

# Interakce salmonel se savčími makrofágy *in vitro*

Jaroslav Juráček

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, Brno  
Vedoucí bakalářské práce: Doc. RNDr. Ivan Rychlík, Ph.D.



# Izolace a kultivace prasečích alveolárních makrofágů

- ▶ z plic zdravých prasat (apikální část)
- ▶ zavedení katetru a proplach PBS
- ▶ centrifugace (12 000 g, 10 min)
- ▶ DMEM medium (2 % prasečího séra, obsah antibiotik)
- ▶ vysetí na 24-jamkovou kultivační desku v hustotě  $2 \times 10^5$
- ▶ po 2 hodinách koncentrace séra zvýšena na 10 %
- ▶ kultivace přes noc
- ▶ výměna media za DMEM medium bez obsahu antibiotik



# Infikace makrofágů salmonelou

- ▶ kultivace bakterií v LB mediu 6 h při 37° C
- ▶ multiplicita infekce nastavena na 5
- ▶ po 1 h gentamicin o baktericidní koncentraci (100 µg/ml)
- ▶ po další hodině gentamicin o bakteriostatické koncentraci (15 µg/ml)
- ▶ interakce ukončena po 4 a 24 hodinách

## Cytotoxicita salmonel

- ▶ stanovení LDH v mediu
- ▶ CytoTox 96R Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, USA)



## Invazivita salmonel

- ▶ stanovení počtu intracelulárních salmonel
- ▶ 20 min lyzace (TritonX-100)
- ▶ sériové rozředění a vysetí na LB agar (kult. 24 h při 37° C)
- ▶ přepočet na počet bakterií

## Izolace RNA

- ▶ RNeasy Mini Kit (Qiagen, Německo)

## Reverzní transkripce

- ▶ M-MLV Reverse Transcriptase (200 U, Invitrogen, USA)
- ▶ oligo-dT primery



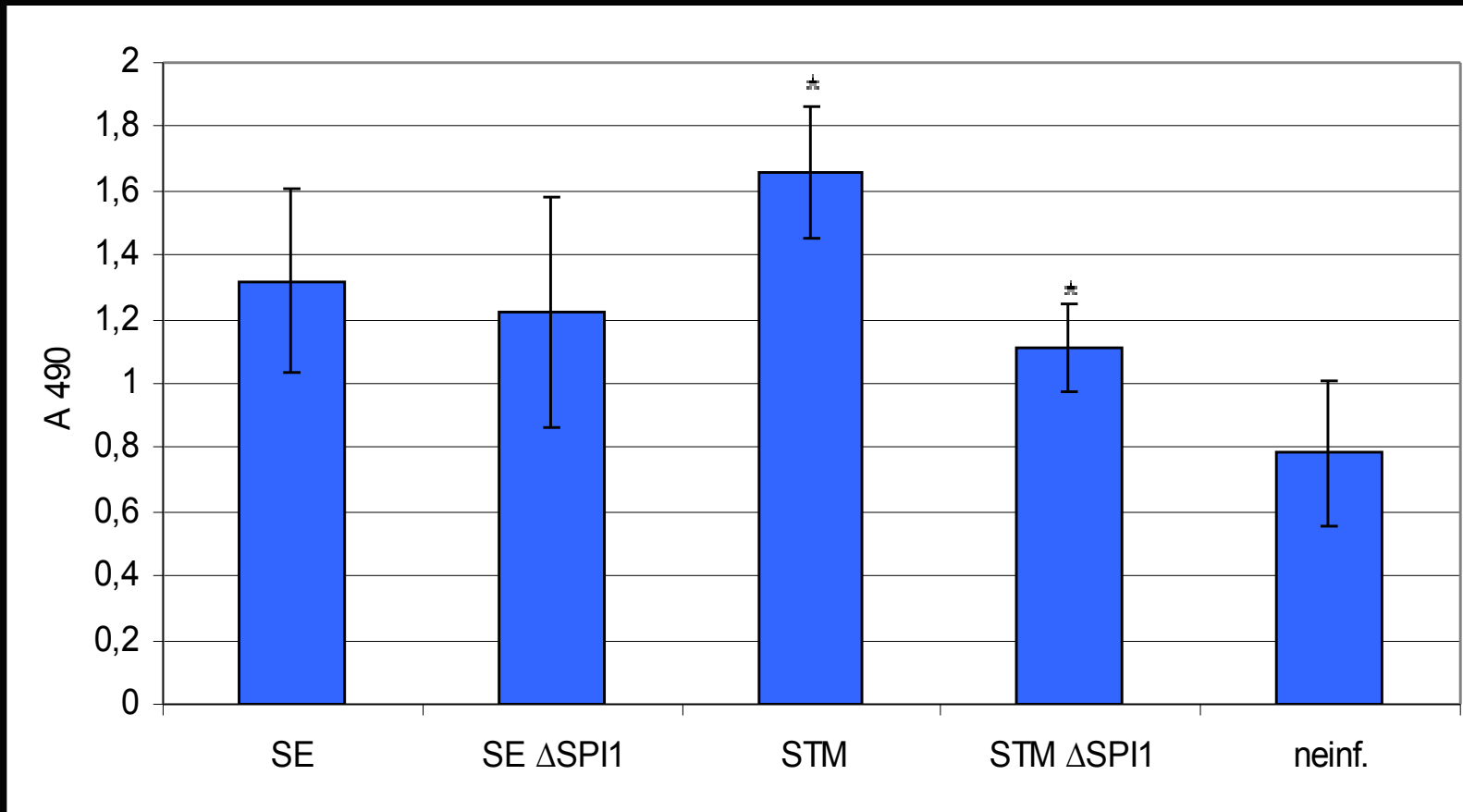
# Kvantitativní real-time PCR

- ▶ QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Německo)
- ▶ genově specifické primery
- ▶ LightCycler 480 (Roche, Basilej, Švýcarsko)
- ▶ exprese genů GM-CSF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-12 $\alpha$ , IL-12 $\beta$ , IL-18, IL-23 $\alpha$ , TGF- $\beta$ , iNOS, p47phox , SOD a Nramp1
- ▶ house keeping gen HPRT

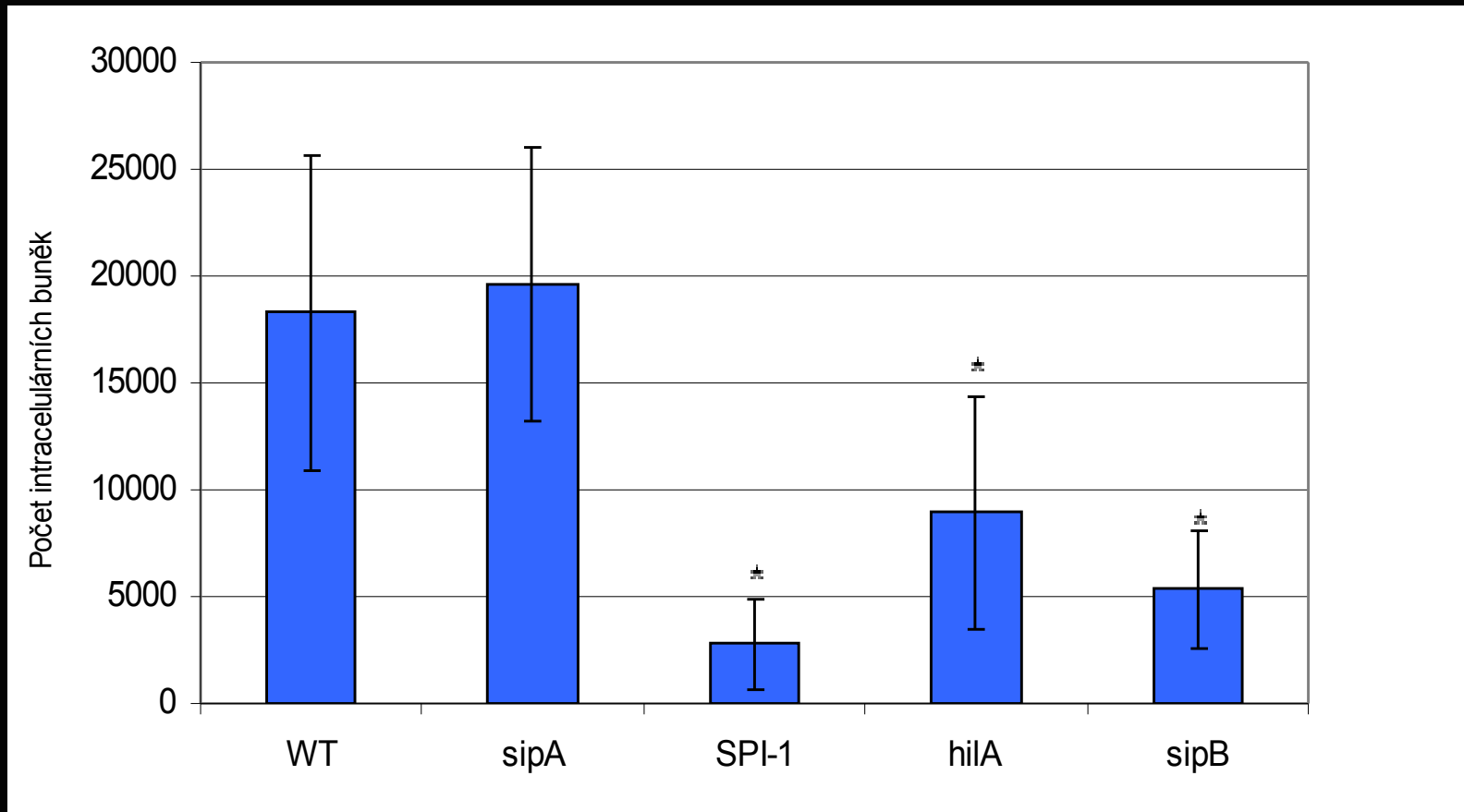


# VÝSLEDKY

## Cytotoxicita salmonel



# Invazivita salmonel



# Infekce STM a $\Delta$ SPI1 mutantem

	délka infekce S.Typhimurium 4 hodiny			délka infekce S.Typhimurium 24 hodin		
	divoký kmen	$\Delta$ SPI1 mutant	neinfikované makrofágy	divoký kmen	$\Delta$ SPI1 mutant	neinfikované makrofágy
IL-1 $\beta$	58,9 $\pm$ 22,3	211,5 $\pm$ 38,4	3,08 $\pm$ 1,90	11,1 $\pm$ 0,3	52,2 $\pm$ 20,1	0,15 $\pm$ 0,03
IL-8	19,8 $\pm$ 6,9	51,3 $\pm$ 7,6	5,00 $\pm$ 2,30	6,7 $\pm$ 2,3	35,5 $\pm$ 15,1	0,20 $\pm$ 0,09
TNF- $\alpha$	88,0 $\pm$ 38,8	321,1 $\pm$ 111,0	2,8 $\pm$ 1,4	4,5 $\pm$ 0,6	6,6 $\pm$ 2,0	0,17 $\pm$ 0,04
IL-23 $\alpha$	6,5 $\pm$ 1,7	41,6 $\pm$ 6,9	0,41 $\pm$ 0,17	10,2 $\pm$ 3,5	61,2 $\pm$ 22,8	0,074 $\pm$ 0,037
GM-CSF	0,13 $\pm$ 0,02	0,67 $\pm$ 0,19	0,054 $\pm$ 0,019	1,06 $\pm$ 0,15	1,57 $\pm$ 0,30	0,015 $\pm$ 0,004
IL-12 $\beta$	0,060 $\pm$ 0,045	0,080 $\pm$ 0,065	0,061 $\pm$ 0,057	0,36 $\pm$ 0,06	0,62 $\pm$ 0,25	0,0019 $\pm$ 0,0004
TGF- $\beta$	15,1 $\pm$ 1,9	16,3 $\pm$ 2,2	18,3 $\pm$ 1,8	37,4 $\pm$ 7,3	29,4 $\pm$ 0,4	10,7 $\pm$ 1,4
IL-18	0,24 $\pm$ 0,08	0,31 $\pm$ 0,14	0,169 $\pm$ 0,003	0,40 $\pm$ 0,10	0,51 $\pm$ 0,14	0,17 $\pm$ 0,04
Nramp1	69,3 $\pm$ 17,6	67,1 $\pm$ 7,6	77,2 $\pm$ 10,6	122,5 $\pm$ 31,3	126,2 $\pm$ 18,7	47,7 $\pm$ 10,3
SOD	17,6 $\pm$ 3,7	17,1 $\pm$ 1,7	17,2 $\pm$ 1,8	19,9 $\pm$ 5,0	13,1 $\pm$ 2,0	10,3 $\pm$ 2,4
IL-6	0,028 $\pm$ 0,011	0,145 $\pm$ 0,048	0,0017 $\pm$ 0,0005	0,032 $\pm$ 0,018	0,019 $\pm$ 0,010	0,0011 $\pm$ 0,0004
IL-12 $\alpha$	0,0007 $\pm$ 0,0003	0,0011 $\pm$ 0,0006	0,0007 $\pm$ 0,0003	nedetekováno	0,0002 $\pm$ 0,0002	nedetekováno
p47 <sup>phox</sup>	7,3 $\pm$ 2,9	8,3 $\pm$ 2,4	10,4 $\pm$ 3,0	5,3 $\pm$ 2,6	6,4 $\pm$ 3,4	5,1 $\pm$ 2,4
iNOS	0,0049 $\pm$ 0,0034	0,0164 $\pm$ 0,0173	0,0028 $\pm$ 0,0025	0,0020 $\pm$ 0,0014	0,0017 $\pm$ 0,0015	0,0018 $\pm$ 0,0013

Nedetekováno – exprese genů příliš nízká, nebylo možné RT-PCR detekovat.





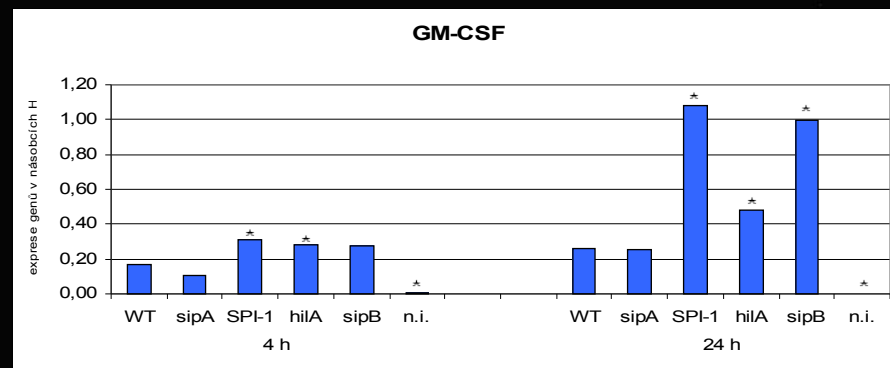
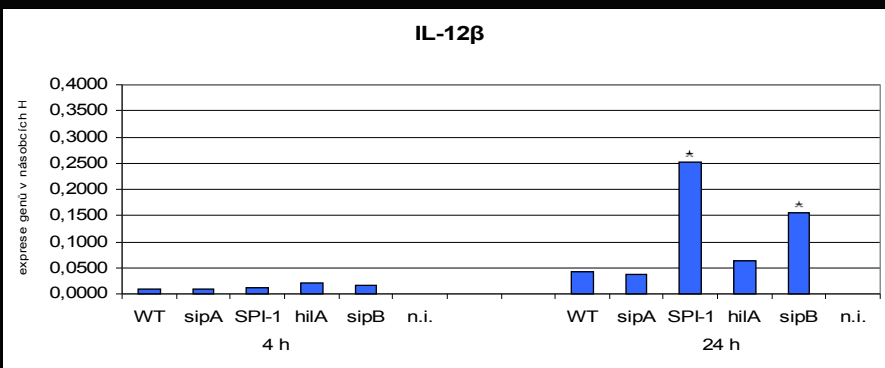
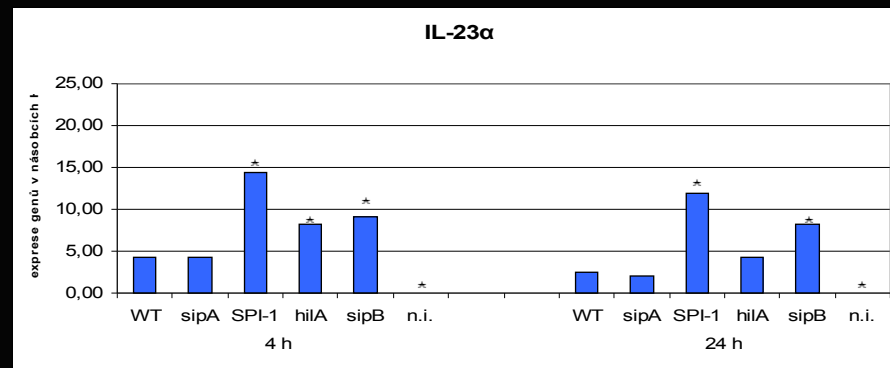
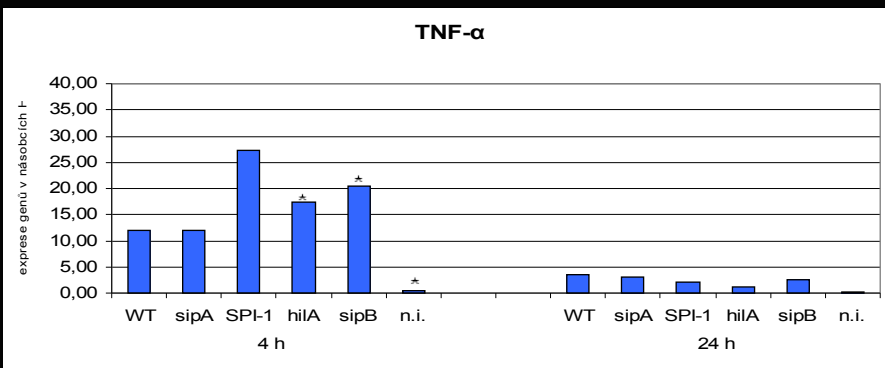
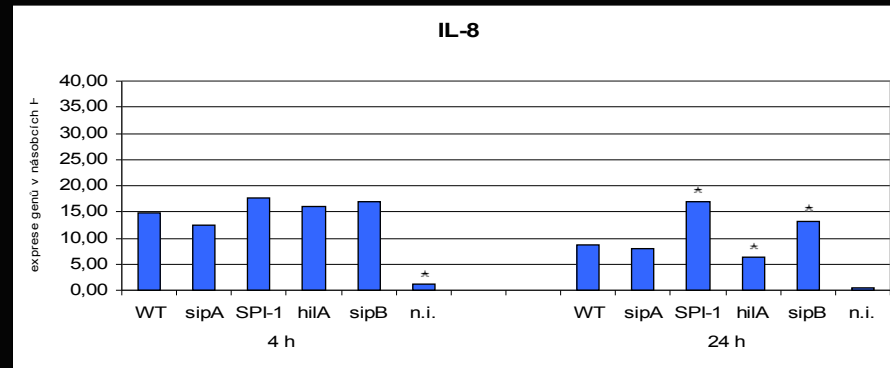
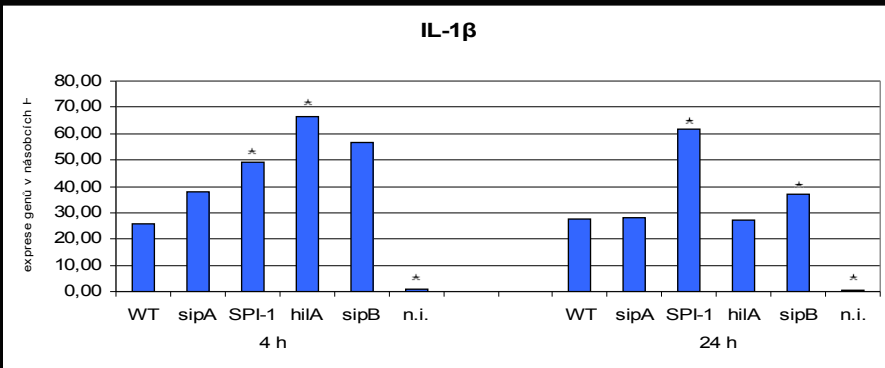
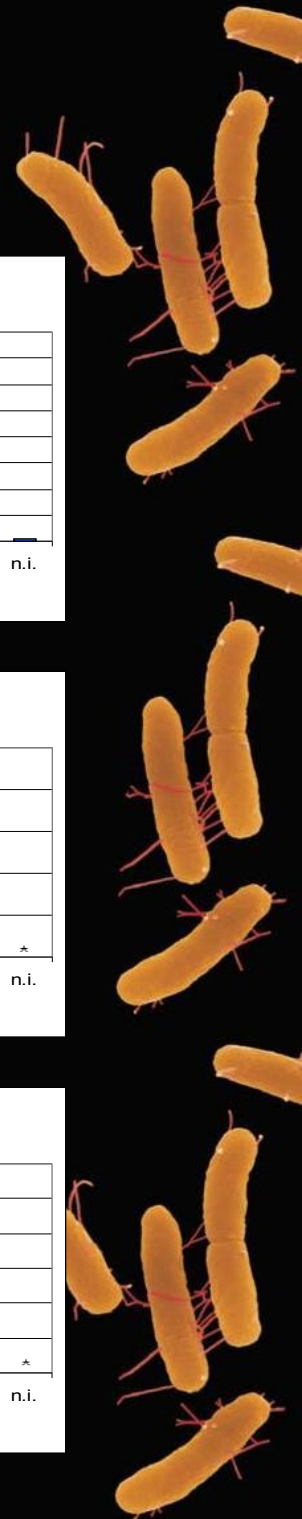
# Infekce SE a $\Delta$ SPI1 mutantem

	délka infekce S.Enteritidis 4 hodiny			délka infekce S.Enteritidis 24 hodin		
	divoký kmen	$\Delta$ SPI1 mutant	neinfikované makrofágy	divoký kmen	$\Delta$ SPI1	neinfikované makrofágy
IL-1 $\beta$	74,3 $\pm$ 59,7	187,5 $\pm$ 163,1	0,62 $\pm$ 0,28	36,8 $\pm$ 13,6	238,5 $\pm$ 224,5	0,20 $\pm$ 0,19
IL-8	15,7 $\pm$ 3,7	23,4 $\pm$ 9,4	0,92 $\pm$ 0,57	5,5 $\pm$ 4,7	17,5 $\pm$ 6,4	0,19 $\pm$ 0,18
TNF- $\alpha$	57,9 $\pm$ 54,9	113,8 $\pm$ 105,1	1,1 $\pm$ 1,0	9,6 $\pm$ 7,1	15,6 $\pm$ 17,0	0,20 $\pm$ 0,07
IL-23 $\alpha$	7,6 $\pm$ 5,3	30,5 $\pm$ 22,6	0,05 $\pm$ 0,02	4,7 $\pm$ 2,6	83,1 $\pm$ 82,8	0,014 $\pm$ 0,007
GM-CSF	0,19 $\pm$ 0,15	0,32 $\pm$ 0,19	0,02 $\pm$ 0,03	0,37 $\pm$ 0,27	1,92 $\pm$ 1,64	0,015 $\pm$ 0,020
IL-12 $\beta$	0,025 $\pm$ 0,026	0,043 $\pm$ 0,038	0,0008 $\pm$ 0,0001	0,29 $\pm$ 0,31	3,01 $\pm$ 3,63	0,0009 $\pm$ 0,0005
TGF- $\beta$	18,6 $\pm$ 6,4	18,7 $\pm$ 6,8	11,2 $\pm$ 2,1	15,2 $\pm$ 7,2	25,4 $\pm$ 18,3	12,3 $\pm$ 5,6
IL-18	0,56 $\pm$ 0,34	0,72 $\pm$ 0,39	0,16 $\pm$ 0,08	0,66 $\pm$ 0,38	1,13 $\pm$ 0,49	0,60 $\pm$ 0,58
Nramp1	36,8 $\pm$ 20,0	32,9 $\pm$ 21,1	25,8 $\pm$ 12,9	29,6 $\pm$ 17,1	67,9 $\pm$ 48,5	18,0 $\pm$ 7,7
SOD	5,9 $\pm$ 2,5	6,3 $\pm$ 3,0	4,9 $\pm$ 2,3	3,7 $\pm$ 1,6	7,5 $\pm$ 5,5	3,4 $\pm$ 1,4
IL-6	0,27 $\pm$ 0,37	0,92 $\pm$ 1,35	0,0012 $\pm$ 0,0011	0,23 $\pm$ 0,34	1,79 $\pm$ 2,88	nedetekováno
IL-12 $\alpha$	0,017 $\pm$ 0,020	0,013 $\pm$ 0,012	0,0016 $\pm$ 0,0006	0,026 $\pm$ 0,036	0,0249 $\pm$ 0,03	nedetekováno
p47 <sup>phox</sup>	4,7 $\pm$ 1,4	6,5 $\pm$ 1,7	5,5 $\pm$ 1,7	2,9 $\pm$ 0,5	4,2 $\pm$ 1,1	4,2 $\pm$ 2,0
iNOS	0,012 $\pm$ 0,005	0,064 $\pm$ 0,035	0,0015 $\pm$ 0,0004	0,0055 $\pm$ 0,0061	0,026 $\pm$ 0,039	0,0025 $\pm$ 0,0006

Nedetekováno – exprese genů příliš nízká, nebylo možné RT-PCR detekovat.



# Infekce SE a jejími $\Delta$ SPI1, hiIA, sipA a sipB mutanty



# ZÁVĚR

- ▶ objasněné funkce SPI-1 : invaze do buněk  
pyroptóza makrofágů (*sipB*)
- ▶ nově objevená funkce SPI-1 :  
POTLAČENÍ CYTOKINOVÉ ODPOVĚDI MAKROFÁGŮ
- ▶ gen *sipB* hraje klíčovou roli u tohoto procesu



Děkuji za pozornost.

