci sami autorzy oceniali interakcje pomiędzy komórkami dendrytycznymi i komórkami NK (*natural killer*) w obecności grzybów z rodzaju *Malassezia* [15]. B u e n t k e i wsp. zaobserwowali, że w wycinkach pobranych ze zmian skórnych u pacjentów z AZS liczba komórek NK jest znacznie większa, niż w skórze pacjentów zdrowych. Badacze inkubowali komórki dendrytyczne z grzybami *Malassezia* sp. przez 46 godzin, a następnie oceniali stopień lizy komórek dendrytycz-



nych zależnej od komórek NK. Badanie wykazało, że inkubacja komórek dendrytycznych z komórkami *Malassezia* sp. ma działanie protekcyjne znacząco zmniejszając podatność na lizę komórek dendrytycznych i dodatkowo stymuluje produkcję IL8, IL6 czy IFN $\gamma$ . Autorzy sugerują, że dojrzałe komórki dendrytyczne prezentujące antygeny *Malassezia* sp. limfocytom T, odporne na lizę przez komórki NK mogą przyczyniać się do podtrzymania reakcji zapalnej w zmianach skórnych pacjentów z AZS, co dodatkowo jest jeszcze nasilane przez produkowane przez komórki dendrytyczne cytokiny prozapalne [15]. Gabrielsson i wsp. wykazali, że komórki dendrytyczne pobrane od pacjentów z AZS reagują odmiennie na inkubację z komórkami *Malassezia* sp. niż komórki dendrytyczne pacjentów zdrowych [32]. W badaniu zaobserwowano pięciokrotny wzrost ekspresji genów dla IL8, CD54, CD83, receptora IL1, BTG1 (*B-cell translocation gene 1*) i MDC (*monocyte derived chemokine*) w komórkach dendrytycznych pacjentów z AZS po inkubacji z *M. sympodialis* w porównaniu z ekspresją genów w komórkach dendrytycznych osób z grupy kontrolnej, co może tłumaczyć odmienną rolę *Malassezia* sp. w tych grupach [32].

## 6. Podsumowanie

Dokładne poznanie mechanizmów immunomodulacyjnych grzybów z rodzaju *Malassezia* wymaga jeszcze wielu badań. Dane dostępne obecnie sugerują, że u osób ze zdrową skórą (z prawidłową barierą skórno-naskórkową) grzyby *Malassezia* sp. wywierają efekt immunosupresyjny, co pozwala im przetrwać w roli rganizmów komensalnych, natomiast w przypadku pacjentów z łuszczycą lub atopowym zapaleniem skóry grzyby stymulują odpowiedź zapalną, która nasila przebieg choroby podstawowej i przyczynia się do podtrzymywania zmian skórnych [3].

## Podziękowania

Autorzy składają podziękowania Panu dr. Pawłowi Krzysciakowi z Zakładu Mykologii Katedry Mikrobiologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego za użyczenie zdjęć hodowli *Malassezia* sp., a także Panu Jakubowi Pawłotowi za udostępnienie ryciny ilustrującej oddziaływanie międzykomórkowe w przebiegu zakażania grzybami *Malassezia* sp.

## Piśmiennictwo

1. Adamski Z.: Badania nad rolą drożdżaków lipofilnych *Malassezia furfur* (*Pityrosporum ovale*, *Pityrosporum orbiculare*) w różnych dermatozach. Rozprawa habilitacyjna, AM w Poznaniu, 1995, s. 1–102.
2. Arzumian V.G., Sergeev A.Y., Shelemekh O.V., Ojovan I.M., Serdiuk O.A.: Antagonistic activity of *Malassezia* spp. towards

- other clinically significant yeast genera. *Bull. Exp. Biol. Med.* **148**, 410–415 (2009)
3. Ashbee H.R.: Recent developments in the immunology and biology of *Malassezia* species. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **47**, 14–23 (2006)
4. Ashbee H.R., Evans V.: Immunology of diseases associated with *Malassezia* species. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**, 21–57 (2002)
5. Back O., Scheynius A., Johansson S.G.: Ketoconazole in atopic dermatitis: therapeutic response is correlated with decrease in serum IgE. *Arch. Dermatol. Res.* **287**, 448–451 (1995)
6. Baker B.S., Bokth S., Powles A., Garioch J.J., Lewis H., Valdimarsson H., Fry L.: Group A streptococcal antigen-specific T lymphocytes in guttae psoriatics lesion. *Br. J. Dermatol.* **128**, 493–499 (1993)
7. Baroni A., Paoletti I., Ruocco E., Agozzino M., Tufano M.A., Donnarumma G.: Possible role of *Malassezia furfur* in psoriasis: modulation of TGF-beta1, integrin, and HSP70 expression in human keratinocytes and in the skin of psoriasis-affected patients. *J. Cutan. Pathol.* **31**, 35–42 (2004)
8. Baroni A., Perfetto B., Paoletti I., Ruocco E., Canozo N., Orlando M., Buommino E.: *Malassezia furfur* invasiveness in a keratinocyte cell line (HaCat): effects on cytoskeleton and on adhesion molecule and cytokine expression. *Arch. Dermatol. Res.* **293**, 414–419 (2001)
9. Batra R., Boekhout T., Guého E., Cabañes F.J., Dawson T.L. Jr, Gupta A.K.: *Malassezia* Baillon, emerging clinical yeasts. *FEMS Yeast Res.* **5**, 1101–1113 (2005)
10. Benham R.W.: The cultural characteristics of *Pityrosporum ovale* – a lipophilic fungus. *J. Invest. Dermatol.* **2**, 187–203 (1939)
11. Boekhout T., Bosboom R.: Karyotyping of *Malassezia* yeasts: taxonomic and epidemiological implications. *Syst. Appl. Microbiol.* **17**, 146–153 (1994)
12. Boekhout T., Kamp M., Guého E.: Molecular typing of *Malassezia* species with PFGE and RAPD. *Med. Mycol.* **36**, 365–372 (1998)
13. Braun-Falco O., Plewig G., Wolff H., Burgdorf W.: Erythematopapulo-squamous diseases. [w:] *Dermatology*. Springer Verlag, Berlin, 2000, s. 585–608.
14. Brunke S., Hube B.: MFLIP1, a gene encoding an extracellular lipase of the lipid-dependent fungus *Malassezia furfur*. *Microbiology*, **152**, 547–554 (2006)
15. Buentke E., Heffler L.C., Wilson J.L., Wallin R.P., Löfman C., Chambers B.J., Ljunggren H.G., Scheynius A.: Natural killer and dendritic cell contact in lesional atopic dermatitis skin – *Malassezia*-influenced cell interaction. *J. Invest. Dermatol.* **119**, 850–857 (2002)
16. Buentke E., Zargari A., Heffler L.C., Avila-Cariño J., Savolainen J., Scheynius A.: Uptake of the yeast *Malassezia furfur* and its allergenic components by human immature CD1a+ dendritic cells. *Clin. Exp. Allergy*, **30**, 1759–1770 (2000)
17. Cabañes F.J., Theelen B., Castellá G., Boekhout T.: Two new lipid-dependent *Malassezia* species from domestic animals. *FEMS Yeast Res.* **7**, 1064–1076 (2007)
18. Cabañes F.J., Theelen B., Castellá G., Boekhout T.: Two new lipid-dependent *Malassezia* species from domestic animals. *FEMS Yeast Res.* **7**, 1064–1076 (2007)
19. Cabañes, F.J., Vega S., Castellá G.: *Malassezia cuniculi* sp. nov., a novel yeast species isolated from rabbit skin. *Med. Mycol.* **49**, 40–48 (2011)
20. Cafarchia C., Otranto D.: Association between phospholipase production by *Malassezia pachydermatis* and skin lesions. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 4868–4869 (2004) 53
21. Catterall M.D., Ward M.E., Jacobs P.: A reappraisal of the role of *Pityrosporum orbiculare* in pityriasis versicolor and the significance of extracellular lipase. *J. Invest. Dermatol.* **71**, 398–401 (1978)

22. Chen T.-A., Hill P.B.: The biology of *Malassezia* organisms and their ability to induce immune responses and skin disease. *Vet. Dermatol.* **16**, 4–26 (2005)
23. Civilia E.S., Vignale R., Sanjines A., Conti-Diaz I.A.: Hyphal production by *Pityrosporum ovale*. *Int. J. Dermatol.* **17**, 74–77 (1978)
24. Clemmensen O., Hjorth N.: Treatment of dermatitis of the head and neck with ketoconazole in patients with type I sensitivity to *Pityrosporum orbiculare*. *Sem. Dermatol.* **2**, 26–29 (1983)
25. Dawson T.L. Jr.: *Malassezia globosa* and *restricta*: Breakthrough understanding of the etiology and treatment of dandruff and seborrheic dermatitis through whole-genome analysis. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* **12**, 15–19 (2007)
26. De Luca C., Picardo M., Breathnach A., Passi S.: Lipoperoxidase activity of *Pityrosporum*: characterisation of by-products and possible role in pityriasis versicolor. *Exp. Dermatol.* **5**, 49–56 (1996)
27. DeAngelis Y.M., Dawson T.L. Jr i wsp.: Isolation and expression of a *Malassezia globosa* lipase gene, LIPI. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 2138–2146 (2007)
28. Diaz M.R., Boekhout T., Theelen B., Bovers M., Cabañes F.J., Fell J.W.: Microcoding and flow cytometry as a high-throughput fungal identification system for *Malassezia* species. *J. Med. Microbiol.* **55**, 1197–1209 (2006)
29. Donnarumma G., Paoletti I., Buommino E., Orlando M., Tufano M.A., Baroni A.: *Malassezia furfur* induces the expression of beta-defensin-2 in human keratinocytes in a protein kinase C-dependent manner. *Arch. Dermatol. Res.* **295**, 474–481 (2004)
30. Dorn M., Roehnert K.: Dimorphism of *Pityrosporum orbiculare* in a defined culture medium. *J. Invest. Dermatol.* **69**, 244–248 (1977)
31. Faergemann J., Bernander S.: Micro-aerophilic and anaerobic growth of *Pityrosporum* species. *Sabouradia*, **19**, 117–121 (1981)
32. Gabrielsson S., Buentke E., Liedén A., Schmidt M., D'Amato M., Tengvall-Linder M., Scheynius A.: *Malassezia sympodialis* stimulation differently affects gene expression in dendritic cells from atopic dermatitis patients and healthy individuals. *Acta Dermatol. Venereol.* **84**, 339–345 (2004)
33. Gueho E., Midgley G., Guillot J.: The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie van Leeuwenhoek*, **69**, 337–55 (1996)
34. Guého-Kellermann E., Boekhout T., Begerow D.: Biodiversity, phylogeny and ultrastructure. [w:] Boekhout T., Guého E., Mayser P., Velegriaki A. (red.) *Malassezia* and the skin. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. str. 17–64.
35. Guillot J., Gueho E., Prevost M.C.: The ultrastructure of dimorphic yeast *Malassezia furfur*. *J. Mycol. Méd.* **5**, 86–91 (1995)
36. Guillot J., Gueho E.: The diversity of *Malassezia* yeasts confirmed by rRNA sequence and nuclear DNA comparisons. *Antonie van Leeuwenhoek*, **67**, 297–314 (1995)
37. Gupta A.K., Batra R., Bluhm R., Boekhout T., Dawson T.L. Jr: Skin diseases associated with *Malassezia* species. *J. Am. Acad. Dermatol.* **51**, 785–798 (2004)
38. Hay R.J., Midgley G.: Introduction: *Malassezia* yeasts from a historical perspective. [w:] Boekhout T., Guého E., Mayser P., Velegriaki A. (red.) *Malassezia* and the skin. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2010 s. 1–16.
39. Hirai A., Kano R., Makimura K., Duarte E.R., Hamdan J.S., Lachance M.A., Yamaguchi H., Hasegawa A.: *Malassezia nana* sp. nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 623–627 (2004)
40. Hirai A., Kano R., Makimura K., Duarte E.R., Hamdan J.S., Lachance M.A., Yamaguchi H., Hasegawa A.: *Malassezia nana* sp. nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 623–627 (2004)
41. Jabłońska S., Majewski S.: Choroby skóry i choroby przenoszone drogą płciową. Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa, 2005, s. 1–528.
42. Katsarou A., Armenaka M.C.: Atopic dermatitis in older patients: particular points. *JEADV*, **25**, 12–18 (2011)
43. Kesavan S., Holland K., Cunliffe W., Ingham E.: The effects of de-lipidisation on the immunomodulatory activity of *Malassezia* species. *J. Invest. Dermatol.* **108**, 389A (1997)
44. Kesavan S.: Immunomodulation by *Malassezia* spp. PhD thesis. University of Leeds, Leeds, 1998.
45. Lindgren L., Wahlgren C.F., Johansson S.G., Wiklund I., Nordvall S.L. Occurrence and clinical features of sensitization to *Pityrosporum orbiculare* and other allergens in children with atopic dermatitis. *Acta Dermatol. Venereol.* **75**, 300–304 (1995)
46. Mayser P., Fuhrer D., Schmidt R., Grunder K.: Hydrolysis of fatty acid esters by *Malassezia furfur*: different utilization depending on alcohol moiety. *Acta Dermatol. Venereol.* **75**, 105–109 (1995)
47. Mayser P., Haze P., Papavassilis C., Pickel M., Gruender K., Gueho E.: Differentiation of *Malassezia* species: selectivity of Cremophor EL, castor oil and ricinoleic acid for *M. furfur*. *Br. J. Dermatol.* **137**, 208–213 (1997)
48. Mayser P., Imkampe A., Winkler M., Papvassilis C.: Growth requirements and nitrogen metabolism of *Malassezia furfur*. *Arch. Dermatol. Res.* **290**, 277–282 (1998)
49. Mayser P., Schutz M., Schuppe H.C., Jung A., Schill W.B.: Frequency and spectrum of *Malassezia* yeasts in the area of prepuce and glans penis. *BJU Int.* **88**, 554–558 (2001)
50. Mittag H.: Fine structural investigations of *Malassezia furfur*. II. The envelope of the yeast cells. *Mycoses*, **38**, 13–21 (1995)
51. Nazzaro P.M., Passi S., Caprilli F., Mercantini R.: Induction of hyphae in cultures of *Pityrosporum* by cholesterol and cholesterol esters. *J. Invest. Dermatol.* **69**, 531–534 (1977)
52. Nell A., James S.A., Bond C.J., Hunt B., Herrtage M.E.: Identification and distribution of a novel *Malassezia* species yeast on normal equine skin. *Vet. Rec.* **150**, 395–398 (2002)
53. Plotkin L.I., Mathov I., Squiquera L., Leoni J.: Arachidonic acid released from epithelial cells by *Malassezia furfur* phospholipase A<sub>2</sub>: A potential pathophysiologic mechanism. *Mycology*, **90**, 163–169 (1998)
54. Plotkin L.I., Squiquera L., Mathov I., Galimberti, R. Leoni J.: Characterization of the lipase activity of *Malassezia furfur*. *J. Med. Vet. Mycol.* **34**, 43–48 (1996)
55. Ro B.I., Dawson T.L. Jr: The role of sebaceous gland activity and scalp microfloral metabolism in the etiology of seborrheic dermatitis and dandruff. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* **10**, 194–197 (2005)
56. Savolainen J., Lintu P., Kosonen J., Kortekangas-Savolainen O., Viander M., Pène J., Kalimo K., Terho E.O., Bousquet J.: *Pityrosporum* and *Candida* specific and non-specific humoral, cellular and cytokine responses in atopic dermatitis patients. *Clin. Exp. Allergy*, **31**, 125–134 (2001)
57. Shifrine M., Marr A.G.: The requirement of fatty acids by *P. ovale*. *J. Gen. Microbiol.* **32**, 263–70 (1963)
58. Silny W., Czarnecka-Operacz M.: Atopowe zapalenie skóry – udział limfocytów T i komórek Langerhansa w rozwoju zmian skórnych. *Alerg. Astm. Immunol.* **5**, 15–20 (2000)
59. Simmons R.B., Ahearn D.G.: Cell wall ultrastructure and diamonium blue B reaction of *Sporopachyderma quercuum*, *Bullera tsugae* and *Malassezia* spp. *Mycologia*, **79**, 38–43 (1987)
60. Sugita T., Tajima M., Takashima M., Amaya M., Saito M., Tsuboi R., Nishikawa A.: A new yeast, *Malassezia yamatoensis*, isolated from a patient with seborrheic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects. *Microbiol. Immunol.* **48**, 579–583 (2004)

61. Sugita T., Takashima M., Kodama M., Tsuboi R., Nishikawa A.: Description of a new yeast species, *Malasseziajaponica*, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 4695–4699 (2003)
62. Sugita T., Takashima M., Shinoda T., Suto H., Unno T., Tsuboi R., Ogawa H., Nishikawa A.: New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 1363–1367 (2002)
63. Van de Kerkhof P.C., Franssen M.E.: Psoriasis of the scalp: diagnosis and management. *Am. J. Clin. Dermatol.* **2**, 159–165 (2001)
64. Wanat-Krzak M., Kurzawa R.: Atopowe zapalenie skóry – etiopatogeneza, diagnostyka i leczenie. *Alergologia i pulmonologia wieku dziecięcego. Klin. Pediatr.* **10**, 237–244 (2002)
65. Watanabe S., Kano R., Sato H., Nakamura Y., Hasegawa A.: The effects of *Malassezia* yeasts on cytokine production by human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **116**, 769–773 (2001)
66. Wroblewski N., Bär S., Mayser P.: Missing granulocytic infiltrate in *pityriasis versicolor* – indication of specific anti-inflammatory activity of the pathogen? *Mycoses*, **48**, 66–71 (2005)
67. Xu J., Dawson T.L. Jr i wsp.: Dandruff-associated *Malassezia* genomes reveal convergent and divergent virulence traits shared with plant and human fungal pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 18730–18735 (2007)
68. Yarrow D., Ahearn D.G. *Malassezia* Baillon. [w:] The yeasts. A taxonomic study. Wyd. 3. NJW Kroger van Rij (red.), North Holland Publ. Co., Amsterdam, 1984, s. 882–885.
69. Zawirska A.: Grzyby z rodzaju *Malassezia*. Nowe informacje. *Post. Derm. Alergol.* **2**, 97–103 (2004)
70. Zuther K., Mayser P., Hettwer U., Wu W., Spiteller P., Kindler B.L., Karlovsky P., Basse C.W., Schirawski J.: The tryptophan aminotransferase Tam1 catalyses the single biosynthetic step for tryptophan-dependent pigment synthesis in *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol.* **68**, 152–172 (2008)