

Gazda-patogén kölcsönhatás vizsgálata *Candida* fertőzések során

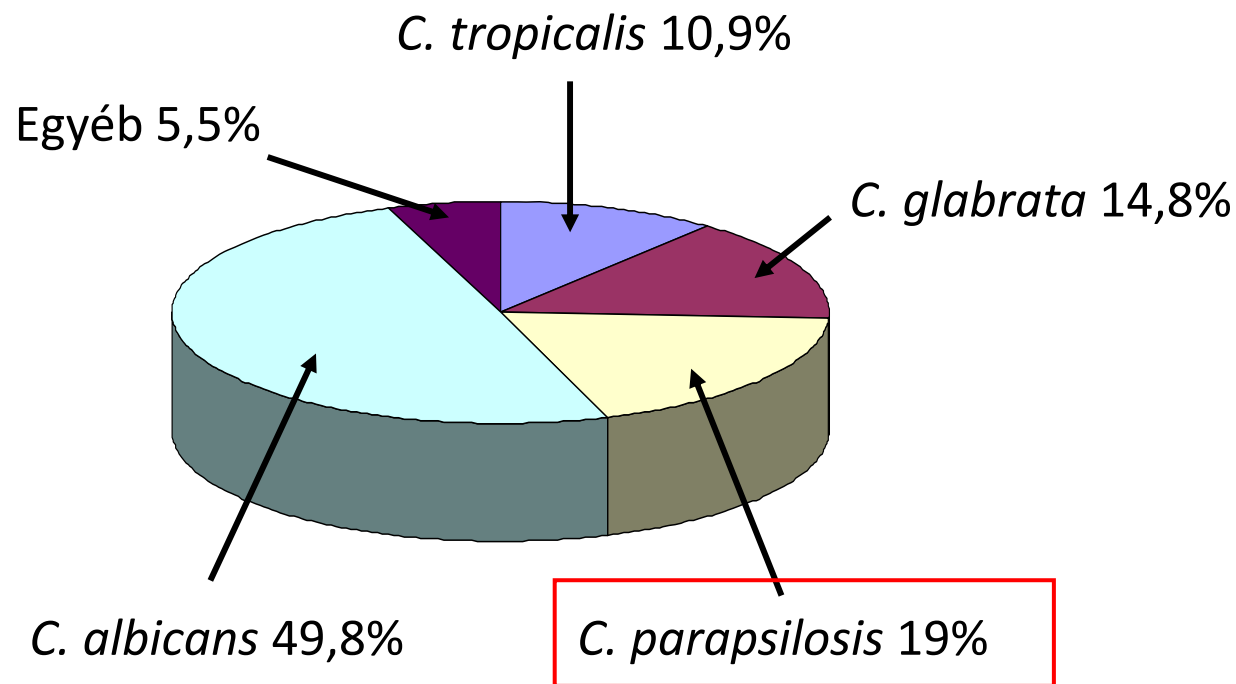
Németh Tibor



SZTE-TTIK Mikrobiológiai tanszék

Candida parapsilosis

- Ascomycota imperfek élesztő, normál humán flóra tagja, gazda kontrol, opportunista patogén



- Ivartalan, diploid, pseudohifa, szekretált enzimek, horizontálisan, nozokomiális fertőzések, nem szükséges kolonizáció, „*parapsilosis sensu lato*” csoport

Célkitűzés

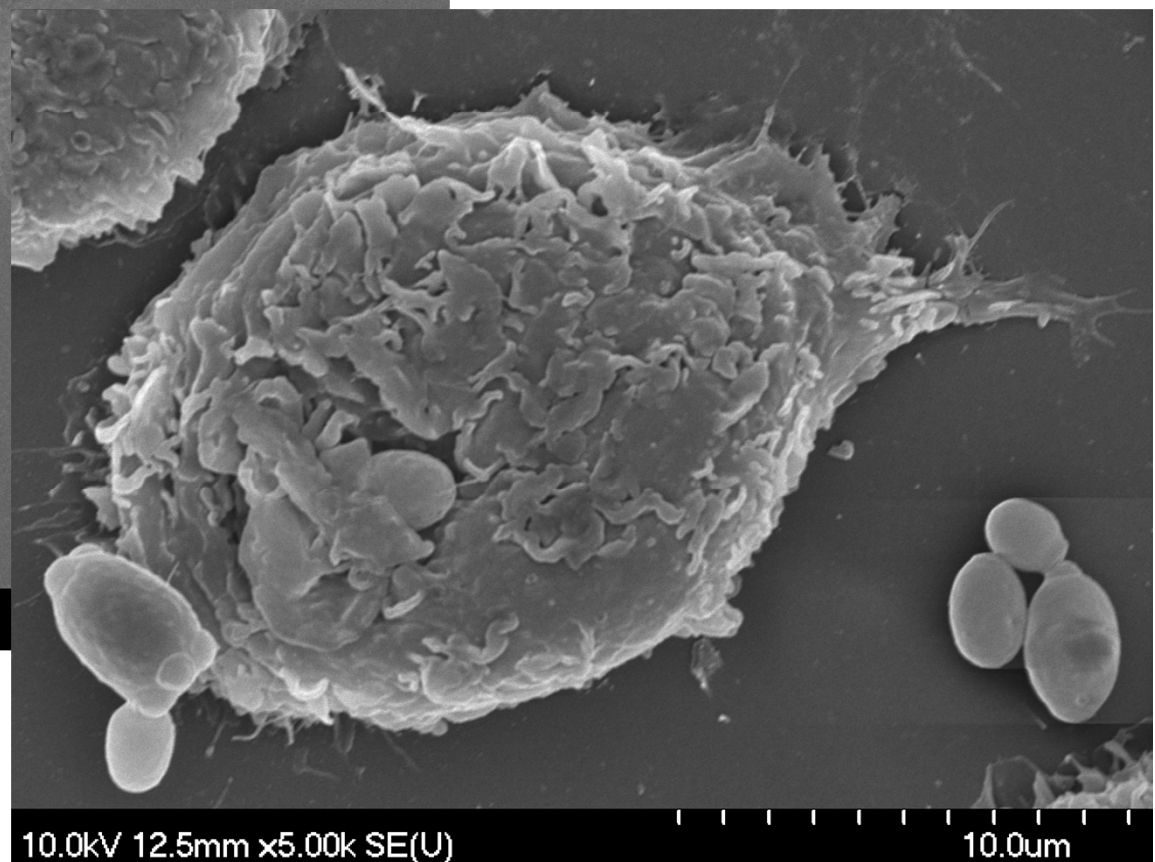
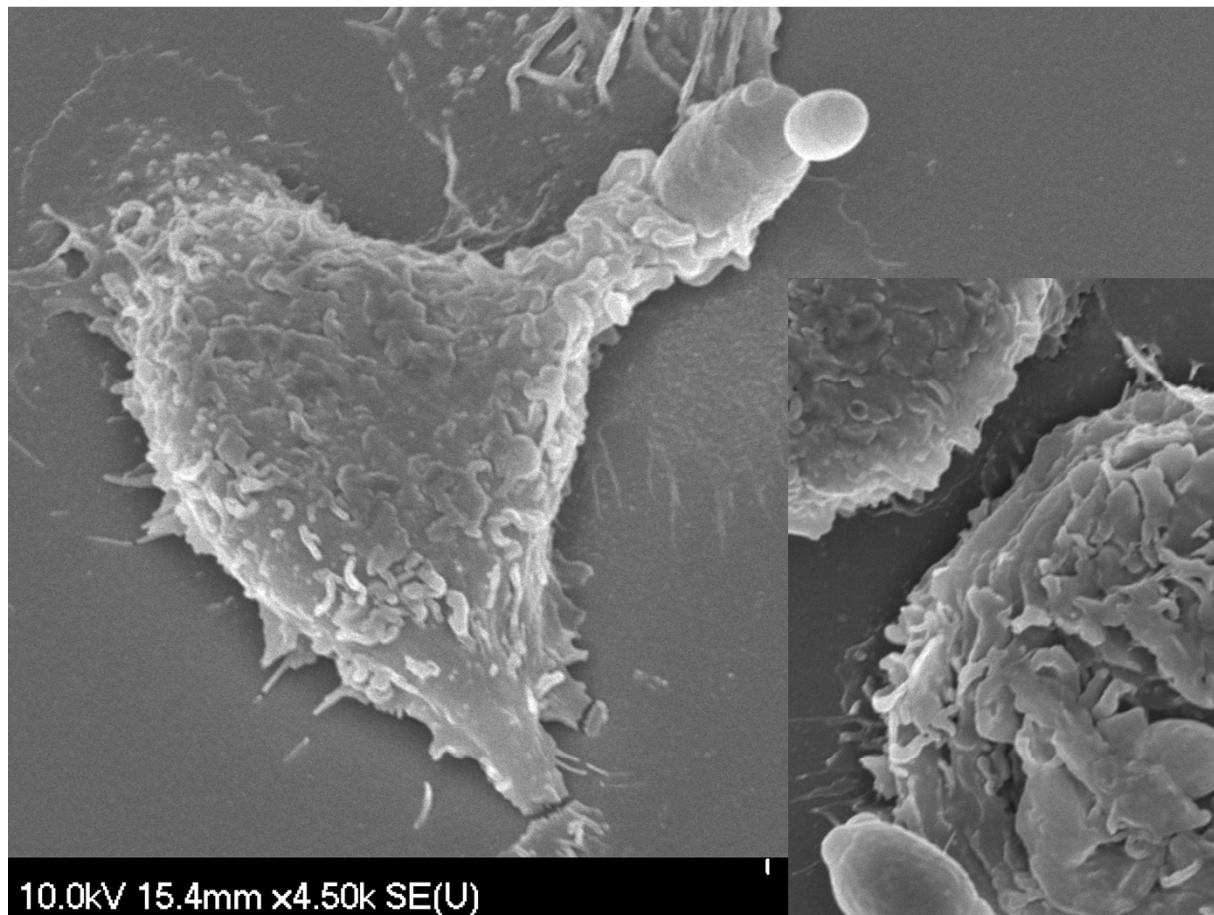
- *C. parapsilosis in vitro* fertőzési modellrendszer alkalmazása, interakció jellemzése, transzkripciós és transzlációs változások vizsgálata
- A *C. parapsilosis* szekretált lipázainak virulenciában betöltött szerepének vizsgálata
- A gazda-patogén interakciók során lejátszódó „molekuláris párbeszéd” feltárása

Gazda-patogén *in vitro* modell: J774.2 és *C. parapsilosis* interakciója

- Gazda: J774.2 egér makrofág szerű sejtvonal
- Patogén: *C. parapsilosis* GA1/LIP⁻ (és egyéb *Candida*-fajok)
- Gazda – patogén: 1 : 5

J774.2 és *C. parapsilosis* interakció: SEM

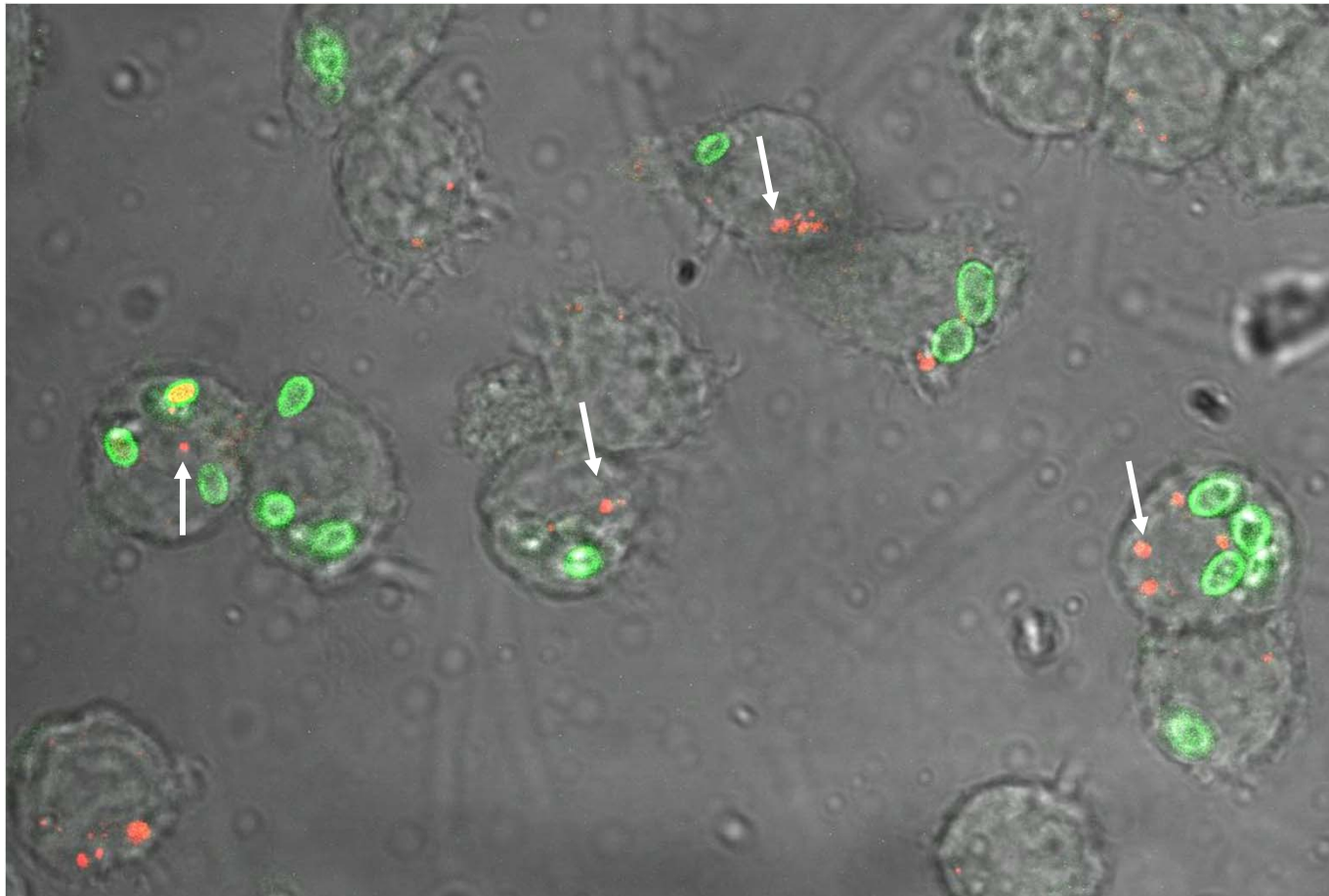
1h inkubációt követően



Fotók:

Petkovits Tamás, Németh Tibor, Gácsér Attila

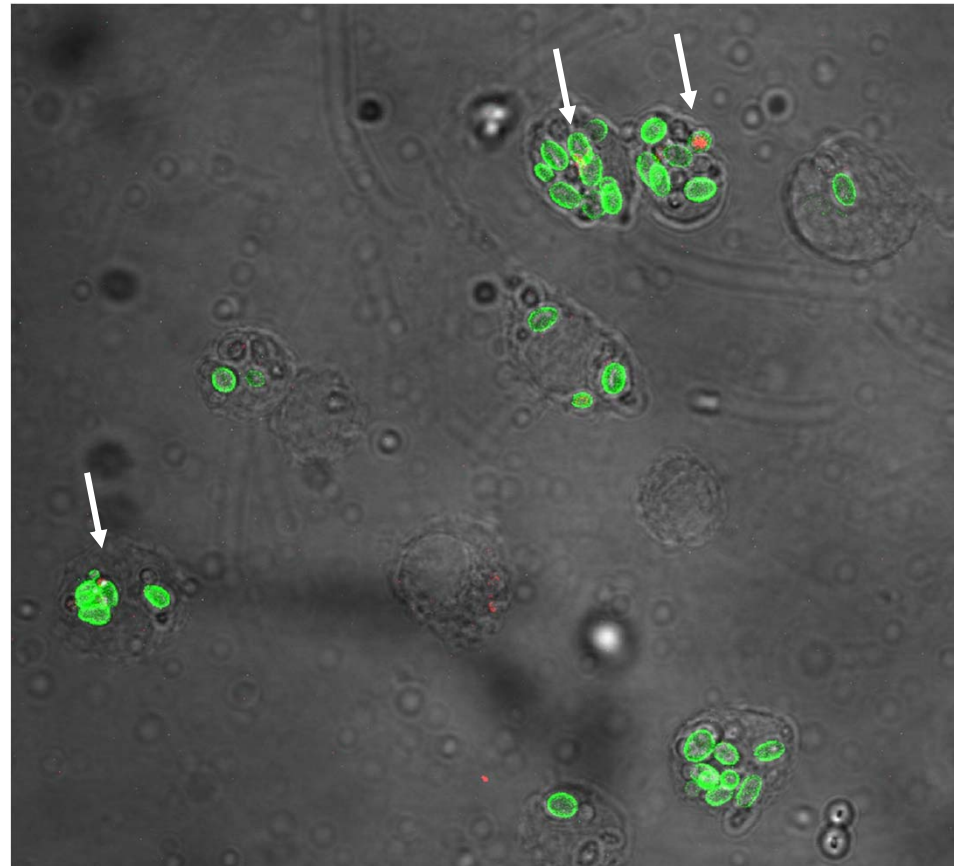
J774.2 és *C. parapsilosis* interakció: konfokális/fluoreszcens mikroszkópia (FITC/Lysotracker red)



3h

Fotók: Csordás Gábor SZBK Genetikai intézet, Németh Tibor

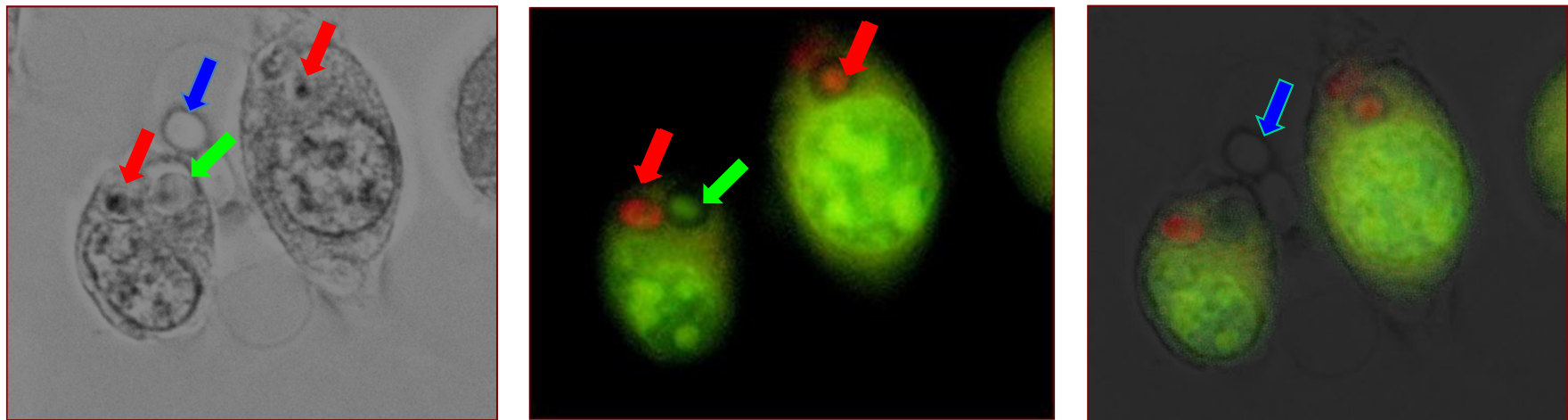
J774.2 és *C. parapsilosis* interakció: konfokális/fluoreszcens mikroszkópia (FITC/Lysotracker red)



8h

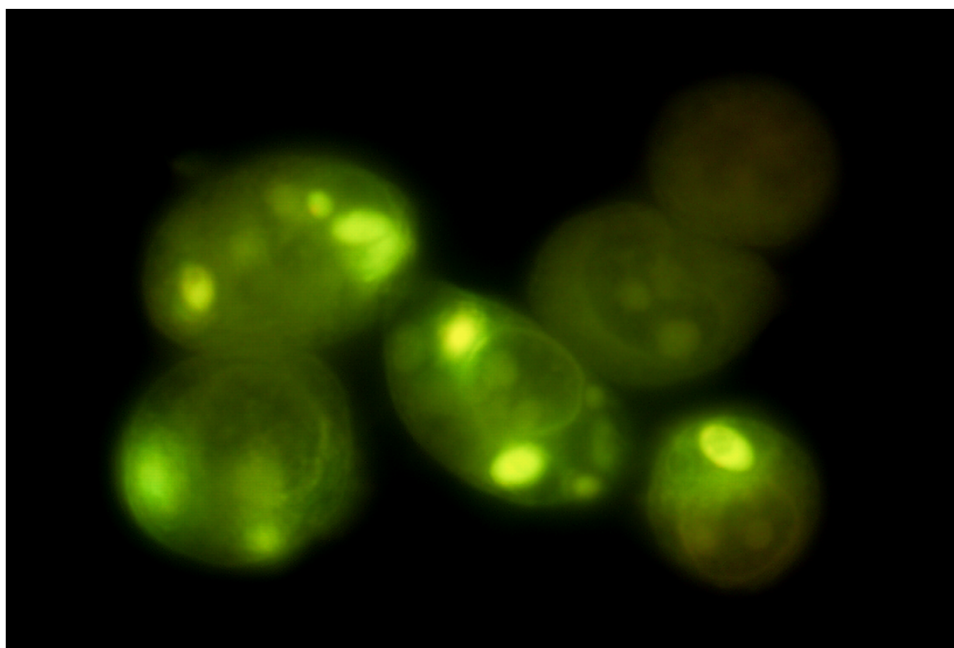
Fotók: Csordás Gábor SZBK Genetikai intézet, Németh Tibor

J774.2 és *C. parapsilosis* interakció: fluoreszcens mikroszkópia (AO/CV)

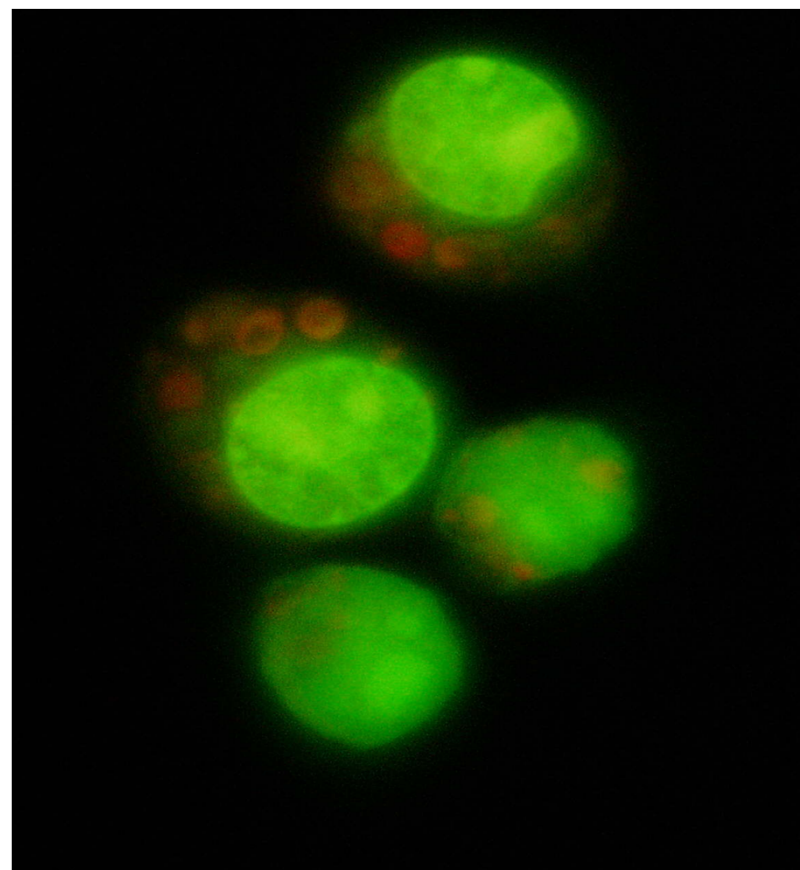


- Akridin narancs: membrán permeábilis festék
ssDNS -> Piros fluoreszcencia (piros nyíl),
dsDNS -> Zöld fluoreszcencia (zöld nyíl).
- Kristály ibolya: membrán impermeábilis festék, a sejtfalhoz kötődik, és kioltja az AO jelet (kék nyíl)

J774.2 és *C. parapsilosis* interakció: fluoreszcens mikroszkópia (AO/CV)



2h

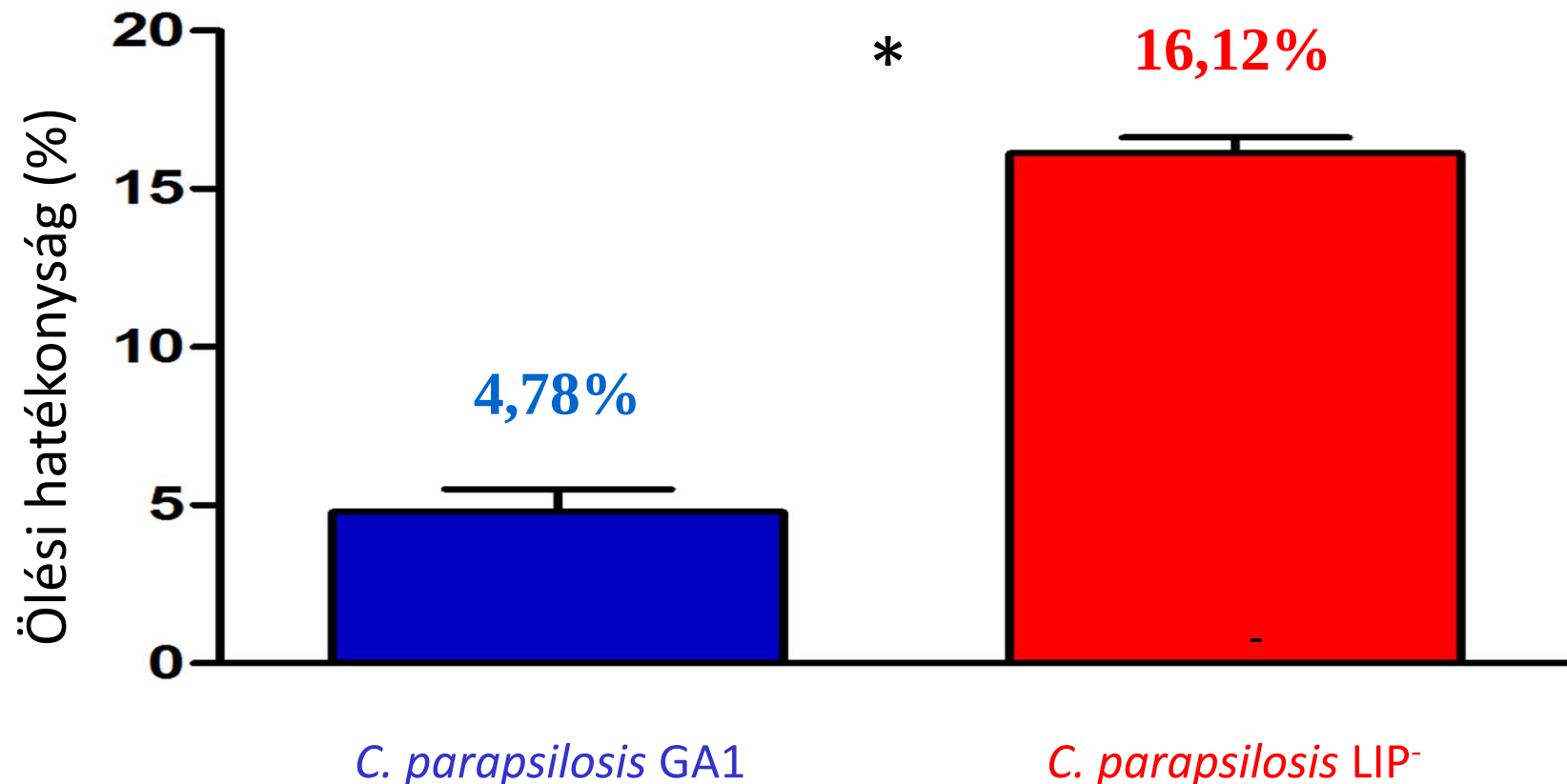


8h

Fotók: Papp Csaba, Németh Tibor

J774.2 és *C. parapsilosis* interakció: Ölési hatékonyság

A gazda sejt gomba ölő képességének vizsgálata és kvantifikálása



Gazda-parogén *in vitro* modell: J774.2 és *C. parapsilosis* interakció

- RNS izolálás 3h és 8h inkubációt követően
- RNS microarray

Gene	Gene product	Fold change 3h	Fold change 8h
<i>TNFRSF9</i>	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	14.1	74.3
<i>IL1RN</i>	interleukin 1 receptor antagonist (Il1rn), transcript variant 1	9.01	>2
<i>CD83</i>	CD83 antigen (Cd83)	8.2	2.8
<i>CCLR2</i>	chemokine (C-C motif) receptor-like 2	5.7	>2
<i>TNFAIP3</i>	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	5.15	3.8
<i>IL7R</i>	interleukin 7 receptor	4.53	5.3
<i>IL1R2</i>	interleukin 1 receptor, type II	4.21	>2
<i>CXCL2</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	3.42	4.7
<i>CCL7</i>	chemokine (C-C motif) ligand 7	3.11	-14.5
<i>PTGS2</i>	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	3.04	7.4
<i>CD86</i>	CD86 antigen (Cd86)	3.00	2.7
<i>TRAF1</i>	Tnf receptor-associated factor 1	2.79	2.13
<i>TNF</i>	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	>2	2.9
<i>IL12b</i>	interleukin 12b (Il12b)	>2	13.03
<i>IL1b</i>	interleukin 1 beta	>2	2.29



-> Sejt-ciklus gének

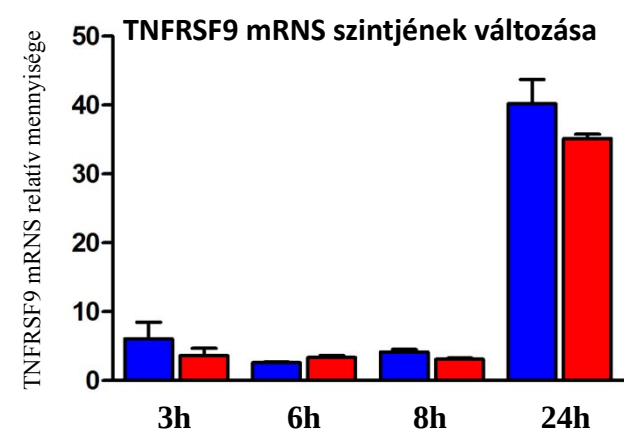
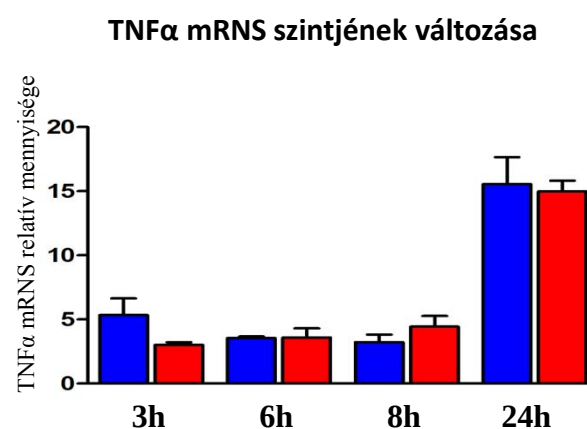
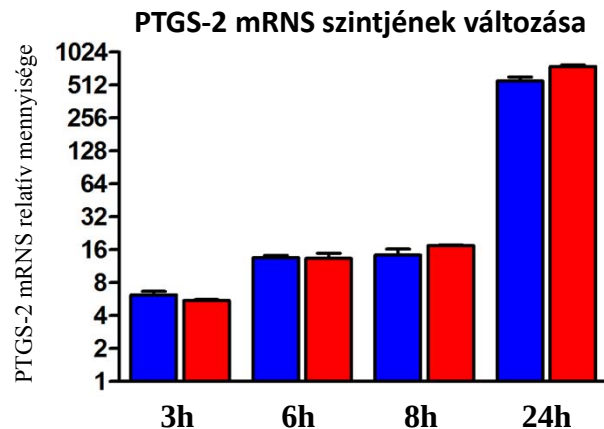
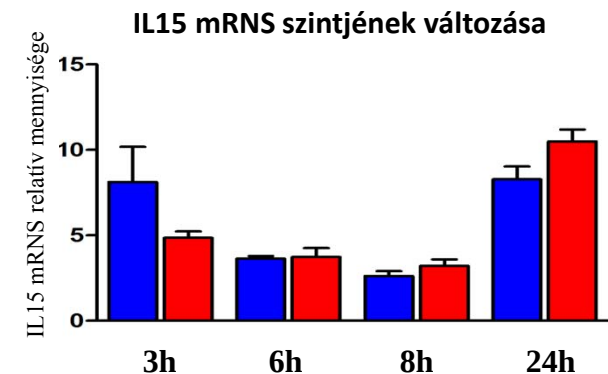
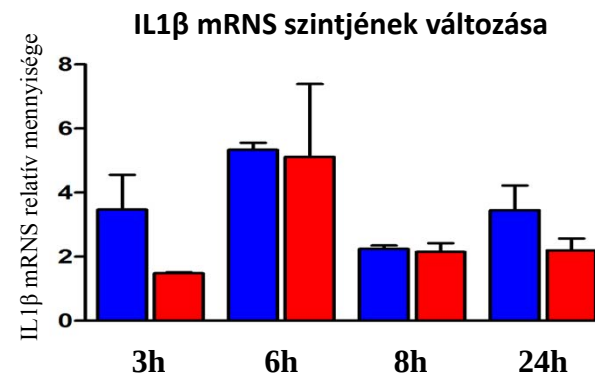
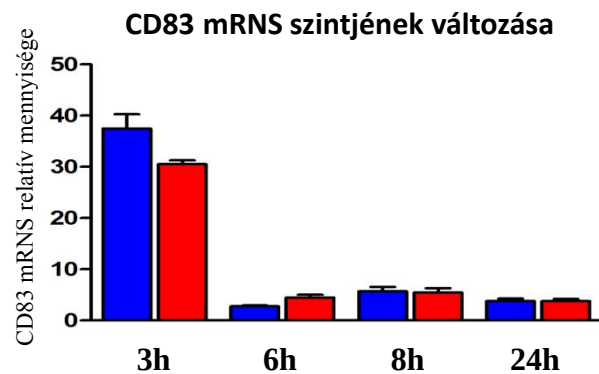
-> Stresszválasz gének

-> Gyulladás

-> Immunválasz

-> Sérülésre adott válasz

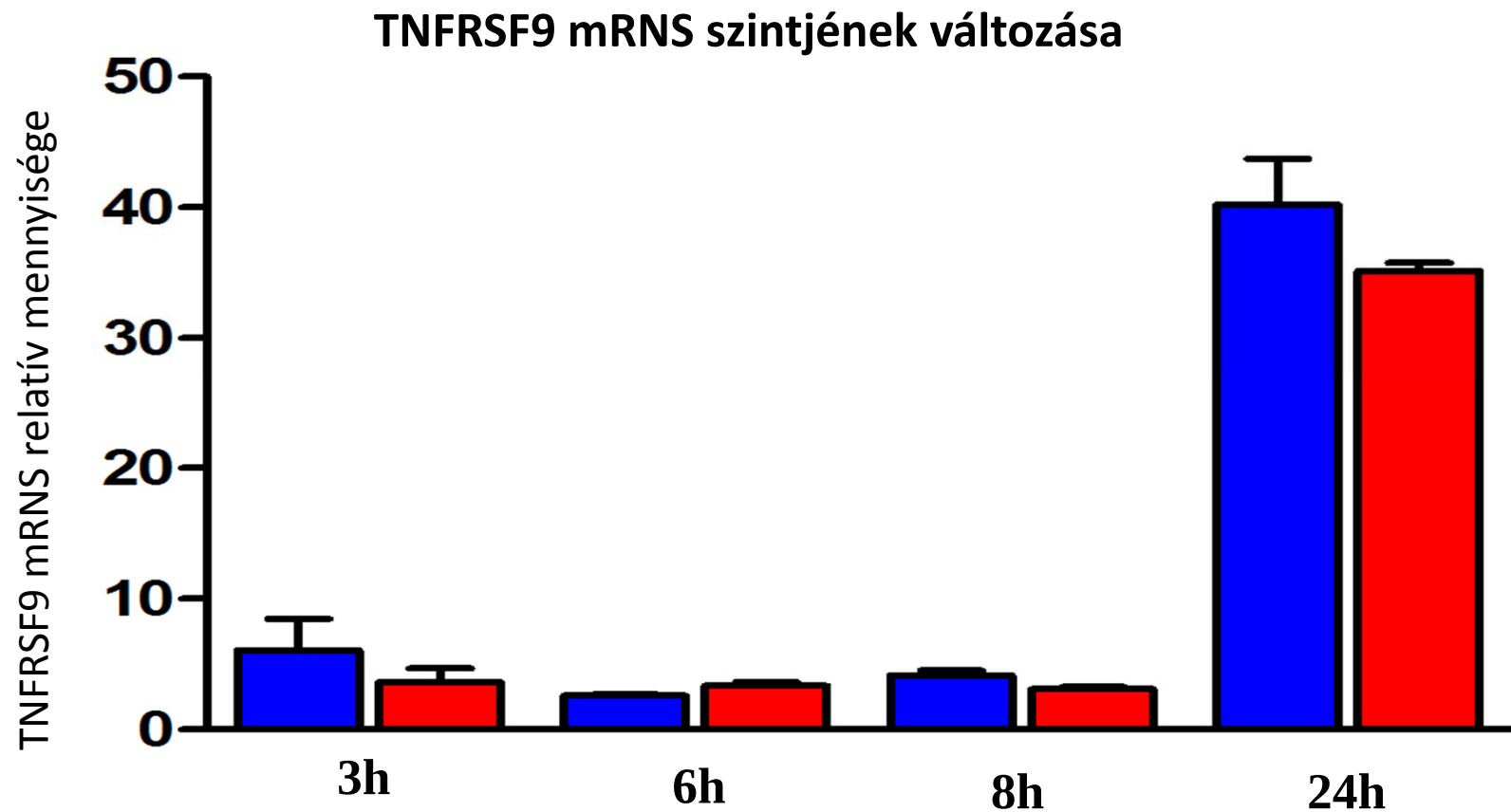
J774.2 és *C. parapsilosis* interakció: microarray validáció (3, 6, 8, 24h)



C. parapsilosis GA1

C. parapsilosis LIP⁻

J774.2 és *C. parapsilosis* interakció: microarray validáció: TNFRSF9



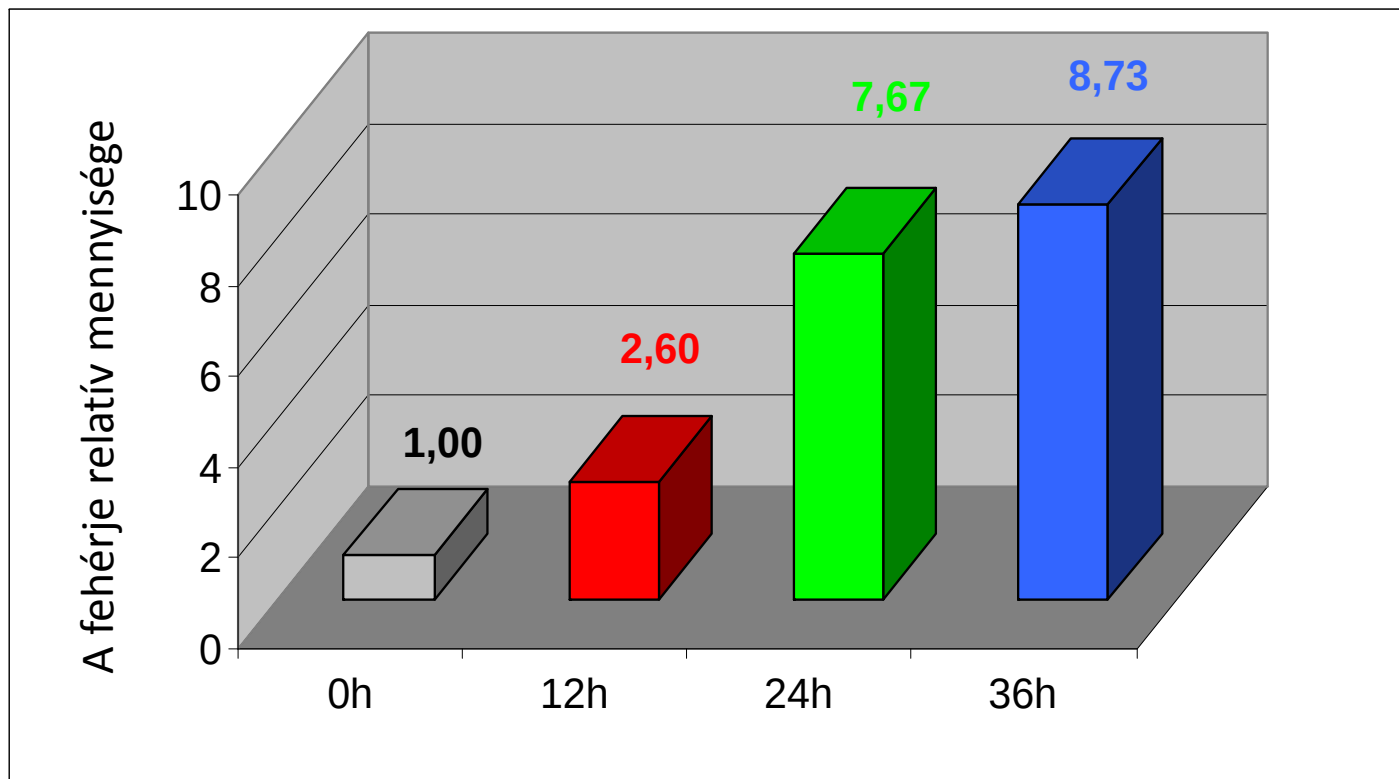
C. parapsilosis GA1 *C. parapsilosis* LIP⁻

J774.2 and *C. parapsilosis* interakció: TNFRSF9 (CD137, 4-1BB, ILA)

- Tumor necrosis factor receptor superfamily 9
- T-cell aktiváció alkalmával upregulálódik
- CD4+ T-sejtek kostimulációja
- TH1 T-helper válasz indukálása

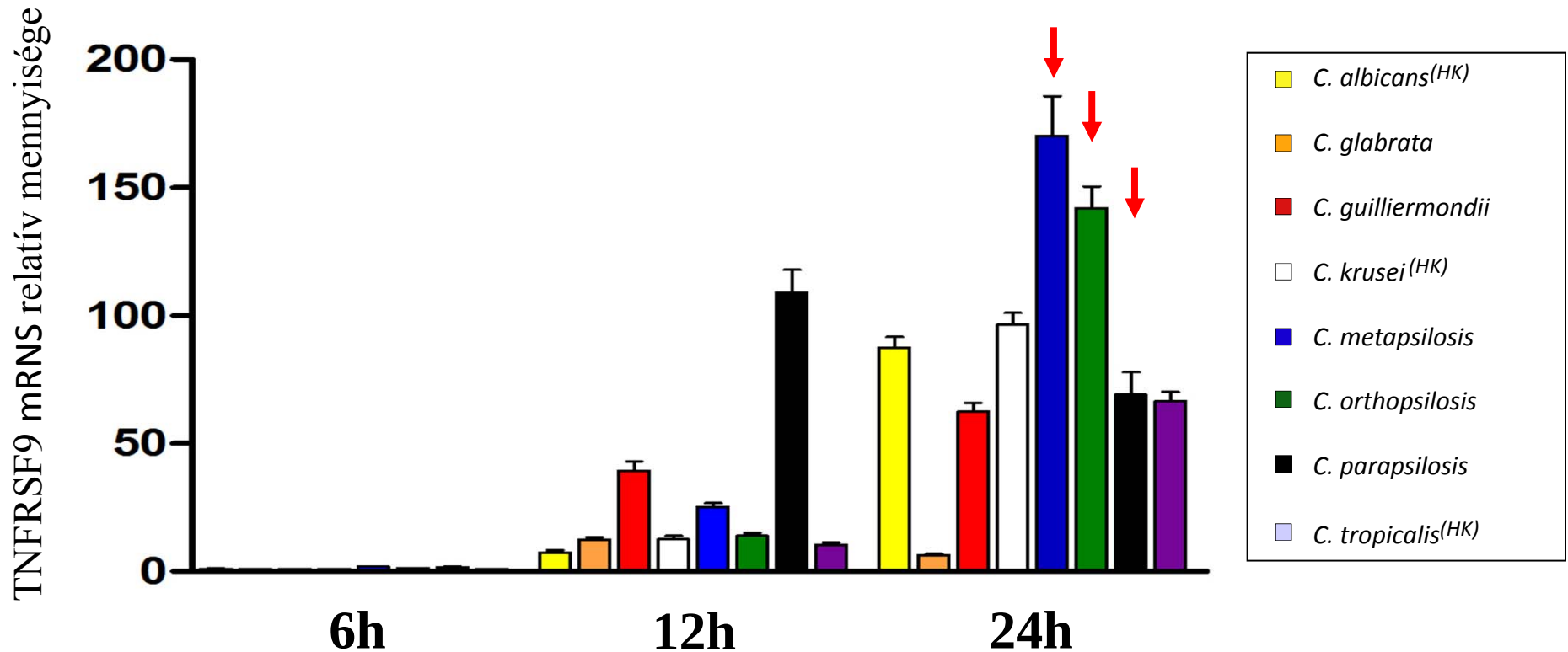
J774.2 és *C. parapsilosis* interakció: TNFRSF9 fehérje

TNFRSF9 fehérje relatív mennyisége a sejtfelszínen
J774.2 vs *C. parapsilosis* WT – Flow cytometry



J774.2 és *C. parapsilosis* interakció: TNFRSF9 mRNS

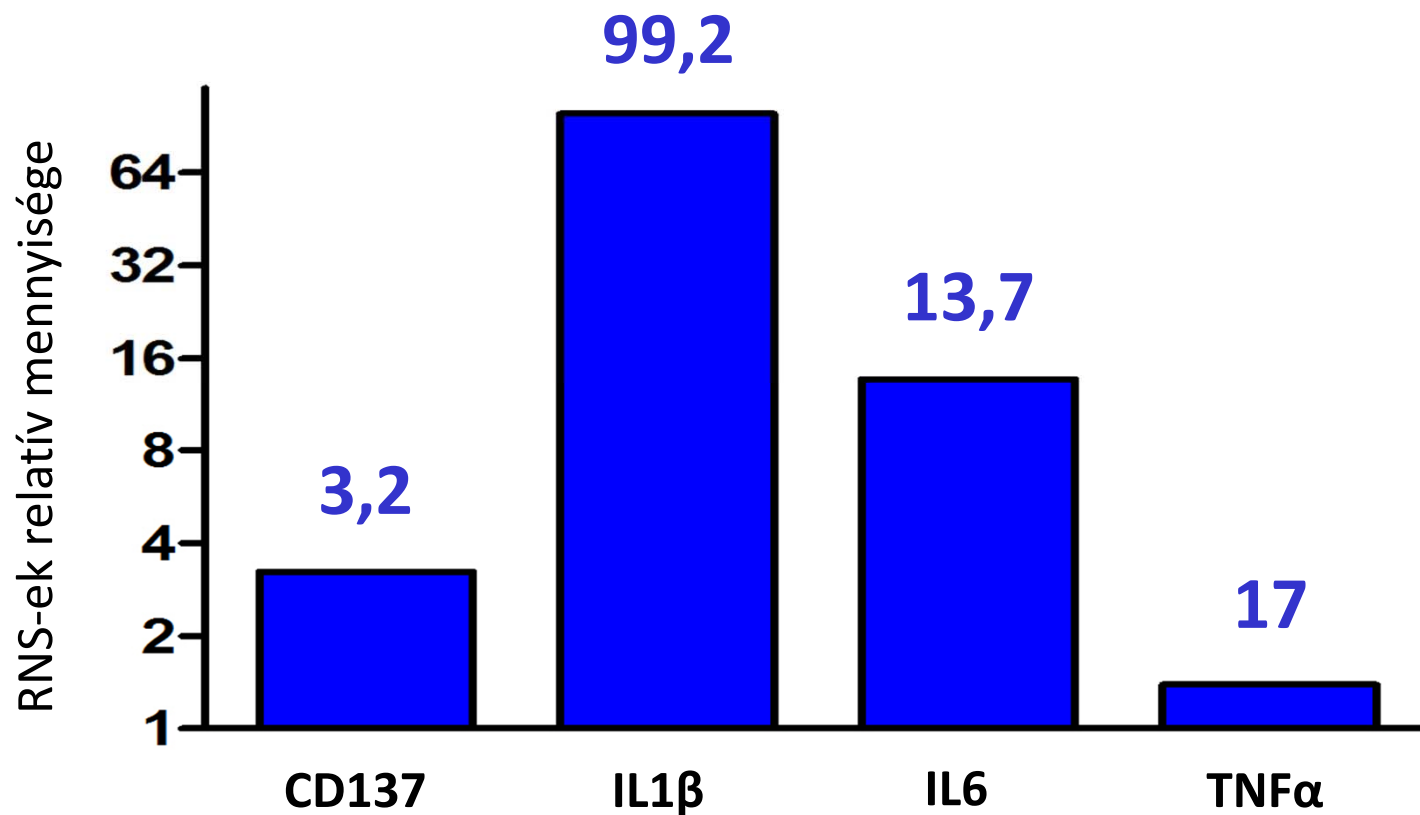
TNFRSF9 mRNS relatív szintjének változása különböző *Candida* fajok hatására



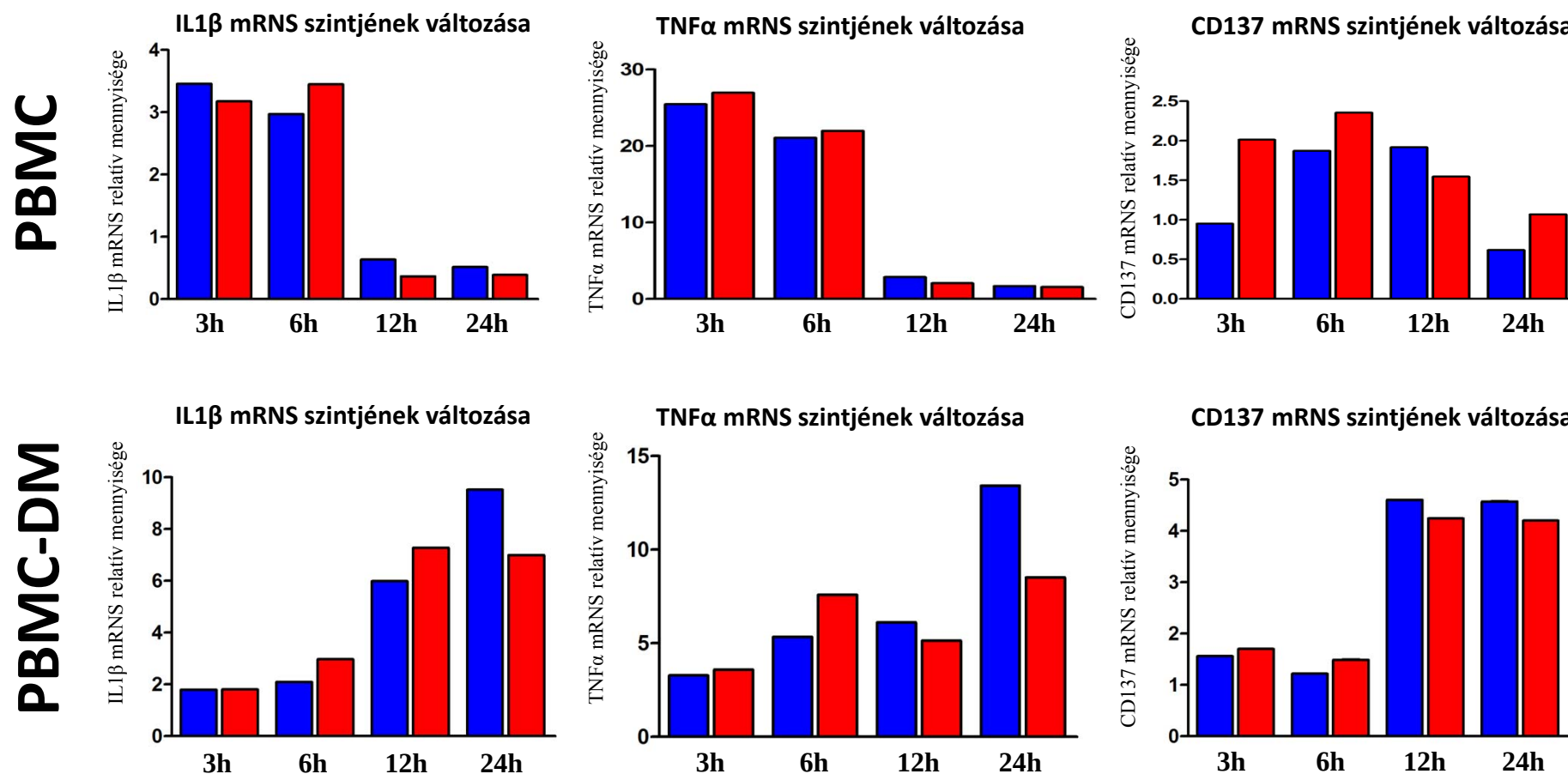
„*C. parapsilosis sensu lato*”

Humán vérsejtek és *C. parapsilosis* interakciója: CD137 és citokinek

Humán teljes vér transzkripciós profilja *C. parapsilosis*-szal
történő 4 órás inkubációt követően



Humán primer PBMC-k/makrofágok és *C. parapsilosis* interakciója: CD137 és citokinek



C. parapsilosis GA1 *C. parapsilosis* LIP⁻

Gazda-patogén *in vitro* modell: THP-1 és nyolc különböző *Candida* törzs interakciója

(Kollaboráció: Toni Gabaldón PhD, Leszek Peter Pryszcz)

- Gazda: THP-1 humán monocita szerű sejt vonal
- Gomba: *Candida parapsilosis* CBS1948, CBS6318, CDC317, GA1/LIP⁻/OLE2⁻, *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis*.
- RNS izolálás 1, 3, 6, 12 órával a fertőzés után
- A gazdából és a gombából is!!!
- RNASeq -> RNS-ek mennyiségi és minőségi meghatározása
- Az interakció során lezajló transzkripciós változások széles körű jellemzése, összehasonlítása + kinetika
- Patogenitás evolúciója

Gazda-patogén *in vitro* modell: THP-1 és nyolc különböző *Candida* törzs interakciója: THP-1

Citokinek, enzimek

- CCL2 – kemotaktikus hatás -> monociták és basofilek
- (TNF, IL-1 ->) CXCL12 (csak CDC317 upregulálja) -> kemotaktikus hatás -> limfociták
- Mátrix Metalloproteináz 9 (csak CDC317 NEM upregulálja) -> IV és V típusú kollagéneket bontja
- Adenilát ciklázok: minden törzs 1 féle ADCY enzimet upregulál (ADCY8), CDC317 négyet (ADCY1/3/6/8)

Összefoglalás

- *C. parapsilosis* által kiváltott gazda válasz feltárása, mikroszkópos megfigyelések, transzkripciós változások
- TH1-es válasz
- TNFRSF9/CD137
- Egér sejtvonala, egér primer sejtek, humán teljes vér, humán primer PBMC-k/PBMC-DM-k
- Részletes transzkripciós analízis, THP-1 humán monocita szerű sejtvonala

Köszönetnyilvánítás



- Prof. Vágvolgyi Csaba
- Dr. Gácsér Attila
- Joshua D. Nosanchuk, Oscar Zaragoza
- Dr. Hamari Zsuzsanna
- Dr. Sinka Rita, Dr. Laurinyecz Barbara
- Petkovits Tamás
- Csordás Gábor
- Grózer Zsuzsanna, Szenzenstein Judit, Tóth Adél, Tóth Renáta, Horváth Péter
- Dávid Edina
- Papp Csaba
- Pintér Lilla, Csonka Kata
- Mikrobiológiai tanszék munkatársai



TÁMOP 4.2.2.

