

## Le cellule dendritiche nella vaccinazione e terapia antifungina. *Dendritic cell-based vaccination against opportunistic fungi.*

C. Montagnoli<sup>1</sup>\*, S. Bozza<sup>1</sup>, R. Gaziano<sup>1</sup>, L. Pitzurra<sup>1</sup>, S. Bellocchio<sup>1</sup>,  
G. Rossi<sup>1</sup>, F. Bistoni<sup>1</sup>, L. Romani<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche,  
Sezione di Microbiologia, Università degli Studi di Perugia

**Riassunto.** I meccanismi di difesa dell'ospite nei riguardi dell'infezione da funghi sono molteplici e spaziano dalle difese aspecifiche, costitutivamente espresse, a quelle adattative specificatamente indotte durante l'infezione. Recenti studi sperimentali hanno altresì evidenziato che esiste una reciproca e fondamentale relazione tra la risposta immune innata e adattativa e che le cellule dendritiche (DC) sono le uniche in grado di decodificare l'informazione associata al fungo e di tradurla in risposte immuni T helper (Th) qualitativamente differenti. Le DC riconoscono i funghi sulla base della loro morfologia attraverso il coinvolgimento di distinti recettori di riconoscimento e tale legame influenza sia la produzione citochinica che l'espressione di molecole di costimolazione. Il trasferimento adottivo di differenti tipi di DC attiva risposte Th protettive, non protettive e regolatorie ed influenza l'esito delle infezioni. Inoltre, DC transfettate con RNA fungino sono in grado di conferire resistenza antifungina in modelli sperimentali murini. Pertanto, per la loro plasticità funzionale, le DC possono costituire bersagli utili nel campo dell'immunoterapia antifungina.

**Summary.** Efficient responses to the different forms of fungi require different mechanisms of immunity. Dendritic cells (DCs) are uniquely able to decode the fungus-associated information and translate it in qualitatively different T helper (Th) immune responses, *in vitro* and *in vivo*. DCs sense fungi in a morphotype-specific manner, through the engagement of distinct recognition receptors ultimately affecting cytokine production and costimulation. Adoptive transfer of different types of DCs activates protective and non-protective Th cells as well as regulatory T cells and affects the outcome of the infections. DCs transfected with fungal RNA also restore antifungal resistance in murine experimental models. Thus, the remarkable functional plasticity of DCs in response to fungi can be exploited for the deliberate targeting of cells and pathways of cell-mediated immunity in response to fungal vaccines.

### Introduzione

Le infezioni da opportunisti patogeni come *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus* costituiscono un significativo problema clinico per i pazienti immunocompromessi (15). In particolare, *C. albicans* è associata ad un ampio spettro di malattie che nell'uomo vanno dall'allergia e gravi infezioni mucocutanee non trattabili a pericolose infezioni sistemiche da disseminazione ematogena (8). *A. fumigatus* è un patogeno del tratto respiratorio, associato sia a malattie di natura allergica che non-allergica come l'aspergillosi bronco-polmonare allergica o l'aspergillosi polmonare invasiva (9). Lo sviluppo di tali gravi infezioni è

strettamente associato al delicato equilibrio esistente tra ospite e commensale che può trasformarsi in un rapporto di parassitismo in condizioni di "deficit" immunologico dell'ospite (16, 17). I meccanismi di difesa dell'ospite nei riguardi dell'infezione da funghi sono numerosi e spaziano dalle difese aspecifiche, relativamente primitive e costitutivamente espresse (immunità innata), ai sofisticati meccanismi adattativi che sono specificatamente indotti durante l'infezione (immunità Th) (17). Alla luce di queste considerazioni appare chiaro come la comprensione circa i meccanismi di induzione e regolazione della risposta immune antifungina dell'ospite sia essenziale per un avanzamento significativo della profilassi e terapia.

E' ora chiaro che esiste una reciproca e fondamentale relazione tra la risposta immune innata e quella adattativa (13). L'attuale paradigma di resistenza immune ai funghi è caratterizzato da una serie di eventi che comprendono: **(a)** il coinvolgimento di un "set" di recettori di riconoscimento, geneticamente determinati e chiamati PRRs o pattern recognition receptors (1, 12), attraverso i quali cellule del sistema immune innato, come ad esempio le DC, non solo discriminano tra i diversi morfotipi fungini, ma contribuiscono anche alla realizzazione di una risposta discriminativa tra "self" e "non-self" a livello dell'immunità adattativa Th (19, 20); **(b)** l'associazione tra risposte Th1 e attivazione dell'immunità dipendente dai fagociti, importante per eliminare i funghi patogeni dai tessuti infetti (18); **(c)** l'associazione di risposte Th2 e patologie da funghi (18); **(d)** la regolazione reciproca tra cellule Th1 e Th2 che può esplicarsi direttamente tramite citochine antagoniste oppure, indirettamente, attraverso l'attivazione di cellule T regolatorie (Treg) (21). Citochine e altri mediatori giocano un ruolo essenziale nel processo interattivo tra i due sistemi. Al fine di limitare le conseguenze patologiche di una eccessiva risposta infiammatoria cellulo-mediata, il sistema immune fa ricorso a meccanismi protettivi che includono una reciproca regolazione di citochine effettrici di tipo Th1 e Th2, come IFN- $\gamma$ , interleuchina (IL)-4 e la generazione di cellule Treg. Poiché i diversi *subset* cellulari Th hanno la capacità di secernere citochine capaci di segnali attivanti o disattivanti i fagociti effettori, l'attivazione di un appropriato *subset* Th è pregiudiziale ai fini della generazione di una risposta immunitaria ai funghi (17).

Tra i vari fattori che concorrono a regolare l'induzione e l'espressione della reattività Th, recenti studi hanno suggerito che DC, dotate di eccezionale plasticità funzionale, giocano un ruolo determinante (3). Tali cellule sono strategicamente localizzate a livello dei siti di penetrazione e di contatto di agenti patogeni. Questo fa sì che dopo possano migrare a livello degli organi linfoidi secondari, nelle aree T-dipendenti, dove maturano e promuovono l'attivazione di linfociti Th, fornendo diversi segnali, tra i quali un segnale antigene-specifico ed un segnale costimolatorio. Le DC, infatti, al di là di un mero ruolo fagocitico, sono le uniche cellule in grado di regolare risposte Th in senso Th1, attraverso la produzione di IL-12 o in senso Th2 tramite la produzione di IL-4 e IL-10 (3, 14). L'abilità di DC di influenzare il pattern citochinico secreto dai linfociti T determina il risultato finale della risposta immune antifungina.

Sulla base di queste osservazioni, considerando l'importante ruolo che le DC svolgono nell'induzione e regolazione della risposta immune Th, sono stati in-

trapresi studi sia *in vitro* che *in vivo* volti a comprendere i meccanismi di interazione tra funghi-DC-linfociti T CD4+, allo scopo di poter identificare possibili nuovi bersagli di profilassi e terapia antifungina.

## Materiali e Metodi

**Animali.** Sono stati utilizzati topi BALB/c (H-2d) inbred di diverso aplotipo e di età compresa tra 8 e 10 settimane, forniti da Charles River (Calco, Italia). Gli animali erano allevati nello Stabulario Centralizzato dell'Università degli Studi di Perugia. Le procedure riguardanti l'utilizzo degli animali e la loro cura erano condotte in conformità alle leggi nazionali e alle disposizioni internazionali vigenti.

**Ceppi fungini.** Un ceppo di *C. albicans* a bassa virulenza e un ceppo ad elevata virulenza erano utilizzati come fonte di lieviti e di ife, rispettivamente (10). Per gli esperimenti di microscopia elettronica, blastospore erano tenute in coltura a 37°C per 2 h in RPMI 1640 in presenza del 10% di siero bovino fetale. Entro questo tempo, il 98% delle blastospore era germinato. Blastospore erano raccolte al termine della fase esponenziale, centrifugate e risospese nello stesso terreno. Il ceppo di *A. fumigatus* era coltivato in agar Sabouraud-destrosio per 4 giorni a temperatura ambiente. I conidi erano raccolti lavando le piastre di coltura con 5 ml di Tween 20 allo 0,025% in soluzione fisiologica. Per l'infezione primaria sistemica, gli animali erano inoculati per via endovenosa con una sospensione concentrata  $5 \times 10^5$  di *C. albicans* o *A. fumigatus*. Per l'infezione da *Cryptococcus neoformans*, i lieviti erano raccolti durante la fase esponenziale di crescita (48-72 h) a 37°C in brodo Sabouraud-destrosio. Le colture erano lavate con soluzione fisiologica, contate allo spettrofotometro e diluite alla concentrazione di  $10^4$  CFU/ml. Per l'infezione,  $10^4$  lieviti/80  $\mu$ l di soluzione fisiologica erano somministrati per via intratracheale in animali precedentemente anestetizzati (11).

**Purificazione di DC.** Sono state utilizzate sia DC purificate da milze e polmoni di topi che da sangue periferico umano. DC murine erano purificate per separazione magnetica mediante l'uso di MicroBeads coniugate ad anticorpi monoclonali anti-mouse-CD11c. In breve, dopo rimozione dei macrofagi per aderenza in piastre Petri, le cellule non aderenti erano fatte reagire con 100  $\mu$ l di anti-CD11c MicroBeads, prima della separazione magnetica. DC immature umane (imDC) erano ottenute da cellule mononucleate di sangue periferico mediante separazione magnetica. Monociti CD14<sup>+</sup> così separati erano

coltivati per 5 giorni in Iscove's modified Dulbecco's medium, in presenza di 50 ng/ml di recombinant (r)Human GM-CSF e 200 U/ml di rHuman IL-4 o 10ng/ml di IL-3 al fine di ottenere imDC1 o imDC2, rispettivamente. Cellule imDC erano coltivate per 24 h con 1000ng/ml di CD40-ligand per ottenere DC1 e DC2 mature (mDC1 e mDC2) (22).

**Isolamento di RNA fungini.** L'estrazione dell'RNA totale da *C. albicans*, *A. fumigatus* e *C. neoformans* era ottenuto come descritto (2). La quantità di RNA totale era determinata misurando la densità ottica a 260 e 280 nm.

**Fagocitosi.** DC murine ed umane erano incubate a 37°C con lieviti di *C. albicans*, conidi di *A. fumigatus* ed ife di entrambi, come descritto (4, 10). Dopo colorazione con metodo Diff-Quik, l'internalizzazione del fungo era espressa secondo la seguente formula: percentuale di fagocitosi (internalizzazione) = numero di DC contenenti una o più cellule del fungo/100 cellule contate.

**Microscopia elettronica.** Le cellule erano incubate a 37°C come per la fagocitosi per un tempo variabile tra i 15 minuti e 4 h. Le cellule erano recuperate per centrifugazione, fissate in glutaraldeide fredda al

2.5% e trattate come descritto (4). Sezioni di 50 nm erano esaminate con un microscopio elettronico a trasmissione, modello Philips TEM 400.

**Determinazione citochinica ed ELISPOT.** I livelli di citochine nei sovrantanti di coltura erano determinati tramite *Kit* ELISA. Il valore limite di determinazione, espresso in pg/ml, era <3 per IL-12 p70 e IL-10, sia per DC umane che murine. La produzione citochinica da parte di linfociti T CD4<sup>+</sup>, espressa come frequenza di cellule producenti citochine (ELISPOT) era determinata mediante purificazione di linfociti splenici e polmonari purificati, come descritto (6). I risultati erano espressi come la frequenza di cellule producenti citochine per 10<sup>5</sup> calcolate utilizzando diluizioni seriali in duplicato.

**Analisi statistica.** Il *test t* di Student è stato utilizzato per determinare la significatività dei risultati ottenuti.

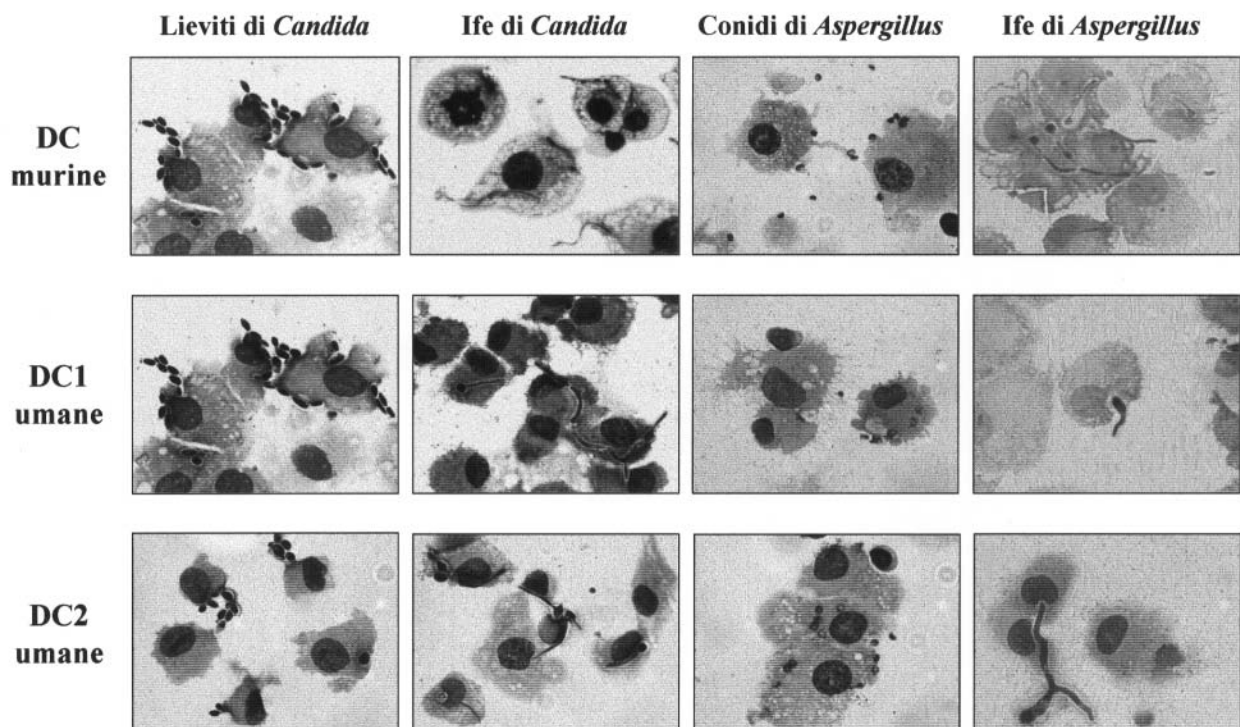
**Risultati e discussione**

**Interazione tra DC e funghi: studi in vitro**

**1. Meccanismi di fagocitosi**

DC discriminano tra le diverse forme fungine in termini di maturazione, produzione citochinica, reattivi

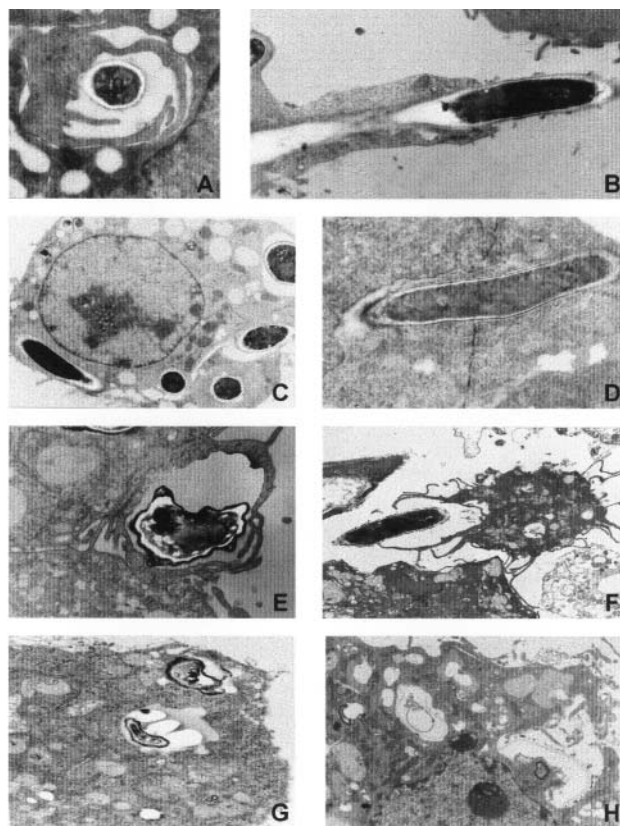
**Figura 1.** Cellule dendritiche internalizzano lieviti ed ife di *C. albicans* e conidi ed ife di *A. fumigatus*. DC murine erano purificate da milza e polmoni mentre DC1 e DC2 immature umane provenivano da cellule mononucleate di sangue periferico. Prima della fagocitosi, DC erano esposte per 30 minuti a lieviti o per 60 minuti a conidi ed ife. L'internalizzazione dei funghi era evidenziata mediante microscopia ottica, previa colorazione idonea del preparato.



vità cellulare Th, sia *in vitro* che *in vivo* (4, 10). In particolare, studi di microscopia ottica hanno evidenziato che sia DC murine che umane sono in grado di fagocitare lieviti di *Candida*, conidi di *Aspergillus* ed ife di entrambi i funghi (Fig. 1). Inoltre, mediante studi di microscopia elettronica si è potuto constatare che DC internalizzano lieviti e conidi, mediante una sorta di avvolgimento a spirale (coiling), caratterizzato dalla presenza di pseudopodi bilaterali. In contrasto, l'internalizzazione delle ife avveniva attraverso una convenzionale fagocitosi a cerniera (*zipper-type*), caratterizzata dalla presenza di pseudopodi simmetrici che strettamente seguono il contorno dell'ifa prima della fusione. Inoltre, si è potuto verificare come il destino intracellulare delle diverse forme sia differente. Dopo 2 h dall'internalizzazione, numerosi lieviti si presentavano all'interno del fagolisosoma e dopo 4 h apparivano degradati. Era interessante notare, inoltre, come l'ifa di *Candida* fosse in grado di rompere la membrana del fagosoma e farsi strada nel citoplasma dopo 1 h dall'esposizione. Al contrario, dopo 2 h di fagocitosi, conidi ed ife di *Aspergillus* erano ancora presenti all'interno di DC; ma mentre numerose ife si trovavano parzialmente degradate nel citoplasma, viceversa, i conidi erano ancora vitali all'interno dei fagolisosomi e, per di più, in stretta associazione con i mitocondri (Fig. 2).

E' noto che nel processo di fagocitosi di agenti microbici sono coinvolti numerosi PRR, espressi nella maggior parte delle cellule effettrici, i quali riconoscono strutture molecolari comuni a molti microrganismi definite "Pathogen-Associated Molecular Patterns" (PAMPs). Il coinvolgimento di svariati PRR da parte di PAMP diversi dà luogo a risposte cellulari diverse, che vanno dalla semplice fagocitosi all'innescò della risposta adattativa specifica. Nei funghi i PAMP includono componenti della parete cellulare come i glucani, mannani, mannoproteine e fosfolipomannani. L'internalizzazione di lieviti, conidi ed ife coinvolge diversi PRR. Per conidi e lieviti, sono coinvolti recettori lectino-simili, quali recettori del mannosio (MR), DC-SIGN e un recettore del glucano, dectin-1 (4, 7, 14). L'internalizzazione di ife, invece, avviene attraverso diversi tipi di recettori, quali il recettore per la frazione C3 del complemento (CR3) e recettori per la porzione Fc delle immunoglobuline (Fc $\lambda$ R) (4, 14, 21). E' interessante il dato che le forme unicellulari dei funghi utilizzerebbero il recettore CR3 come una sorta di nicchia per evitare la loro degradazione attraverso la via delle lectine. L'utilizzo di tale meccanismo viene condiviso anche da numerosi batteri. La capacità di entrare mediante CR3 eviterebbe l'attivazione delle cellule fagocitiche e la conseguente distruzione del fungo (21).

**Figura 2. Fagocitosi di *C. albicans* ed *A. fumigatus* da parte di cellule dendritiche.** DC erano incubate per 15 minuti (a) e 2 h (b, c, d, e, f, g, h) con lieviti (a, c) ed ife (b, d) di *Candida* oppure con conidi (e, g) ed ife (f, h) di *Aspergillus*, prima di essere preparate per la microscopia a trasmissione (TEM), come descritto (15). La TEM rivelava un meccanismo di fagocitosi definito "coiling" per i lieviti (a) e conidi (e) (ingrandimento x 17,000 e x 25,000 rispettivamente in a ed e), mentre si osservava una convenzionale fagocitosi a cerniera o "zipper-type" per le ife (b, f, ingrandimento x 17,000 e x 25,000, rispettivamente). Dopo 2 h di internalizzazione, lieviti (c) conidi (g) si presentavano all'interno del fagolisosoma (ingrandimento x 7,000 e x 12,000, rispettivamente in c e g) mentre le ife si ritrovavano libere nel citoplasma (d, ingrandimento x 12,000) o parzialmente degradate (h, ingrandimento x 12,000).

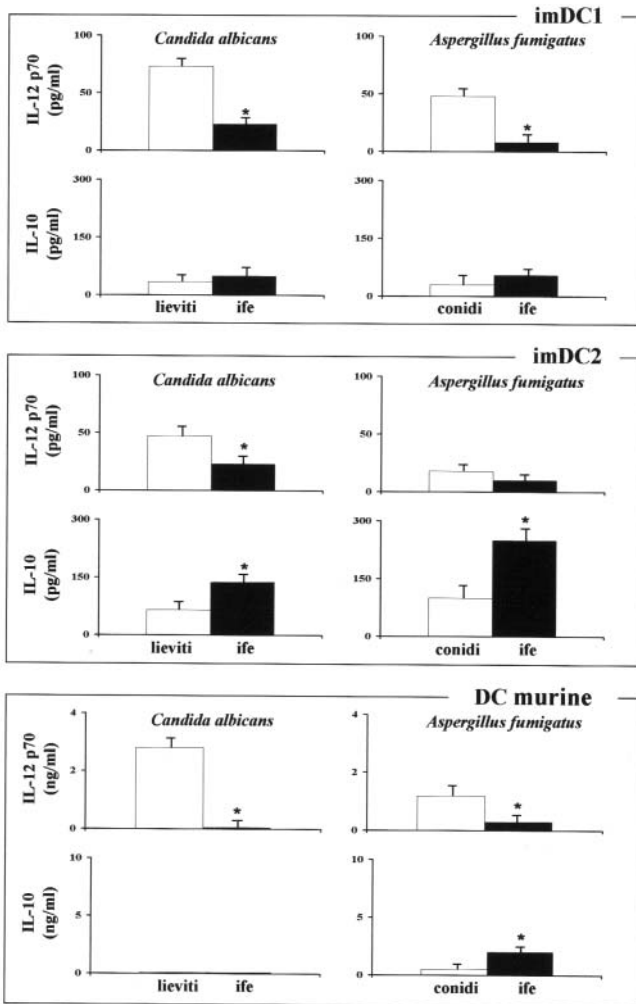


Recentemente è stato dimostrato come l'RNA fungino rappresenti un potente attivatore di DC mediante l'utilizzo di un recettore nucleotidico (2, 5, 23).

## 2. Produzione citochinica

DC esposte ai diversi morfotipi o RNA fungini inducono risposte Th differenti. In particolare, l'aumento di espressione di molecole di costimolazione quali CD80 e CD86, nonché di attivazione, quali molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) di classe II si osservava dopo esposizione ad ogni morfotipo fungino ed RNA. Una diversa produzione citochinica, invece, si evidenziava dopo

**Figura 3. Produzione citochinica da parte di DC murine ed umane in seguito ad esposizione a *C. albicans* e *A. fumigatus*.** DC murine e umane ottenute come descritto nei Materiali e Metodi erano esposte per 24 h a conidi, lieviti ed ife prima di valutare i livelli di IL-10 e IL-12 mediante kit ELISA nei sovranatanti di coltura. \*P<0.05 (ife verso lieviti o ife verso conidi).



esposizione di DC sia murine che umane a lieviti, conidi e ife di entrambi i funghi. In particolare, la fagocitosi di lieviti e conidi comportava la produzione di elevati livelli di IL-12, mentre l'internalizzazione delle ife si associava alla produzione di IL-4 e di IL-10 (Fig. 3). Il diverso *pattern* citochinico, inoltre, risultava strettamente associato all'impiego di distinti PRR da parte delle diverse forme fungine. In particolare, la stimolazione di MR da parte di lieviti o conidi induceva la produzione di IL-12, mentre il coinvolgimento di FcγR, utilizzato dalla forma di ifa dei funghi, si associava alla produzione di IL-4 e di IL-10. E' interessante notare come l'internalizzazione dei diversi morfotipi fungini opsonizzati determinava un *pattern* citochinico opposto rispetto alle forme non opsonizzate.

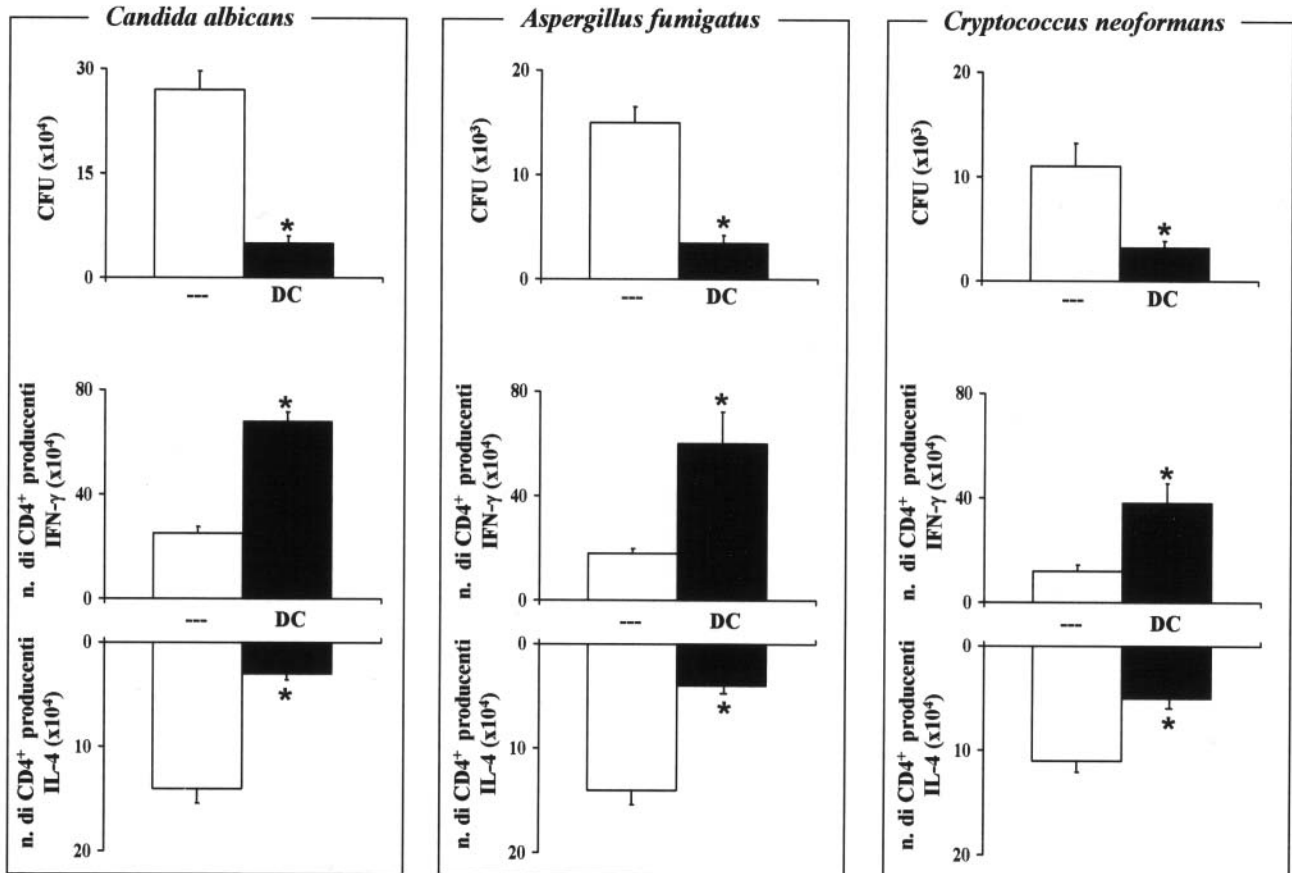
### 3. Attivazione di linfociti Th1 e Th2 in vitro

In seguito ad esposizione a *Candida* ed *Aspergillus*, DC attivano differenti tipi di linfociti T CD4<sup>+</sup> *in vitro*. In tal senso, splenociti T CD4<sup>+</sup>, cimentati con DC esposte a lieviti o conidi producevano elevati livelli di IFN-γ, ma non di IL-4 e IL-10. In contrasto, DC esposte ad ife di entrambi i funghi inducevano bassi livelli di IFN-γ ed elevati livelli di IL-4 e IL-10. Questi dati suggeriscono come DC, in seguito al contatto con i diversi morfotipi fungini, siano in grado di polarizzare la risposta adattativa in senso Th1 o Th2.

### DC come potenziali vaccini antifungini: studi *in vivo*

Studi *in vivo* hanno chiaramente dimostrato come DC siano abili nell'internalizzare sia conidi di *Aspergillus* che lieviti di *Candida* a livello del sito d'infezione. È noto come le DC del tratto respiratorio siano specializzate nella captazione ma non nella presentazione dell'antigene. Affinché avvenga la presentazione dell'antigene è necessario che DC siano sottoposte a stimoli maturativi, un evento possibile in seguito alla migrazione delle stesse a livello linfonodale. L'abilità di DC di attivare risposte Th1 o Th2 correlava *in vivo* con la resistenza o la suscettibilità alle infezioni, rispettivamente. Il trasferimento adottivo *ex-vivo* di DC, esposte a lieviti/conidi ed ife risultava in una produzione citochinica in senso Th1 o Th2, rispettivamente. In particolare, si osservava una ridotta crescita fungina in seguito al trasferimento adottivo di DC esposte a lieviti o conidi ma non esposte all'ifa. Alla luce di tali osservazioni è chiaro che la qualità delle risposte antifungine indotte dipende sia dalla forma del fungo che dalla natura delle citochine prodotte. Infatti, l'abilità di indurre un'immunità Th1 protettiva antifungina *in vivo* risultava annullata in seguito al trasferimento di DC esposte al lievito in assenza di IL-12, mentre risultava potenziata nel caso di trasferimento di DC stimulate con ife in assenza di IL-4. Questi risultati suggeriscono come la produzione di IL-12 o di IL-4 da parte di DC sia fondamentale nell'induzione di risposte immuni protettive e non protettive ai funghi. Ulteriori studi hanno evidenziato l'efficacia di DC come possibili vaccini. La somministrazione di DC spleniche, transfettate *in vitro* con RNA fungino conferiva protezione nei riguardi di infezioni da *Candida*, *Aspergillus* e *Cryptococcus*. La resistenza si associava ad un aumentato numero di cellule Th1 producenti IFN-γ ed alla diminuzione di cellule secerntenti IL-4 (Fig. 4). Tali risultati indicano come DC possano istruire la risposta immune al fungo se trasferite adottivamente in animali suscettibili alle infezioni fungine.

Figura 4. Trasferimento adottivo di DC transfettate con RNA fungini induce resistenza antifungina mediata da linfociti Th1. DC spleniche, transfettate con RNA da lieviti di *Candida* o *Cryptococcus* o conidi di *Aspergillus* (17, 18) erano somministrate in topi per via sottocutanea 2 e 1 settimana prima dell'infezione sistemica endovenosa con *C. albicans* o *A. fumigatus* o dell'infezione intratracheale con *C. neoformans*. La resistenza all'infezione era determinata in termini di unità formanti colonia (CFU), nei reni (*Candida* e *Aspergillus*) e nel polmone (*Cryptococcus*) a diversi tempi dall'infezione. Il numero di linfociti T CD4<sup>+</sup> splenici (*Candida* e *Aspergillus*) o polmonari (*Cryptococcus*) produttori citochine è stato determinato mediante ELISPOT. \*P<0.05 (topi che hanno ricevuto DC pulsate verso topi non trattati).



## Conclusioni

Considerando la plasticità funzionale di DC ed il ruolo cruciale che svolgono nella modulazione delle risposte immuni acquisite, i nostri studi suggeriscono che un obiettivo possibile potrebbe essere la progettazione di vaccini capaci di indurre una risposta immune efficace attraverso la modulazione della funzionalità delle DC stesse *in vivo*.

## Bibliografia

- Aderem A, Ulevitch, RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406, 782-787, 2000.
- Bacci A, Montagnoli C, Perruccio K, Bozza S, Gaziano R, Pitzurra L, Velardi A, Fé d'Ostiani C, Cutler JE, Romani L. Dendritic cells pulsed with fungal RNA induce protective immunity to *Candida albicans* in hematopoietic transplantation. *J. Immunol.* 168, 2904-2913, 2002.
- Banchereu J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252, 1998.
- Bozza S, Gaziano R, Spreca A, Bacci A, Montagnoli C, di Francesco P, Romani L. Dendritic cells transport conidia and hyphae of *Aspergillus fumigatus* from the airways to the draining lymph nodes and initiate disparate Th responses to the fungus. *J. Immunol.* 168, 1362-1371, 2002.
- Bozza S, Perruccio K, Montagnoli C, Gaziano R, Bellocchio S, Burchielli E, Nkwanyuo G, Pitzurra L, Velardi A, Romani L. A dendritic cell vaccine against invasive aspergillosis in allogeneic hematopoietic transplantation. *Blood*, 102, 3807-3814, 2003.
- Bozza S, Gaziano R, Lipford GB, Montagnoli C, Bacci A, Di Francesco P, Kurup VP, Wagner H, Romani L. Vaccination of mice against invasive aspergillosis with recombinant *Aspergillus* proteins and CpG oligodeoxynucleotides as adjuvants. *Microb. Infect.* 4, 1281-1290, 2002.

7. Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Marshall AS, Gordon S. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J. Exp. Med.* 197, 1119-1124, 2003.
8. Calderone RA. *Candida* and candidiasis. Calderone RA ed. ASM Press, Washington, DC, 451, 2002.
9. Denning DW. Invasive Aspergillosis. *Clin. Infect. Dis.* 26, 781-805, 1998.
10. Fé d'Ostiani C, Del Sero G, Bacci A, Montagnoli C, Spreca A, Mencacci A, Ricciardi-Castagnoli P, Romani L. Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*: implications for initiation of Th immunity in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.* 191, 1661-1674, 2000.
11. Feldmesser M, Kress Y, Novikoff P, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. *Infect. Imm.* 68, 4225-4237, 2000.
12. McKnight A, Gordons S. Forum in immunology: innate recognition system. *Microbes Infect.* 2, 239-336, 2000.
13. Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.* 12, 13-19, 1997.
14. Montagnoli C, Bacci A, Bozza S, Gaziano R, Spreca A, Romani L. The interaction of fungi with dendritic cells: implications for Th immunity and vaccination. *Curr. Mol. Med.* 2, 507-524, 2002.
15. Pfaller MA. Nosocomial candidiasis. Emergine species, reservoirs and models of transmission. *Clin. Infect. Dis.* 22, S89-S94, 1996.
16. Romani L, Howard DH. Mechanisms of resistance to fungal infections. *Curr. Opin. Immunol.* 7, 517-523, 1995.
17. Romani, L, Kaufmann SHE. Immunity to fungi. *Res. Immunol.* 149, 277-493, 1998.
18. Romani L. Immunity to *Candida albicans*: Th1, Th2 cells and beyond. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 363-367, 1999.
19. Romani L, Bistoni F. Innate immunity against fungal pathogens in Fungal Pathogenesis: Principles and Clinical Applications (Chilar, R. and R. Calderone, eds), Marcel Dekker, NY, 401-432, 2001.
20. Romani, L, Bistoni F. Systemic immunity in candidiasis. In: Chilar, R., R. Calderone, eds. Fungal Pathogenesis: Principles and Clinical Applications. New York: Marcel Dekker, 483-514, 2001.
21. Romani L, Bistoni F, Puccetti P. Fungi, dendritic cells and receptors: a host perspective of fungal virulence. *Trends Microbiol.* 10, 508-514, 2002.
22. Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cells subtypes. *Nat. Immunol.* 2, 151-161, 2002.
23. Weissmann D, Ni H, Scales D, Dude A, Capodici J, McGibney K, Abdool A, Isaacs SN, Cannon G, Karikò K. HIV Gag mRNA transfection of dendritic cells (DC) delivers encoded antigen to MHC class I and II molecules, causes DC maturation, and induces a potent human in vitro primary immune response. *J. Immunol.* 165, 4710-4717, 2000.