

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

WYDZIAŁ MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ

Marcjanna Wimonć

Rola genu *yidR* w adhezji i inwazji pałeczek *Salmonella* Enteritidis do komórek nabłonkowych pochodzenia jelitowego

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem:

prof. dr hab. Macieja Ugorskiego

Katedra Biochemii i Biologii Molekularnej

Promotor pomocniczy:

dr Rafał Kolenda

Katedra Biochemii i Biologii Molekularnej

Wrocław 2022

Niniejszą pracę dedykuję
Osobie, która zawsze nade mną czuwa

Serdeczne podziękowania składam wszystkim tym, którzy przyczynili się do powstania niniejszej pracy doktorskiej.

Szczególne podziękowania kieruję do:

prof. dr hab. Macieja Ugorskiego, za umożliwienie prowadzenia badań, za pomoc oraz wsparcie w trakcie prowadzenia eksperymentów i w pisaniu niniejszej pracy.

dr Rafała Kolendy, za wiedzę, z której mogłam korzystać i która pozwoliła mi kontynuować pracę naukową.

dr hab. Krzysztofa Grzymajło, za cenne naukowe wskazówki, które zawsze pozwalały obrać właściwy kierunek. Dziękuję również za poświęcony czas i życzliwość.

dr Jarosława Suchańskiego, za chęć dzielenia się wiedzą i doświadczeniem. Dziękuję również za poświęcony czas i życzliwość.

mgr Adrianny Aleksandrowicz, za pomoc merytoryczną, codzienne wsparcie oraz życzliwość.

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów.....	6
Wykaz tabel.....	8
Streszczenie.....	11
Abstract.....	14
1. Wstęp.....	17
1.1. Wprowadzenie.....	17
1.2. Patogeneza zakażeń pałeczkami <i>Salmonella</i>	19
1.3. Główne czynniki wirulencji mające wpływ na kolonizację układu pokarmowego przez pałeczki <i>Salmonella</i>	22
1.4. Białko YidR.....	25
2. Cel pracy.....	27
3. Materiały i Metody.....	28
3.1.1. Odczynniki chemiczne.....	28
3.1.2. Enzymy.....	30
3.1.3. Antybiotyki.....	30
3.1.4. Przeciwciała.....	31
3.1.5. Bufory i roztwory.....	32
3.1.6. Gotowe zestawy odczynników.....	33
3.1.7. Standardy DNA.....	33
3.1.8. Standardy białek.....	34
3.1.9. Startery.....	34
3.1.10. Wektory plazmidowe.....	36
3.1.11. Szczepy bakteryjne.....	38
3.1.12. Podłoża mikrobiologiczne.....	40
3.1.13. Linie komórek eukariotycznych.....	41
3.1.14. Podłoża hodowlane i roztwory wykorzystywane w pracy z komórkami eukariotycznymi.....	42
3.1.15. Aparatura.....	43
3.2. Metody biologii molekularnej.....	44
3.2.1. Standardowe metody rekombinowanego DNA wykorzystywane w pracy.....	44
3.2.2. Reakcja PCR dla pojedynczej kolonii bakterii (ang. <i>single colony</i> PCR).....	45
3.2.3. Reakcja PCR w gradiencie temperatury.....	46
3.2.4. Reakcja PCR w celu amplifikacji kasety DNA warunkującej oporność bakterii na kanamycynę.....	48
3.2.5. Reakcja PCR w celu amplifikacji genu <i>yidR</i>	48
3.2.6. Reakcja PCR w celu amplifikacji sekwencji promotora genu <i>sicA</i> oraz w celu amplifikacji sekwencji genów <i>fimA</i> oraz <i>sicA</i> wraz z ich promotorami.....	49
3.2.7. Sekwencjonowanie DNA.....	50
3.2.8. Przygotowanie elektrokompetentnych bakterii i elektroporacja.....	50
3.2.9. Przygotowanie bakterii chemokompetentnych i transformacja metodą szoku termicznego.....	51
3.3. Metody wykorzystywane w pracy z bakteriami.....	52
3.3.1. Mikroskopia fluorescencyjna.....	52
3.3.2. Wyznaczanie krzywych wzrostu.....	52
3.3.3. Wyznaczanie krzywych wzrostu bakterii w obecności różnych źródeł węgla (określenie profilu metabolicznego za pomocą Mikromacierzy Fenotypowych).....	53
3.4. Metody pracy z komórkami eukariotycznymi.....	57
3.4.1. Linie komórkowe i warunki hodowli.....	57

3.4.2.	Rozmrażanie i zamrażanie komórek.....	57
3.4.3.	Test adhezyjny i inwazyjny	58
3.5.	Metody stosowane w pracy z białkami	60
3.5.1.	Oznaczanie białka z użyciem zestawu „Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit”	60
3.5.2.	Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS (SDS-PAGE) (wg Laemmli, 1970).....	60
3.5.3.	Barwienie białek w żelu poliakrylamidowym za pomocą błękitu brylantowego „Coomassie Brilliant Blue R-250”	61
3.5.4.	Barwienie białek w żelu poliakrylamidowym za pomocą azotanu srebra.....	61
3.5.5.	Western blotting	62
3.5.6.	Otrzymywanie rekombinowanego białka YidR	63
3.5.7.	Produkcja i oczyszczanie króliczych przeciwciał skierowanych przeciwko białku YidR <i>S. Enteritidis</i>	64
3.6.	Analiza statystyczna.....	66
4.	Wyniki.....	67
4.1.	Otrzymanie zmutowanego szczepu <i>S. Enteritidis</i> z delecją genu <i>yidR</i>	67
4.1.1.	Otrzymanie kasety DNA <i>yidR::kan</i> w celu insercyjnej inaktywacji genu <i>yidR</i> pałeczek <i>S. Enteritidis</i>	68
4.1.2.	Insercyjna inaktywacja genu <i>yidR</i> pałeczek <i>S. Enteritidis</i>	69
4.2.	Charakterystyka mutantu P125109Δ <i>yidR</i> z delecją genu <i>yidR</i> pod kątem morfologii, zdolności agregacyjnych i wzrostu	72
4.2.1.	Morfologia i agregacja	72
4.2.2.	Krzywe wzrostu	73
4.3.	Adhezja do i inwazyjność pałeczek <i>S. Enteritidis</i> typu dzikiego i mutantu P125109Δ <i>yidR</i> względem komórek wywodzących się z nabłonka jelitowego	74
4.4.	Ekspresja genów kodujących wybrane białka fimbrii typu 1 i T3SS-1 w pałeczkach <i>S. Enteritidis</i> P125109 typu dzikiego i mutancie P125109Δ <i>yidR</i>	76
4.4.1.	Klonowanie promotorów wraz z genami <i>fimA</i> i <i>sicA</i> do plazmidu pFPV25.1GFPmut3Kan_2xHA.....	77
4.4.2.	Poziomy ekspresji białek FimA i SicA w pałeczkach <i>S. Enteritidis</i> typu dzikiego i mutantu P125109Δ <i>yidR</i>	80
4.4.3.	Klonowanie promotora genu <i>sicA</i>	83
4.4.4.	Klonowanie promotora genu <i>sicA</i> do wektora pQF50/GFP	84
4.4.5.	Analiza aktywności promotora genu <i>sicA</i> w pałeczkach <i>S. Enteritidis</i> typu dzikiego i mutantu P125109Δ <i>yidR</i>	85
4.5.	Otrzymanie rekombinowanego białka YidR w celu produkcji specyficznych przeciwciał.....	87
4.5.1.	Klonowanie genu <i>yidR</i>	87
4.5.2.	Otrzymanie wektorów ekspresyjnych zawierających sekwencję genu <i>yidR</i>	88
4.5.3.	Ekspresja i oczyszczanie rekombinowanego białka YidR	89
4.6.	Ekspresja białka YidR w pałeczkach <i>S. Enteritidis</i> hodowanych w warunkach optymalnych dla ekspresji genów <i>sicA</i> i <i>fimA</i>	91
4.7.	Charakterystyka metaboliczna pałeczek <i>S. Enteritidis</i> typu dzikiego i mutantu P125109Δ <i>yidR</i> pod kątem wykorzystania różnych źródeł węgla w celu ich wzrostu.....	91
5.	Dyskusja.....	95
6.	Wnioski	102
7.	Piśmiennictwo	103

Wykaz stosowanych skrótów

- CFU (ang. *colony-forming unit*) – jednostka tworząca kolonię
- ddH₂O (ang. *double distilled water*) - woda podwójnie destylowana/dejonizowana
- EDTA (ang. *Ethylene Diamine Tetraacetic*) - kwas etylenodiaminotetraoctowy
- FBS (ang. *Fetal Bovine Serum*) – płodowa surowica bydlęca
- FLP (ang. *Flippase*) – flipaza
- FRT (ang. *Flippase Recognition Target*) – region rozpoznawany przez flipazę
- GFP (ang. *Green Fluorescent Protein*) – białko zielonej fluorescencji
- iNTS (ang. *invasive non-typhoidal Salmonella disease*) - inwazyjna nietyfoidalna postać salmonellozy
- LPF (ang. *long polar fimbriae*) – długie polarne fimbrie
- MDR (ang. *multiple drug resistant*) - wielooporność
- MOI (ang. *Multiplicity Of Infection*) – wielokrotność infekcji
- NTS (ang. *non-typhoidal Salmonella*) – nie-durowe pałeczki *Salmonella*
- OMPs (ang. *outer membrane proteins*) – białka błony zewnętrznej
- PBS (ang. *Phosphate-Buffered Saline*) – sól fizjologiczna buforowana fosforanem
- PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*) – reakcja łańcuchowa polimerazy
- PMs (ang. *Phenotype MicroArrays*) – mikromacierze fenotypowe
- pz – pary zasad
- SCV (ang. *Salmonella containing vacuole*) – wakuole zawierające pałeczki *Salmonella*
- SOC – (ang. *Super Optimal broth with Catabolite repression*) - kompletna, bogata pożywka do mikrobiologicznej hodowli bakterii
- SPI (ang. *Salmonella pathogenicity island*) – wyspy patogenności pałeczek *Salmonella*
- ssDNA (ang. *single-stranded DNA*) – jednoniciowe DNA
- TAE (ang. *Tris-Acetate-EDTA*) – tris (hydroksymetylo) aminometan-octan-kwas etylenodiaminotetraoctowy
- TAFI (ang. *thin aggregative fimbriae*) - cienkie agregujące fimbrie
- TBE (ang. *Tris-Borate-EDTA*) – tris (hydroksymetylo) aminometan-boran-kwas etylenodiaminotetraoctowy
- TLR-5 (ang. *toll-like receptor 5*) – receptor toll-podobny dla flageliny
- Tris – (ang. *Tris(hydroxymethyl)aminomethane*) – tris (hydroksymetylo) aminoetan

- T1F (ang. *type 1 fimbriae*) - fimbrie typu 1
- T3SS (ang. *type 3 secretion system*) – system sekrecyjny typu III
- WT (ang. *wild type*) – szczep dziki

Wykaz tabel

Tabela 1. Epidemiologicznie ważne serowary <i>Salmonella</i> , ich gospodarze i wywoływane choroby	19
---	----

Wykaz rycin

Rycina 1. Schemat przedstawiający główne etapy patogenezы pałeczek <i>Salmonella enterica</i>	20
Rycina 2. Czynniki wirulencji mające wpływ na kolonizację układu pokarmowego przez pałeczki <i>Salmonella</i>	23
Rycina 3. Mikromacierze Fenotypowe PM1 i PM2A z podłożami różniącymi się od siebie związkami pełniącymi rolę jedyneгo źródła węgla	57
Rycina 4. Otrzymanie mutanta P125109 Δ <i>yidR</i> z delecją genu <i>yidR</i> (Datsenko i Wanner, 2000).....	68
Rycina 5. Otrzymanie kasety DNA <i>yidR::kan</i> z genem oporności na kanamycynę.	69
Rycina 6. Elektroforeza w żelu agarozowym fragmentu DNA będąceгo produktem reakcji PCR z genomowym DNA izolowanym z pałeczek <i>S. Enteritidis</i> P125109 po homologicznej rekombinacji z udziałem kasety DNA z genem <i>yidR</i> (kasea <i>yidR::kan</i>) jako matrycą i starterami <i>yidR100UpstreamFor</i> i <i>yidR100DownstreamRev</i>	70
Rycina 7. Elektroforeza w żelu agarozowym fragmentów DNA będących produktami reakcji PCR na matrycy genomowego DNA izolowanego z pałeczek <i>S. Enteritidis</i> P125109 z delecją genu <i>yidR</i> , opornych na kanamycynę (mutant P125109 Δ <i>yidR</i>).....	71
Rycina 8. Elektroforeza w żelu agarozowym fragmentów DNA będących produktami reakcji PCR na matrycy genomowego DNA izolowanego z pałeczek <i>S. Enteritidis</i> P125109 Δ <i>yidR</i> . 72	
Rycina 9. Zdjęcie spod mikroskopu fluorescencyjnego pałeczek <i>S. Enteritidis</i> reprezentujących (A) szczep wyjściowy P125109 (szczep typu dzikiego) i (B) szczep zmutowany P125109 Δ <i>yidR</i> z delecją genu <i>yidR</i>	73
Rycina 10. Krzywe wzrostu pałeczek <i>S. Enteritidis</i> P125109 typu dzikiego i mutanta P125109 Δ <i>yidR</i> w (A) pożywce LB i (B) pożywce „infekcyjnej”.....	74
Rycina 11. Adhezja pałeczek <i>S. Enteritidis</i> P125109 typu dzikiego i mutanta P125109 Δ <i>yidR</i> z delecją genu <i>yidR</i> do ludzkich komórek Caco-2, świńskich komórek Ipec-J2 i kurzych komórek Chic-8E11.	75

Rycina 12. Inwazja pałeczek <i>S. Enteritidis</i> P125109 typu dzikiego i mutantu P125109 Δ <i>yidR</i> z delecją genu <i>yidR</i> wobec ludzkich komórek Caco-2, świńskich komórek Ipec-J2 i kurzych komórek Chic-8E11.	76
Rycina 13. Elektroforeza w żelu agarozowym fragmentów DNA stanowiących sekwencję genu <i>fimA</i> wraz z jego promotorem (A), genu <i>sicA</i> wraz z jego promotorem (B).....	78
Rycina 14. (A) Schematy przedstawiające otrzymanie konstruktów: (1) pFPV25.1GFPmut3.1Kan_ <i>sicA</i> _2xHA i (2) pFPV25.1GFPmut3.1Kan_ <i>fimA</i> _2xHA na bazie wektora plazmidowego pFPV25.1GFPmut3.1Kan_2xHA i insertu odpowiadającego, odpowiednio, genowi <i>fimA</i> wraz z jego promotorem i genowi <i>sicA</i> wraz z jego promotorem. (B) Elektroforeza w żelu agarozowym produktów reakcji PCR, w których matrycę stanowiły konstrukty: (1) pFPV25.1GFPmut3.1Kan_ <i>sicA</i> _2xHA i (2) pFPV25.1GFPmut3.1Kan_ <i>fimA</i> _2xHA oraz para starterów pFPVforSEQ i pFPVrevSEQ. ..	79
Rycina 15. Analiza ekspresji białka FimA w lizatach pałeczek <i>S. Enteritidis</i> P125109 typu dzikiego (P125109/pFPV25.1GFPmut3Kan_ <i>fimA</i> _2xHA) z ekspresją egzogenne białka FimA i pałeczkach P125109 Δ <i>yidR</i> z delecją genu <i>yidR</i> (P125109 Δ <i>yidR</i> /pFPV25.1GFPmut3Kan_ <i>fimA</i> _2xHA) i ekspresją egzogenne białka FimA za pomocą metody Western blotting z użyciem króliczego monoklonalnego przeciwciała IgG skierowanego przeciwko metce hemaglutyninowej.....	82
Rycina 16. Analiza ekspresji białka SicA w lizatach pałeczek <i>S. Enteritidis</i> typu dzikiego (P125109/pFPV25.1GFPmut3Kan_ <i>sicA</i> _2xHA) z ekspresją egzogenne białka SicA i pałeczkach <i>S. Enteritidis</i> z delecją genu <i>yidR</i> (P125109 Δ <i>yidR</i> /pFPV25.1GFPmut3Kan_ <i>sicA</i> _2xHA) z ekspresją egzogenne białka SicA za pomocą metody Western blotting z użyciem króliczego, monoklonalnego przeciwciała IgG skierowanego przeciwko metce hemaglutyninowej.....	83
Rycina 17. Elektroforeza w żelu agarozowym fragmentów DNA stanowiących sekwencję promotora genu <i>sicA</i>	84
Rycina 18. Schemat przedstawiający otrzymanie konstruktów: (A) pQF50/GFP/ <i>sicA</i> na bazie wektora plazmidowego pQF50/GFP i insertu odpowiadającego sekwencji promotora genu <i>sicA</i> . (B) Elektroforeza w żelu agarozowym produktu reakcji PCR, w których matrycę stanowił konstrukt pQF50/GFP/ <i>sicA</i>	85
Rycina 19. Aktywność promotora genu <i>sicA</i> (z oznaczonym absolutnym odchyleniem od mediany) w szczepach <i>S. Enteritidis</i> P125109/pQF50/GFP/ <i>sicA</i> (typu dzikiego) i	

P125109 Δ <i>yidR</i> /pQF50/GFP/ <i>sicA</i> (z delecją genu <i>yidR</i>) z ekspresją białka GFP pozostającą pod kontrolą tego promotora.	87
Rycina 20. Elektroforeza w żelu agarozowym fragmentu DNA odpowiadającemu genowi <i>yidR</i> będącego produktem reakcji PCR w gradiencie temperatury, w których jako matrycy użyto genomowego DNA <i>S. Enteritidis</i> P125109 oraz starterów P0147-pET22b- <i>yidR</i> 1NdeFor i P0148-pET22b- <i>yidR</i> 1XhoRev.	88
Rycina 21. (A) Schemat przedstawiający uzyskanie konstruktów genowych pET-22b_ <i>yidR</i> powstałego na bazie wektora pET-22b i insertu obejmującego gen <i>yidR</i> . (B) Elektroforeza w żelu agarozowym produktu reakcji PCR, w których matrycę stanowił wektor pET-22b_ <i>yidR</i> i para starterów pET-T7up i <i>yidR</i> internalRev.	89
Rycina 22. Wykrywanie rekombinowanego białka YidR w lizatach <i>E. coli</i> szczepu Lemo21(DE3) transformowanych konstruktami genowymi pET-22b(+) <i>yidR</i> metodą Western blotting.	89
Rycina 23. Analiza rekombinowanego białka YidR, oczyszczonego metodą chromatografii powinowactwa na złożu Ni ²⁺ -NTA-agaroza, metodą SDS-PAGE i Western blotting.	90
Rycina 24. Charakterystyka metaboliczna pałeczek <i>S. Enteritidis</i> P125109 typu dzikiego i mutantu <i>S. Enteritidis</i> (P125109 Δ <i>yidR</i>) za pomocą Mikromacierzy Fenotypowych (A) PM1 i (B) PM2A (BIOLOG).	93
Rycina 25. Krzywe wzrostu pałeczek <i>S. Enteritidis</i> P125109 szczepu dzikiego oraz mutantu P125109 Δ <i>yidR</i> z delecją genu <i>yidR</i> hodowanych na pożywce M9 z dodatkiem 5 mM kwasu jabłkowego przez 48 godzin.	94

Streszczenie

Adhezja do i inwazja nabłonka jelitowego jest jednym z pierwszych i kluczowych etapów w patogenezie zakażeń pałeczkami *Salmonella*. Zrozumienie molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za te procesy jest przedmiotem wielu badań prowadzonych na całym świecie. Nadal jednak, około 35 - 40% bakteryjnych genów nie ma eksperymentalnie potwierdzonej funkcji, a ich udział w wirulencji bakterii pozostaje nieznany. Jednym z takich genów mających związek z różnicami w adhezji i inwazji kilku serowarów *Salmonella*: Gallinarum, Dublin, Choleraesuis, Typhimurium i Enteritidis wobec komórek nabłonka jelit jest gen *yidR*. Stąd, ze względu na fakt, że aktualny stan wiedzy na temat roli i udziału genu *yidR* w patogenezie zakażeń pałeczkami *Salmonella* jest bardzo ograniczony i niekompletny i brak jest badań, które jednoznacznie wyjaśniałyby, jaką rolę pełni gen *yidR* w biologii pałeczek *Salmonella*, przeprowadzono badania, których celem było wyjaśnienie jego roli w adhezji i inwazji pałeczek *S. Enteritidis*. W związku z tym, w pierwszym etapie przeprowadzono badania mające na celu potwierdzeniu udziału tego genu już nie tylko w adhezji, ale również inwazji pałeczek *S. Enteritidis* do komórek nabłonka jelit człowieka, świni i kury. Wykorzystując mutanta delecyjnego *S. Enteritidis* P125109, który nazwano P125109 Δ *yidR*, wykazano, że knock-out genu *yidR* prowadzi do statystycznie istotnego obniżenia zarówno adhezji jak i inwazji do wszystkich trzech rodzajów komórek nabłonka jelitowego w porównaniu z pałeczkami *S. Enteritidis* P125109 typu dzikiego. Biorąc pod uwagę fakt, że białko YidR jest najprawdopodobniej zlokalizowane w cytoplazmie, założono, że nie bierze one bezpośredniego udziału zarówno w adhezji, jak i inwazji, ale funkcjonuje jako białko regulatorowe wpływając na ekspresję genów, których białkowe produkty odgrywają kluczową rolę w tych procesach. W przypadku adhezji, jako gen docelowy dla działania białka YidR wybrano gen *fimA* kodujący główne białko strukturalne fimbrii typu 1, o nazwie FimA. Jeżeli chodzi o inwazyjność, to jako gen docelowy dla białka

YidR wybrano gen *sicA*, kodujący białko SicA stanowiące element strukturalno-czynnościowy T3SS-1 i pełniące rolę chaperonu dla innych białek tego systemu sekrecyjnego. O ile nie stwierdzono różnic w ekspresji białka FimA pomiędzy szczepem *S. Enteritidis* P125109 typu dzikiego a szczepem z delecją genu *yidR*, to w przypadku genu *sicA* mniejsze ilości białka SicA obserwowano w przypadku szczepu z delecją genu *yidR*. Dla potwierdzenia powyższych wyników oraz pokazania, że różnice w ekspresji białka związane są z regulacją genu *yidR* na poziomie transkrypcji, w szczepie *S. Enteritidis* typu dzikiego i szczepie *S. Enteritidis* oznaczano aktywność promotora genu *yidR*. Zgodnie z oczekiwaniami, znacznie wyższą aktywność promotora genu *yidR* obserwowano w przypadku pałeczek *S. Enteritidis* typu dzikiego w porównaniu z pałeczkami z delecją genu *yidR*. Tak więc, na obecnym poziomie badań uzyskane wyniki wskazują na udział genu/białka YidR w regulacji ekspresji genu *sicA* na poziomie transkrypcji. W powiązaniu z badaniami nad rolą genu *yidR* w regulacji ekspresji genów związanych z właściwościami adhezyjnymi i inwazyjnymi pałeczek *Salmonella*, podjęto próbę analizy ekspresji białka YidR w pałeczkach *S. Enteritidis* hodowanych w warunkach optymalnych dla ekspresji białka FimA, czyli fimbrii typu 1 i białka SicA, czyli T3SS-1. Zakładano, że ewentualnym zmianom w poziomie ekspresji tych białek powinny towarzyszyć zmiany w ekspresji białka YidR. Niestety, najprawdopodobniej z powodu zbyt niskiej ekspresji, nie udało się wykazać naturalnej obecności tego białka w pałeczkach *S. Enteritidis* hodowanych w różnych warunkach.

Dotychczasowe badania nad biologiczną rolą genu *yidR* wskazują, że przynajmniej w przypadku pałeczek *E. coli* bierze on udział w metabolizmie komórkowym, a konkretnie partycypuje w metabolizmie galaktozy i glukonianu/galakturonianu, natomiast w badaniach własnych pokazano, że pałeczki *S. Enteritidis* z delecją genu *yidR* rosną zdecydowanie lepiej na pożywce z 5 mM kwasem jabłkowym jako jedynym źródłem węgla w porównaniu z pałeczkami *S. Enteritidis* typu dzikiego. Tym niemniej, na obecnym poziomie badań, na czym

polega rola genu *yidR* w metabolizmie kwasu jabłkowego i jaki to może mieć związek z adhezją i inwazyjnością pozostaje sprawą niewyjaśnioną i wymaga dalszych badań.

Podsumowując, otrzymane wyniki wskazują, że białko YidR może być zaangażowane w regulację ekspresji genu *sicA* na poziomie transkrypcji, na co wskazuje spadek aktywności promotora genu *sicA* w pałeczkach *S. Enteritidis* z delecją genu *yidR*. Ponieważ białko SicA jest jednym z elementów składowych T3SS-1, pełniącego kluczową rolę w inwazji pałeczek *Salmonella* względem komórek nabłonkowych, obniżoną inwazję pałeczek *S. Enteritidis* z delecją genu *yidR* można tłumaczyć zmniejszoną aktywnością systemu sekrecyjnego. T3SS-1. Jako że, T3SS-1, obok inwazji, może również brać udział w adhezji, jako tzw. atypowa adhezyna, również i obniżoną adhezję pałeczek *S. Enteritidis* z delecją genu *yidR* do komórek nabłonkowych, można powiązać z obniżoną ekspresją genu *sicA*. Tym niemniej, na czym dokładnie polega regulatorowa rola białka YidR i jakie molekularne mechanizmy leżą u podstaw jego aktywności wymaga dalszych szczegółowych badań.

Abstract

Adhesion to and invasion of the intestinal epithelium is one of the first and crucial steps in the pathogenesis of *Salmonella* infections. Understanding the molecular mechanisms responsible for these processes is the subject of many studies conducted around the world. Currently, about 35-40% of bacterial genes have no experimentally confirmed function and their role in bacterial virulence remains unknown. One of these genes involved in differences in adhesion and invasion of a few *Salmonella* serovars: Gallinarum, Dublin, Choleraesuis, Typhimurium and Enteritidis against intestinal epithelial cells is the *yidR* gene. Therefore, due to the fact that the current knowledge on the role and involvement of the *yidR* gene in the pathogenesis of *Salmonella* infections is very limited and incomplete, and there are no studies that would clearly explain the role of the *yidR* gene in the biology of *Salmonella*, we conducted a study to explain its role in the adhesion and invasion of *S. Enteritidis*. Therefore, as a first step, studies were carried out to confirm the involvement of this gene in not only adhesion but also invasion of *S. Enteritidis* into human, pig and chicken intestinal epithelial cells. Using a deletion mutant of *S. Enteritidis* P125109, which was named P125109 Δ *yidR*, it was shown that knock-out of the *yidR* gene leads to a statistically significant reduction in both adhesion and invasion into all three types of intestinal epithelial cells compared to wild-type *S. Enteritidis* P125109. Considering that the YidR protein is most probably localized in the cytoplasm, it was hypothesized that it is not directly involved in both adhesion and invasion, but functions as a regulatory protein by influencing the expression of genes whose protein products play a crucial role in these processes. In the case of adhesion, the *fimA* gene encoding the major fimbriae type 1 structural protein, named FimA, was selected as the target gene for YidR protein activity. As for invasion, the *sicA* gene was selected as the target gene for YidR protein, encoding the SicA protein, which is a structural and functional element of T3SS-1 and acts as a chaperone for other proteins of this secretory system. While no

differences in FimA protein expression were found between the wild-type *S. Enteritidis* P125109 strain and the strain with *yidR* gene deletion, lower amounts of SicA protein were observed in the strain with *yidR* gene deletion. To confirm the above results and to show that the differences in protein expression are related to the regulation of the *yidR* gene at the transcriptional level, the promoter activity of the *yidR* gene was determined in the wild-type and the *S. Enteritidis* strain. As expected, significantly higher *yidR* gene promoter activity was observed in *S. Enteritidis* wild-type compared with bacilli with a *yidR* gene deletion. Thus, at the present level of study, the results obtained indicate the involvement of the *yidR* gene/protein in the regulation of *sicA* gene expression at the transcriptional level. In association with studies on the role of the *yidR* gene in regulating the expression of genes related to the adhesive and invasive properties of *Salmonella*, an attempt was made to analyze the expression of the YidR protein in *S. Enteritidis* cultured under conditions optimal for the expression of the FimA protein, i.e. type 1 fimbriae, and the SicA protein, i.e. T3SS-1. It was assumed that any changes in the expression levels of these proteins should be accompanied by changes in the expression of the YidR protein. Unfortunately, most probably due to under-expression, it was not possible to demonstrate the natural presence of this protein in *S. Enteritidis* cultured under different conditions.

Previous studies on the biological role of the *yidR* gene indicate that, at least in the case of *E. coli*, it is involved in cellular metabolism, specifically in galactose and gluconate/galacturonate metabolism, whereas in our study we showed that *S. enteritidis* with a deletion of the *yidR* gene grow significantly better on medium with 5 mM malic acid as the sole carbon source compared with wild-type *S. enteritidis*. However, at the present level of research, what is the role of *yidR* gene in malic acid metabolism and how this may relate to adhesion and invasion remains unclear and requires further investigation.

In conclusion, the results obtained indicate that the YidR protein may be involved in the regulation of *sicA* gene expression at the transcriptional level, as indicated by a decrease in *sicA* gene promoter activity in *S. Enteritidis* with *yidR* gene deletion. Since SicA protein is one of the components of T3SS-1, which plays a key role in the invasion of *Salmonella* against epithelial cells, the reduced invasion of *S. Enteritidis* with *yidR* gene deletion could be explained by the decreased activity of the secretory system. As T3SS-1, in addition to invasion, may also be involved in adhesion as an atypical adhesin, the decreased adhesion of *S. Enteritidis* with *yidR* gene deletion to epithelial cells may also be associated with decreased *sicA* gene expression. However, the exact regulatory role of the *yidR* protein and the molecular mechanisms underlying its activity require further detailed studies.

1. Wstęp

1.1. Wprowadzenie

Bakterie z rodzaju *Salmonella* to Gram-ujemne, względnie beztlenowe pałeczki, które należą do rodziny *Enterobacteriaceae*. Pałeczki te zostały odkryte w 1885 roku przez dwóch amerykańskich lekarzy weterynarii, Theobalda Smitha i Daniela Elmera Salmona, podczas badań nad klasycznym pomorem świń (Jajere, 2019). Na rodzaj *Salmonella* składają się dwa gatunki: *Salmonella enterica* (*S. enterica*) i *Salmonella bongori* (*S. bongori*), które wykazują wysokie podobieństwo sekwencji genomowych (96-99%) (Nastasi i wsp., 1988). Klasyfikacja w obrębie gatunku oparta jest na różnicach serologicznych uwzględniających, zgodnie ze schematem Kauffmanna-Whita-Le Minor, różnorodność w budowie antygenów rzęskowych (antygen H) i antygenów somatycznych (antygen O). Do chwili obecnej zidentyfikowano ponad 2500 serowarów *Salmonella*, przy czym tylko 50 z nich, należących do gatunku *S. enterica* podgatunek *enterica*, to patogeny zakażające ludzi i zwierzęta stałocieplne (Switt i wsp., 2009). Pałeczki *Salmonella* są jedną z najczęstszych przyczyn zatruc pokarmowych w USA (Voetsch i wsp., 2004) i Europie (Sarno i wsp., 2021). Według WHO, wśród infekcji wywoływanych przez *Salmonella* u ludzi można wyróżnić trzy formy: ogólnoustrojowe zakażenia pałeczkami *S. enterica* serowar Typhi pod postacią duru brzuszego, również ogólnoustrojowe zakażenia wywoływane przez *S. enterica* serowar Paratyphi określane mianem duru rzekomego oraz zakażenia ograniczone do przewodu pokarmowego wywoływane przez nie-durowe pałeczki *Salmonella* (ang. *non-typhoidal Salmonella*, NTS) z objawami manifestującymi się głównie jako uporczywe biegunki. Z kolei, głównymi objawami klinicznymi w durze brzuszym i rzekomym są wysoka gorączka, bóle brzucha, przemijająca biegunka na przemian z zaparciami, czasami plamista wysypka, nacieki komórek jednojądrzastych i rozrost komórek układu siateczkowo-śródbłonkowego w kępkach Peyera, węzłach chłonnych krezkowych, śledzionie i szpiku kostnym (Miller i Pegues, 2000).

Z danych pochodzących z lat 2001 – 2005 opublikowanych przez SalmSurv (Światowa Organizacja ds. zakażeń przenoszonych przez żywność, wspierana przez WHO) wynika, że najczęściej izolowanym serowarem odpowiedzialnym za nietyfoidalną postać salmonellozy na świecie była *S. Enteritidis* (65%) (Majowicz i wsp., 2010) i kolejno *S. Typhimurium* i *S. Newport* stanowiące, odpowiednio, 12% i 4% izolatów klinicznych (Galanis i wsp., 2006). W 2017 roku w Unii Europejskiej stwierdzono 91 662 potwierdzone przypadki salmonellozy spowodowanej głównie przez *S. Enteritidis* lub *S. Typhimurium* [Raport podsumowujący Unii Europejskiej na temat tendencji i źródeł chorób odzwierzęcych, odzwierzęcych czynników chorobotwórczych i ognisk chorób przenoszonych przez żywność w 2017 r. (2018)]. Co należy podkreślić, coraz częściej przy zakażeniach pałeczkami *Salmonella* mamy do czynienia ze szczepami wielolekoopornymi (ang. *multiple drug resistant*, MDR), które, na co wskazują badania epidemiologiczne, są bardziej zjadliwe w porównaniu ze szczepami wrażliwymi na antybiotyki, co dodatkowo może prowadzić do wzrostu śmiertelności (Eng i wsp., 2015). W roku 2014 wielolekooporne pałeczki *Salmonella* były przyczyną 700 000 zgonów i liczba ta jak się uważa może wzrosnąć do milionów około roku 2050 (O'Neill i wsp., 2014).

Pałeczki *Salmonella* należą do bardzo nielicznej grupy patogenów, które zakażają gospodarzy reprezentujących różne gatunki zwierząt i człowieka (Wiedemann i wsp., 2015). Niektóre serowary *Salmonella* są zdolne do zakażenia wyłącznie jednego gospodarza, np. *S. Typhi* i *S. Gallinarum*, odpowiednio, tylko ludzi i drób grzebiący (Feasey i wsp., 2012). Z kolei *S. Dublin* i *S. Choleraesuis* infekują głównie, odpowiednio, bydło i świnię, ale mogą też zarażać znacznie mniej efektywnie i kilka innych gatunków zwierząt i człowieka. Wreszcie, takie serowary, jak *S. Typhimurium* i *S. Enteritidis* wykazują szeroki zakres gospodarzy i mogą być izolowane zarówno od wielu różnych gatunków zwierząt, jak i człowieka (Feasey i wsp., 2012) (**Tab. 1**).

Tabela 1. Epidemiologicznie ważne serowary *Salmonella*, ich gospodarze i wywoływane choroby

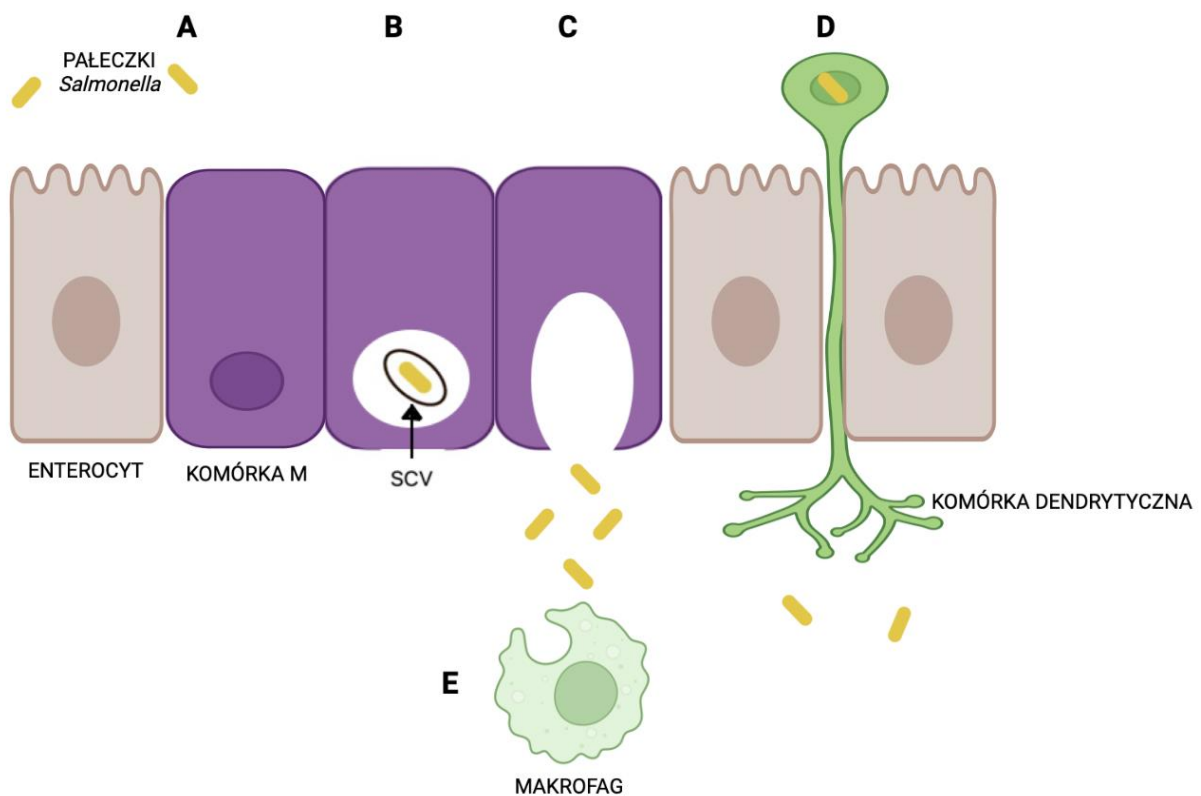
Zakres gospodarza	Serowar	Gospodarz	Choroba
Wielu	Enteritidis Typhimurium	Zwierzęta i człowiek	Zapalenie żołądka i jelit
Kilku	Dublin Choleraesuis	Bydło i człowiek Świnie i Człowiek	Dur bydłęcy/inwazyjna bakteriemia Paratyfus świński/inwazyjna bakteriemia
Jeden	Typhi Paratyphi Gallinarum	Człowiek Człowiek Drób grzebiący	Dur brzuszny Paratyfus Tyfus ptasi

1.2. Patogeneza zakażeń pałeczkami *Salmonella*

Wszystkie zakażenia pałeczkami *Salmonella* u ssaków rozpoczynają się od spożycia skażonej żywności lub wody. Po wnikięciu do światła przewodu pokarmowego, bakterie dostają się do żołądka, gdzie część z nich ginie na skutek niskiego pH, co wskazuje, że jego kwasowość stanowi istotną, początkową barierę zapobiegającą kolonizacji dalszych odcinków przewodu pokarmowego (Pradhan i Devi Negi, 2019). Wykazano, że w niskich pH pałeczki *Salmonella* zdolne są do adaptacyjnej odpowiedzi sprzyjającej ich przetrwaniu w soku żołądkowym (Lin i wsp., 1995). Po pokonaniu bariery żołądkowej bakterie trafiają do jelita cienkiego, gdzie najpierw adhezja do, a następnie inwazja komórek tworzących jego błonę śluzową, takich jak enterocyty, komórki M, komórki kubkowe, makrofagi, komórki

dendrytyczne i neutrofile, są jednym z krytycznych etapów w patogenezie zakażeń pałeczkami *Salmonella* (Jones i wsp., 2007; Kirby i wsp., 2002).

Adhezja bakterii do komórek gospodarza (**Ryc. 1A**) związana jest z obecnością na tych pierwszych struktur białkowych nazywanych adhezynami (Connell i wsp., 1997), które uczestniczą również w przemieszczaniu się bakterii (Kao, 2014), transferze DNA (Stones i Krachler, 2015) oraz tworzeniu biofilmu (Dunne, 2002). W jelicie cienkim, pałeczki *Salmonella* wiążą się głównie do wywodzących się z nabłonka komórek M stanowiących zewnętrzną warstwę kępek Peyera i grudek chłonnych jelita ślepego (Neutra i wsp., 1996; Hallstrom i McCormick, 2011).



Rycina 1. Schemat przedstawiający główne etapy patogenezy zakażeń pałeczkami *Salmonella enterica*. (A) Adhezja pałeczek *Salmonella* do komórek wyścielających światło jelit. (B) Inwazja enterocytów i komórek M przez pałeczki *Salmonella*. (C) Transcytoza i pokonanie bariery jelitowej przez pałeczki *Salmonella*. (D) Internalizacja pałeczek *Salmonella* przez komórki dendrytyczne. (E) Wnikanie pałeczek *Salmonella* do makrofagów, które po przedostaniu się do krwi lub/i limfy trafiają do układu siateczkowo-śródbłonkowego wątroby i śledziony. SCV - wakuole zawierające pałeczki *Salmonella*.

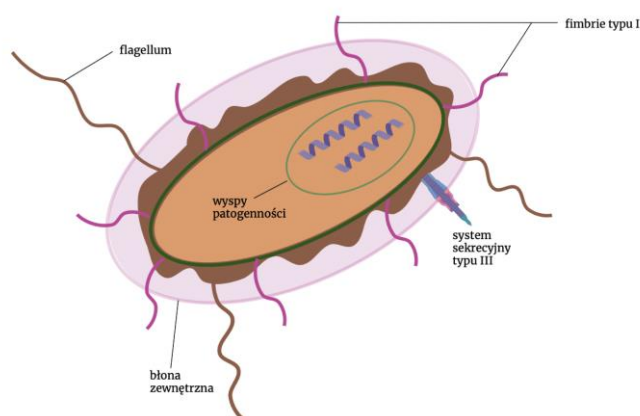
Wkrótce po przyłgnięciu bakterii do apikalnej powierzchni nabłonka dokonują one inwazji do wnętrza komórek gospodarza, głównie komórek M. Enterocyty i komórki M należą do komórek nefagocytujących, dlatego też, za ten proces odpowiedzialny jest wyłącznie system sekrecyjny typu III (ang. *type 3 secretion system*, T3SS), którego składowe białka kodowane są przez geny zlokalizowane na wyspie patogenności pałeczek *Salmonella* 1 (SPI-1) (T3SS-1) (Radtke i wsp., 2010) (**rozdział 1.3**). Szczepy *Salmonella* wnikają do komórek nefagocytujących poprzez mechanizm określany jako spustowy lub suwakowy (Birhanu i wsp., 2018). W komórkach gospodarza dochodzi do głębokich rearanżacji cytoszkieletu, co powoduje powstawanie fałdów błonowych, które odpowiadają za internalizację bakterii i ich zamykanie w dużych pęcherzykach noszących nazwę wakuoli zawierających pałeczki *Salmonella* (ang. *Salmonella containing vacuole*, SCV), gdzie przeżywają i namnażają się (Steele-Mortimer, 2008) (**Ryc. 1B**). Ponieważ komórki M różnią się od enterocytów wysoką zdolnością do transcytozy, stanowią one główne miejsce, gdzie dochodzi do pokonania przez te bakterie bariery jelitowej (Jones i wsp., 1994) (**Ryc. 1C**). Obok enterocytów i komórek M, również komórki dendrytyczne pobierają bakterie bezpośrednio ze światła jelita (Biedzka-Sarek i El Skurnik, 2006; Niess i wsp., 2005) (**Ryc. 1D**). Komórki dendrytyczne rekrutowane są do miejsca kolonizowanych przez pałeczki *Salmonella* przez enterocyty wykazujące ekspresję chemokiny CCL20, w wyniku ich stymulacji poprzez receptory TLR-5 (ang. *toll-like receptor 5*) wiążące wici wytwarzane przez te bakterie (Sierro i wsp., 2001). Po dotarciu do miejsca zakażenia wsuwają się one pomiędzy komórki nabłonkowe bez naruszania integralności ścisłych połączeń między nimi. Poza internalizacją całych bakterii, komórki M i komórki dendrytyczne biorą również udział w pochłanianiu i przekazywaniu fragmentów komórek bakteryjnych głębiej leżącym komórkom (Niess i wsp., 2005).

Pałeczki *Salmonella*, które opuszczają komórki M, zakażają głównie makrofagi (Alun i wsp., 2002) (**Ryc. 1E**), które stanowią część pierwszej linii obrony, neutralizując bezpośrednio szkodliwe patogeny (wrodzona odpowiedź immunologiczna) lub prezentując antygeny bakteryjne komórkom T i B (adaptacyjna odpowiedź immunologiczna) (Broz i wsp., 2012). Następnie, wraz z krwią i limfą makrofagi zawierające żywe pałeczki *Salmonella* trafiają do układu siateczkowo–śródbłonkowego wątroby i śledziony, co prowadzi do uogólnionej postaci salmonellozy (Jones i Falkow, 1996). Wnikanie pałeczek do makrofagów odbywa się głównie na drodze fagocytozy, choć białka T3SS-1 (**rozdział 1.3**) również mają w tym swój udział (Sansone, 2001). Po dostaniu się do wnętrza komórki, bakterie albo ulegają zabiciu, albo przeżywają i namnażają się wewnątrz SCV, co w efekcie może prowadzić do śmierci makrofaga (Fink i wsp., 2007). Wakuole te stanowią pęcherzyki, które początkowo są zintegrowane z wczesnym szlakiem endocytozy, a ostatecznie dochodzi do ich fuzji z pęcherzykami, które zawierają enzymy lizosomalne. Wakuole migrują w okolice jądra oraz aparatu Golgiego, aby przechwycić pęcherzyki transportowe zapewniające drobnoustrojom składniki odżywcze (Yan i wsp., 2004).

1.3. Główne czynniki wirulencji mające wpływ na kolonizację układu pokarmowego przez pałeczki *Salmonella*

Jak już podano powyżej (**rozdział 1.2**), zakażenia pałeczkami *Salmonella* są uwarunkowane skuteczną kolonizacją układu pokarmowego gospodarza, u podstaw, której leżą adhezja i inwazja bakterii do komórek wyściełających jego światło. Te z kolei procesy wymagają od pałeczek *Salmonella* produkcji tak zwanych czynników wirulencji, które pozwalają im na efektywne wiązanie oraz wnikanie do komórek wyściełających światło przewodu pokarmowego, w tym nabłonka jelitowego, gospodarza (Yue i Schifferli, 2013;

Jajere, 2019). Do najważniejszych w tym kontekście należą: system sekrecyjny typu 3, którego elementy składowe - białka kodowane są przez geny zlokalizowane na wyspie patogenności pałeczek *Salmonella* 1 (ang. *Salmonella pathogenicity island 1*, SPI-1), noszący nazwę T3SS-1, adhezyny bakteryjne, wici/rzęski i białka błony zewnętrznej (Diagle, 2008; Sabbagh i wsp., 2010; Lee i wsp., 1996) (**Ryc. 2**).



Rycina 2. Czynniki wirulencji mające wpływ na kolonizację układu pokarmowego przez pałeczki *Salmonella*.

T3SS-1 jest złożoną strukturą białkową pośredniczącą w translokacji bakteryjnych białek efektorowych do cytoplazmy komórek gospodarza (Hueck, 1998). Białka te wywołują w nich szereg zmian obejmujących rearanżacje cytoszkieletu, zaburzenia w transporcie błonowym i szlakach sygnałowych, a także zmiany w ekspresji cytokin, co w efekcie umożliwia pałeczkom *Salmonella* wnikanie do wnętrza zainfekowanych komórek nefagocytujących, takich jak komórki nabłonka błony śluzowej jelita (Coburn i wsp., 2007; Haraga, 2008; Hensel, 2000). Jednym z genów kodujących białka wchodzące w skład T3SS-1, którego ekspresja jest wykładnikiem poziomu ekspresji innych genów kodowanych przez SPI-1 jest gen *sicA* (Kröger i wsp., 2013; Lou i wsp., 2019).

Adhezyny pałeczek *Salmonella* dzielą się na adhezyny fimbrialne, atypowe i niefimbrialne (Wagner i Hensel, 2011). Adhezyny fimbrialne stanowią zróżnicowaną grupę adhezyn, do której należą: fimbrie typu 1, długie polarne fimbrie (ang. *long polar fimbriae*, Lpf), cienkie agregujące fimbrie (ang. *thin aggregative fimbriae*, Tafi) oraz pilii typu 4. Atypowe adhezyny to rzęski i system sekrecyjny typu III. Z kolei SadA, BapA3, ShdA, SiiE i Mis to przykłady adhezyn niefimbrialnych (Wagner i Hensel, 2011). Spośród kilkudziesięciu różnych adhezyn bakteryjnych, fimbrie typu 1 (ang. *type I fimbriae*, T1F) są jednymi z najbardziej rozpowszechnionych organelli adhezyjnych w rodzinie *Enterobacteriaceae*, w tym rodzaju *Salmonella* (Yue i wsp., 2012). T1F pośredniczą w przyleganiu pałeczek *Salmonella* do komórek gospodarza, produktów żywnościowych i najrozmaitszych materiałów, stąd obok typowej adhezji, przypisywane im są inne funkcje, takie jak tworzenie biofilmu, hemaglutynacja, inwazja komórkowa i interakcje z makrofagami (Ugorski i wsp., 2011; Kolenda i wsp., 2019). Zaproponowano, że T1F są ważnymi czynnikami warunkującymi adaptację pałeczek *Salmonella* do określonego gospodarza/gospodarzy (Yue, 2015; Grzymajło i wsp., 2013).

Wici (flagelle) wytwarzane są przez większość serowarów *Salmonella*, nadając bakteriom ruchliwość (Van Asten i Van Dijk, 2005). Występują w liczbie do 10. i są rozmieszczone na powierzchni bakterii w sposób przypadkowy. Ich rola w patogenezie zakażeń pałeczkami *Salmonella* wydaje się być podobna do roli jaką pełnią one w przypadku zakażeń pałeczkami *Escherichia coli* (Aleksandrowicz i wsp., 2021).

Ostatnie z omawianych czynników wirulencji to białka błony zewnętrznej (ang. *outer membrane proteins*, OMPs), które stanowią niezbędny element oporności bakterii na substancje chemiczne z uwagi na to, że błona komórkowa jest pierwszą barierą, na jaką napotykają te czynniki (Wexler, 2002). Białka wchodzące w skład błony zewnętrznej syntetyzowane są w cytoplazmie, skąd uwolnione są do peryplazmy, gdzie ma miejsce ich

fałdowanie przed wbudowaniem w błonę zewnętrzną (Mogensen i Otzen, 2005). Do OMPs należą białka strukturalne, enzymatyczne, białka biernego i aktywnego transportu (Koebnik i wsp., 2000; Hayward i wsp., 2000).

1.4. Białko YidR

Ostatnio, Kolenda i wsp. (2021), wykorzystując sekwencjonowanie nowej generacji, porównywali ze sobą genomy kilku serowarów *Salmonella*: Gallinarum, Dublin, Choleraesuis, Typhimurium, i Enteritidis różniących się od siebie zdolnościami do adhezji i inwazji komórek nabłonka jelit człowieka, świni i kury. Analiza pangénomów wykazała obecność znamiennych różnic w sekwencjach czternastu genów (mutacji), które można było powiązać ze zmienionymi fenotypami. Jednym z tych genów okazał się gen *yidR*, który w klinicznym izolacie *S. Enteritidis* charakteryzującym się niską adhezją i inwazyjnością posiadał pojedynczą mutację nukleotydową (substytucję) powodującą zmianę kodonu dla seryny na przedwczesny kodon STOP w pozycji 317, co w konsekwencji prowadzi do skrócenie łańcucha polipeptydowego z 408 do 316 reszt aminokwasowych.

Obok *S. enterica* i *E. coli* (Kroupitski i wsp., 2013; Fuhrer i wsp., 2017), obecność homologów genu *yidR* została stwierdzona również w genomach gatunków bakterii należących do klasy *Gammaproteobacteria*, łącznie z tak ważnym ludzkim patogenem jak *Klebsiella pneumoniae* (R. Kolenda, dane niepublikowane). Gen ten koduje białko YidR, które ze względu na sekwencję aminokwasów zaliczono do domniemanych białek wiążących ATP/GTP. Białko to utworzone jest z konserwatywnej domeny DUF3748 (obejmującej aminokwasy 62 - 179), występującej zarówno w białkach prokariotycznych jak i eukariotycznych, której funkcja nie jest znana oraz konserwatywnej domeny TolB obejmującej aminokwasy 282 - 389 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/16422383>). Białko TolB

wchodzi w skład wielobiałkowego kompleksu, którego obecność jest wymagana dla zachowania integralności błony zewnętrznej. Jak się uważa, bierze one udział w translokacji kolicyn i wnikaniu jednoniciowego DNA niektórych filamentowych bakteriofagów do *E. coli* (Cascales i wsp., 2007). Sugeruje się również, że białko YidR odgrywa bliżej niesprecyzowaną rolę w patogenezie zakażeń *E. coli*, *Haemophilus ducreyi*, *Vibrio cholerae* i *S. enterica* (Dubuisson i wsp., 2005). Kroupitski i wsp. (2013) stwierdzili, że gen *yidR* jest zaangażowany w przeżywalność *S. Typhimurium* na liściach sałaty podczas przechowywania w warunkach chłodniczych, a jego obecność była wymagana do wiązania się bakterii do naskórka liści sałaty i tworzenia biofilmu na powierzchniach abiotycznych. W najnowszych badaniach, w których analizowano różnice w globalnej ekspresji genów pomiędzy szczepem *S. Typhimurium* (ST 313) D23580 wywołującym inwazyjną nietyfoidalną postać salmonellozy (ang. *invasive non-typhoidal Salmonella disease*, iNTS), a szczepem *S. Typhimurium* (ST 19) 4/74 wywołującym łagodną nietyfoidalną salmonellozę (NTS) w postaci zapalenia żołądka i jelit wykazano, że we wczesnej fazie wzrostu stacjonarnego dochodzi do znamiennego obniżenia ekspresji genu *yidR* w szczepie D23580 (Canals i wsp., 2019). Zdaniem autorów, wyniki te sugerują, że białko YidR może odgrywać rolę w inwazji pałeczek *Salmonella* podczas jelitowej fazy zakażenia. Należy jeszcze wspomnieć o wynikach badań Fuhrera i wsp., (2017), którzy zasugerowali w oparciu o badania metaboliczne, że gen *yidR* może brać udział w metabolizmie galaktozy i glukonianu/galakturonianu.

2. Cel pracy

Adhezja do i inwazja nabłonka jelitowego jest jednym z pierwszych i kluczowych etapów w patogenezie zakażeń pałeczkami *Salmonella* (Ugorski i wsp., 2011; Kolenda i wsp., 2019). Zrozumienie molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za te procesy jest przedmiotem wielu badań prowadzonych na całym świecie. Nadal jednak, około 35 - 40% bakteryjnych genów nie ma eksperymentalnie potwierdzonej funkcji, a ich udział w wirulencji bakterii pozostaje nieznany (Ghatak i wsp., 2019). Jednym z takich genów mających związek z różnicami w adhezji i inwazji kilku serowarów *Salmonella*: Gallinarum, Dublin, Choleraesuis, Typhimurium, i Enteritidis wobec komórek nabłonka jelit jest gen *yidR* (Kolenda i wsp., 2021). **Stąd, ze względu na fakt, że aktualny stan wiedzy na temat roli i udziału genu *yidR* w patogenezie zakażeń pałeczkami *Salmonella* jest bardzo ograniczony i niekompletny i brak jest badań, które jednoznacznie wyjaśniałyby, jaką rolę pełni gen *yidR* w biologii pałeczek *Salmonella*, celem pracy było wyjaśnienie jego roli w adhezji i inwazji pałeczek *S. Enteritidis*.**

Realizacja celu ogólnego obejmowała następujące cele szczegółowe:

1. Otrzymanie mutantu *S. Enteritidis* z delecją genu *yidR* i jego charakterystyka.
2. Porównanie właściwości adhezyjnych i inwazyjnych wyjściowego szczepu *S. Enteritidis* i jego mutantu delecyjnego wobec komórek pochodzenia nabłonkowego (ludzkich Caco-2, świńskich Ipec-J2 i kurzych Chic-8E11).
3. Wpływ delecji genu *yidR* na ekspresję genów *fimA* i *sicA* związanych z czynnikami wirulencji odpowiedzialnymi za adhezję i inwazyjność pałeczek *S. Enteritidis*.
4. Analiza ekspresji białka YidR w warunkach istotnych dla zakażenia pałeczką *S. Enteritidis*.
5. Analiza wpływu delecji genu *yidR* na metabolom pałeczek *S. Enteritidis*.

3. Materiały i Metody

3.1. Materiały

3.1.1. Odczynniki chemiczne

Odczynnik chemiczny	Producent
Agaroza	Roth
Akrylamid	Roth
Albumina surowicy bydłej (BSA)	BioShop
Alkohol etylowy	Stanlab
Alkohol metylowy	Chempur
Azotan srebra	Chempur
Błękit bromofenolowy	Sigma Aldrich
Błękit brylantowy Coomassie R-250	Thermo Fisher Scientific
Butanol	POCH
Chlorek amonu	Chempur
Chlorek kobaltu	Chempur
Chlorek manganu	Chempur
Chlorek sodu	Chempur
Chlorek wapnia	Chempur
Chlorek żelaza	Chempur
Cynku siarczan	Chempur
Deoksyrybonukleotydy (dNTP)	Thermo Fisher Scientific
Dipotasu fosforan	Chempur
Diwodorofosforan potasu	Chempur
Etylodiaminotetraoctan (EDTA)	Chempur
Glicerol	Chempur
Glicyna	Chempur
Glukoza	Chempur
Imidazol	Roth
Izopropyl- β -D-1-tiogalaktopiranozyd (IPTG)	Thermo Fisher Scientific
Kwas borowy	Chempur

Kwas octowy lodowaty	Chempur
Kwas solny	Stanlab
L-glutamina	Thermo Fisher Scientific
Midori Green Advance (barwnik interkalujący DNA)	Thermo Fisher Scientific
MES (kwas 2-(N-morfolino)-etanosulfonowy)	Roth
Molibdenian sodu	Chempur
N, N, N', N' – tetrametyloetylenodiamina (TEMED)	Fluka
N, N-metyleno-bisakrylamid	Roth
Nadsiarczan amonu (APS)	Roth
Nadtlenek wodoru	Chempur
Oranż akrydyny	Pol-Aura
Paraformaldehyd	Chempur
Penicylina	Sigma Aldrich
Płodowa surowica bydleca (FBS)	Biowest
Potasu siarczan	Chempur
Tiosiarczan sodu	Chempur
Triton X-100	Fluka
Trycyna	Sigma Aldrich
Trypsyna	Biowest
Węglan sodu	Chempur
Wodorofosforan sodu	Chempur

3.1.2. Enzymy

Nazwa	Producent
Ligaza DNA faga T4	Thermo Fisher Scientific
Fosfataza alkaliczna FastAP	Thermo Fisher Scientific
Polimeraza DNA DreamTaq	Thermo Fisher Scientific
Polimeraza DNA Phusion	Thermo Fisher Scientific
Enzym Fast Digest BamHI	Thermo Fisher Scientific
Enzym Fast Digest BglII	Thermo Fisher Scientific
Enzym Fast Digest SacI	Thermo Fisher Scientific
Enzym Fast Digest NdeI	Thermo Fisher Scientific
Enzym Fast Digest XhoI	Thermo Fisher Scientific

3.1.3. Antybiotyki

Nazwa	Stężenie	Producent
Ampicylina	100 mg/ml	Sigma
Chloramfenikol	50 mg/ml	Sigma
Gentamycyna	50 mg/ml	Sigma
Kanamycyna	50 mg/ml	Sigma
Tetracyklina	10 mg/ml	Sigma

Aby otrzymać powyższe stężenia, 1 g ampicyliny, 0,5 g gentamycyny, 0,5 g kanamycyny i 0,1 g tetracykliny rozpuszczano w 10 ml wody dejonizowanej, natomiast 0,5 g chloramfenikolu rozpuszczano w 10 ml alkoholu etylowego. Otrzymane roztwory przepuszczano przez filtr 0,22 µm (Roth), porcjowano po 1 ml w próbkach typu Eppendorf i przechowywano w temperaturze -20°C.

3.1.4. Przeciwciała

Nazwa	Producent	Stosowane rozcieńczenie
Mysie monoklonalne przeciwciało skierowane przeciwko metce 6x-HisTag	Thermo Fisher Scientific	1:4000
Królicze poliklonalne przeciwciała klasy IgG skierowane przeciwko kozim IgG	Sigma Aldrich	1:10000
Królicze poliklonalne przeciwciała skierowane przeciwko białku YidR	Davids Biotechnologie GmbH	1:250
Kozie poliklonalne przeciwciała klasy IgG skierowane przeciwko króliczym IgG	Dako	1:2000
Kozie poliklonalne przeciwciała klasy IgG skierowane przeciwko króliczym IgG	Sigma Aldrich	1:10000
Królicze monoklonalne przeciwciało skierowane przeciwko hemaglutynie wirusa grypy	Cell Signaling Technology	1:1000
Mysie monoklonalne przeciwciało skierowane przeciwko białku GFP	Cell Signaling Technology	1:10000
Końskie poliklonalne przeciwciała klasy IgG skierowane przeciwko mysim IgG	Cell Signaling Technology	1:2000

3.1.5. Bufory i roztwory

Nazwa	Skład
0,01 M bufor fosforanowy, pH 7,4 (PBS)	10 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄ , 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl
0,01 M bufor fosforanowy, pH 7,4 z dodatkiem Tritonu X-100 (PBST)	10 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄ , 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,1% Triton X-100
Bufor Tris-HCl , pH 8,0 (TAE)	40 mM Tris-HCl, 20 mM CH ₃ COOH, 1 mM EDTA
Bufor Tris-HCl, pH 8,0 z dodatkiem EDTA (TBE)	89 mM Tris-HCl, 89 mM H ₃ BO ₃ , 2 mM EDTA, pH 8,0
Bufor do elektroforezy SDS-PAGE	25 mM Tris-HCl, 192 mM glicyna, 0,1% SDS, pH 8,3
Bufor do elektrotransferu	10 mM Tris-HCl, 150 mM glicyna, 20% metanol, pH 8,3
Bufor “próbkowy” 6x stężony	0,09% błękit bromofenolowy, 0,09% cyjanian ksylenu, 60% glicerol, 60 mM EDTA, pH 7,6
Bufor do denaturacji próbek 4x stężony	62,5 mM Tris-HCl, 2% SDS, 10% glicerol, 5% β-merkaptoetanol, 0,015% błękit bromofenolowy, pH 6,8
Bufor do lizy komórek z mocznikiem	20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 8 M mocznik, pH 7,8
Bufor do płukania złoża Ni ²⁺ -NTA-agaroza	20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 2 mM imidazol, pH 7,7
Bufor do elucji białka ze złoża Ni ²⁺ -NTA-agaroza	200 mM imidazol, pH 7,5
Roztwór Coomassie R-250	0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% metanol, 10% kwas octowy
Roztwór odbarwiający żele po barwieniu w roztworze Coomassie R-250	25% metanol, 7,5% kwas octowy

3.1.6. Gotowe zestawy odczynników

Nazwa	Producent
Zestaw do oczyszczania DNA z żeli agarozowych „MiniElute Gel Extraction Kit”	Qiagen
Zestaw do oczyszczania DNA z mieszaniny po reakcji PCR „Clean-Up”	Thermo Fisher Scientific
Zestaw do izolacji genomowego DNA „Genomic Mini”	A&A Biotechnology
Zestaw do izolacji plazmidowego DNA „pJET Plasmid Mini Kit”	Thermo Fisher Scientific
Zestaw do oczyszczania przeciwciał „Aminolink™ Plus Immobilization Trial Kit”	Thermo Fisher Scientific
Zestaw do wykrywania przeciwciał w metodzie Western Blotting „HisDetector™ Western Blot Kit, HRP Chemiluminescent”	Sera Care

3.1.7. Standardy DNA

Nazwa	Producent
GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific

3.1.8. Standardy białek

Nazwa	Producent
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10-180 kDA	Thermo Fisher Scientific

3.1.9. Startery

Nazwa	Sekwencja 5'-3'	Komplementarne do sekwencji w
5'- pFPVforSEQ	CGA AAA GTG CCA CCT GAC G	genie <i>kanR</i>
3'- pFPVrevSEQ	ATC ACG ACA ACA ACG ATA AGC AG	genie <i>kanR</i>
5'- yidRdelfor	ATG AAA CAA ATC ACC TTT ACG CCG CGC CAT CAC CAG CTT ACC AAC ACC AAG TGT AGG CTG GAG CTG CTT C	genie <i>yidR</i>
3'- yidRdelrev	TTA TCG CCC GGT TTC CGT CAC CCA TAG CTG ACG GAA CCC TTT CAC CTC TTC ATA TGA ATA TCC TCC TTA G	genie <i>yidR</i>
5'- yidR100UpstreamFor	GGC TAT CCC AAC GAT ACG C	genie <i>yidR</i>
3'- yidR100DownstreamRev	GAC ATC TTC CGC AAA GAC AG	genie <i>yidR</i>
3'- yidRinternalRev	CAT CGA GGT TAG TCA CAC CC	genie <i>yidR</i>

3'- k1	CAG TCA TAG CCG AAT AGC CT	genie <i>kanR</i>
5'- sicABglFor	ACA GAT CTG CCG CGT AAG GCA GTA GC	genie <i>sicA</i>
3'- pQF50revmut3	CGA AAG TAG TGA CTA AGG TTG GC	genie <i>ampR</i>
5'- pET22b-yidR1NdeFor	ACA TCA TAT G AAA CAA ATC ACC TTT ACG CCG C	genie <i>yidR</i>
3'- pET22b-yidR1XhoRev	ACA TCT CGA G TCG CCC GGT TTC CGT CAC	genie <i>yidR</i>
3'- pET-T7up	CGG TGA TGT CGG CGA TAT AG	genie <i>yidR</i>
3'- sicA2BamRev	ACA GGA TCC CGA CAT TAT TTT GAT AAT CCA TTA C	genie <i>sicA</i>
5'- pQF50for	CCG CAT AGT TAA GCC AGT ATA GC	genie <i>ampR</i>
5'- sicA::2xHASacFor	ACA GAG CTC GCC GCG TAA GGC AGT AGC	genie <i>sicA</i>
3'- sicA::2xHABglRev	ACA GAT CTT TCC TTT TCT TGT TCA CTG TGC TG	genie <i>sicA</i>
5'- fimA::2xHASacFor	ACA GAG CTC AAA ATA AGA TTA GAC CCT TCT TAT	genie <i>fimA</i>
3'- fimA::2xHABglRev	ACA GAT CTT TCG TAT TTC ATG ATA AAG GTG	genie <i>fimA</i>

Oligonukleotydy DNA syntetyzowane były przez firmę LGC Genomics (Berlin, Niemcy).

3.1.10. Wektory plazmidowe

Nazwa	Opis, pochodzenie
pKD4	Wektor plazmidowy stosowany do wstawiania mutacji chromosomalnych u bakterii w oparciu o system wykorzystujący rekombinazę faga λ . Służy jako matryca w reakcji PCR do otrzymywania kasety DNA zawierającej gen <i>kan^R</i> warunkujący oporność na kanamycynę, która wykorzystywana jest do insercyjnej inaktywacji genów w wyniku homologicznej rekombinacji (Datsenko i Wannner, 2000). Plazmid otrzymano dzięki uprzejmości dr Rafała Kolendy (Katedry Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu).
pKD46	Wektor plazmidowy, podobnie jak wyżej, wykorzystywany jest do insercyjnej inaktywacji genów w wyniku homologicznej rekombinacji (Datsenko i Wannner, 2000). Zawiera sekwencje genów faga λ : <i>exo</i> , <i>bet</i> i <i>gam</i> pozostających pod kontrolą promotora operonu arabinozowego <i>araBAD</i> . Należy do plazmidów temperaturo-wrażliwych. Plazmid otrzymano dzięki uprzejmości dr Rafała Kolendy (Katedry Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu).
pCP20	Wektor plazmidowy zawierający gen flipazy ulegający ekspresji w temperaturze 42°C (ang. <i>Flippase</i> , FLP) (Cherepanov i Wackernagel, 1995) oraz geny oporności na ampicylinę i chloramfenikol. Należy do plazmidów temperaturo-wrażliwych. Plazmid otrzymano dzięki uprzejmości dr Rafała Kolendy (Katedry Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu).
pET22b (+)	Wektor służący do szybkiej i wysokowydajnej ekspresji białek

rekombinowanych w bakteriach, stąd klonowane do niego geny lub cDNA pozostają pod kontrolą silnych sygnałów transkrypcji bakteriofaga T7, a ekspresja swoistego mRNA jest indukowana przez dostarczenie źródła polimerazy T7 RNA w komórce gospodarza. W systemie tym w genomie komórki bakteryjnej znajduje się tzw. fragment λ DE3 pochodzący z genomu faga λ , w obrębie którego znajduje się gen polimerazy RNA faga T7 będący pod kontrolą promotora lacUV5 oraz operator *lacO*. Rekombinowane białko, ze względu na obecność odpowiednich sekwencji w wektorze pET-22b(+) jest wyposażone w N-kończącą sekwencję *pelB* kierującą nadekspresjonowane białko do periplazmy oraz C-kończącą sekwencję His-Tag, która umożliwia rozpoznanie białka przy użyciu przeciwciał anti-His-Tag (**Ryc. 21**) (Invitrogen).

pQF50/GFP

Wektor plazmidowy wykorzystywany do oznaczania aktywności sekwencji promotorowych w bakteriach. Ze względu na obecność cDNA białka zielonej fluorescencji (ang. *green fluorescence protein*, GFP), aktywność wklonowanego promotora odpowiada poziomowi ekspresji białka GFP. Pomiaru fluorescencji emitowanej przez GFP dokonuje się przy długości fali λ w zakresie 485 nm - 535 nm. Plazmid otrzymano dzięki uprzejmości dr Rafała Kolendy (Katedry Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu).

pFPV25.1GFPMut3_Kan_2xHA

Wektor ekspresyjny zawierający zarówno cDNA białka GFP, jak i sekwencję DNA kodującą 18-aminokwasowy fragment hemaglutyniny wirusa grypy (2xHA) umożliwiający wykrywanie rekombinowanego białka przy użyciu przeciwciał anti-2xHA. Plazmid otrzymano dzięki uprzejmości dr Rafała Kolendy (Katedra Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu).

3.1.11. Szczepy bakteryjne

Nazwa szczepu	Genotyp	Źródło
<i>Salmonella</i> Enteritidis P125109	Szczep dziki (ang. <i>wild type</i> , WT)	Dr Derek Pickard, Cambridge Institute for Therapeutic Immunology & Infectious Disease, University of Cambridge Department of Medicine, Cambridge, Wielka Brytania
<i>Salmonella</i> Typhimurium 1344	Szczep dziki (ang. <i>wild type</i> , WT)	Prof. dr hab. Peter Schierack, BTU Cottbus-Senftenberg, Niemcy
<i>Escherichia coli</i> BW25141/pKD4	<i>F</i> ⁻ , Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(<i>::rrnB</i> - 3), Δ (<i>phoB-phoR</i>)580, λ ⁻ , <i>galU</i> 95, Δ <i>uidA</i> 3(<i>::pir</i> ⁺ , <i>recA</i> 1, <i>endA</i> 9(<i>del-</i> <i>ins</i>): <i>FRT</i> , <i>rph</i> -1, Δ (<i>rhaD-</i> <i>rhaB</i>)568, <i>hsdR</i> 514	Prof. dr hab. Peter Schierack, BTU Cottbus-Senftenberg, Niemcy
<i>Escherichia coli</i> BW25141/pKD46	<i>F</i> ⁻ , Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(<i>::rrnB</i> - 3), Δ (<i>phoB-phoR</i>)580, λ ⁻ , <i>galU</i> 95, Δ <i>uidA</i> 3(<i>::pir</i> ⁺ , <i>recA</i> 1, <i>endA</i> 9(<i>del-</i> <i>ins</i>): <i>FRT</i> , <i>rph</i> -1, Δ (<i>rhaD-</i> <i>rhaB</i>)568, <i>hsdR</i> 514	Prof. dr hab. Peter Schierack, BTU Cottbus-Senftenberg, Niemcy
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)/pCP20	<i>F</i> ⁻ , <i>lon</i> -11, Δ (<i>ompT-nfrA</i>)885, Δ (<i>galM-</i> <i>ybhJ</i>)884, λ DE3 [<i>lacI</i> , <i>lacUV5-T7 gene 1</i> , <i>ind1</i> , <i>sam7 nin5</i>], Δ 46, [<i>mal</i> ⁺] _{K-12} (λ ^S), <i>hsdS</i> 10	Prof. dr hab. Peter Schierack, BTU Cottbus-Senftenberg, Niemcy

<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44</i> <i>relA1 lac [F' proAB lacIq Z M15 Tn10</i> <i>(Tetr)]</i>	Prof. dr hab. Peter Schierack, BTU Cottbus-Senftenberg, Niemcy
<i>Escherichia coli</i> pQF50/GFP	Szczep zawierający plazmid pQF50 z wklonowanym białkiem GFP	Dr Derek Pickard, Cambridge Institute for Therapeutic Immunology & Infectious Disease, University of Cambridge Department of Medicine, Cambridge, Wielka Brytania
<i>Escherichia coli</i> Lemo21(DE3)	Szczep pozwalający na wysokowydajną ekspresję białek. Regulowana ekspresja jest osiągana poprzez zmianę poziomu lizozymu (lysY), naturalnego inhibitora polimerazy T7 RNA. Poziom lizozymu jest modulowany przez dodanie L- ramnoży do kultury bakteryjnej.	Szczep otrzymano dzięki uprzejmości dr Agnieszki Biernatowskiej z Zakładu Cytobiochemii Uniwersytetu Wrocławskiego

3.1.12. Podłoża mikrobiologiczne

Pożywka LB (pH 7,0), 1000 ml		Pożywka stała LB (pH 7,0), 1000 ml		Bulion SOC (pH 7,0), 1000 ml	
Trypton	10 g	Trypton	10 g	Trypton	20 g
Ekstrakt drożdżowy	5 g	Ekstrakt drożdżowy	5 g	Ekstrakt drożdżowy	5 g
NaCl	10 g	NaCl	10 g	NaCl	0,585 g
		Agar	15 g	KCl	0,185 g
				Po autoklawowaniu i ostudzeniu:	
				1 M MgCl ₂	10 ml
				2 M glukoza	10 ml
		Pożywka BUG + B agar, 1000 ml			
Pożywka M9, 1000 ml		1000 ml			
Na ₂ HPO ₄	13,56 g	BUG Agar	57 g		
KH ₂ PO ₄	6 g	(Biolog)			
NH ₄ Cl	2 g	Po autoklawowaniu i ostudzeniu:			
NaCl	1 g	jałowa krew	50 ml		
1 M MgSO ₄	2 ml	barania			
1 M CaCl ₂	100 µl				

3.1.13. Linie komórek eukariotycznych

Linia komórkowa	Pożywka hodowlana	Źródło
Komórki Ipec-J2 nabłonka jelita czczego świni	Pożywka D-MEM/ Ham's F-12 (pełna)	Prof. dr hab. Peter Schierack, BTU Cottbus-Senftenberg, Niemcy (Schierack P. i wsp., 2006)
Komórki Chic-8E11 nabłonka jelita kury	Pożywka D-MEM/ Ham's F-12 (pełna)	Dr Karsten Tedin, Fachbereich Veterinarmedizin, Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Freie Universität Berlin, Niemcy
Komórki Caco-2 ludzkiego gruczołakoraka jelita grubego	Pożywka D-MEM/ Ham's F-12 (pełna)	Leibniz Institute, DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, Braunschweig, Niemcy

3.1.14. Podłoża hodowlane i roztwory wykorzystywane w pracy z komórkami eukariotycznymi

Nazwa	Skład	Końcowe stężenie
Pełna pożywka D-MEM/ Ham's F-12	D-MEM/ Ham's F-12	
	FBS	5% lub 10%*
	Penicylina	0,1 g/ml
	Streptomycyna	100 U/ml
	L-glutamina	2 mM
Pożywka D-MEM/ Ham's F-12 (pożywka infekcyjna)	D-MEM/ Ham's F-12	
	FBS	5% lub 10%*
	L-glutamina	2 mM
Roztwór trypsyny	Trypsyna	0,1%
	EDTA	0,02%
Roztwór Triton X-100 w PBS	Triton X-100	1% (v/v)
	PBS	1x

*10% FBS stosowano w przypadku hodowli komórek Caco-2.

3.1.15. Aparatura

Nazwa	Producent
Aparat do szybkiego transferu Trans-Blot Turbo Transfer System	Bio-Rad
Aparat do elektroforezy w żelu poliakryloamidowym Gel electrophoresis devices Sub-Cell GT Cell	Bio-Rad
Czytnik mikropłytek	Tecan
Inkubator CO ₂ do hodowli komórkowych Direct Heat Laboratory CO ₂ NU5800	NuAire
Inkubator CO ₂ do hodowli komórkowych Forma Steri Cycle 370 CO ₂	Thermo Fisher Scientific
Inkubator z czytnikiem płytek MicroStation	Biolog Inc.
Inkubator z wytrząsaniem Incubator Shaker Infors HT	Minitron
Inkubator z wytrząsaniem New Brunswick Tm Incubator Shaker Innova 40	Innova
Komora laminarna 2A Biological Safety Cabinet	Thermo Fisher Scientific
Komora laminarna Microbiological Safety Cabinet Class II	EuroClone
Miniwirówka	Eppendorf
Odwrócony mikroskop fluorescencyjny z kamerą MW50	Opta-Tech
Spektrofotometr DS-11 NanoDrop	DeNovix
Spektrofotometr SmartSpec Plus	Bio-Rad

System do elektroporacji Gene Pulser Xcell Electroporation Systems	Bio-Rad
System do wizualizacji żeli ChemiDoc XRS+ Gel Imaging System	Bio-Rad
Termocykler CFX96	Bio-Rad
Urządzenie Turbidymetr do pomiaru mętności zawiesiny bakteryjnej	Biolog Inc.
Wirówka 1-14	Sigma Aldrich

3.2. Metody biologii molekularnej

Poniżej podano standardowe techniki rekombinowanego DNA, które stosowano zgodnie z podanymi opisami dostępnymi w piśmiennictwie lub instrukcjami producentów. Bardziej szczegółowe opisy podano jedynie w przypadku metod, których wykonanie wymagało własnych modyfikacji i/lub adaptacji.

3.2.1. Standardowe metody rekombinowanego DNA wykorzystywane w pracy

Metoda	Odkoźnik
Izolacja genomowego DNA z użyciem zestawu „Genomic Mini”	Instrukcja producenta (A&A Biotechnology)
Trawienie DNA endonukleazami restrykcyjnymi	Sambrook i Russell (2001) oraz instrukcje producentów odczynników
Elektroforeza DNA w żelu agarozowym	Sambrook i Russell (2001)
Izolacja DNA z żelu agarozowego z użyciem zestawu „MiniElute Gel Extraction Kit”	Instrukcja producenta (Qiagen)

Amplifikacja DNA metodą PCR	(Sambrook, Russell, 2001) oraz instrukcje producentów odczynników
Oczyszczanie DNA z mieszaniny reakcyjnej po PCR z użyciem zestawu „Clean-Up”	Instrukcja producenta (Thermo Fisher Scientific)

3.2.2. Reakcja PCR dla pojedynczej kolonii bakterii (ang. *single colony PCR*)

Pojedyncze kolonie bakterii wyrosłe po całonocnej hodowli na płytkach Petriego pokrytych zestaloną agarą pożywką LB (**rozdział 3.1.12**) przenoszono do próbek typu Eppendorf i zawieszano w 4 μ l wody dejonizowanej. Do reakcji PCR pobierano po 1 μ l tak przygotowanej zawiesiny bakterii. Skład mieszaniny wykorzystywanej w reakcji PCR oraz warunki reakcji PCR podano poniżej.

Skład mieszaniny reakcyjnej PCR dla pojedynczej kolonii bakterii z wykorzystaniem polimerazy DNA „DreamTaq”

Składnik	Objętość [μ l]
Bufor (10x)	2
MgCl ₂ (50 mM)	0,6
dNTP (10 mM)	0,4
Starter przedni (10 μ M)	0,4
Starter wsteczny (10 μ M)	0,4
Polimeraza DreamTaq (5 U/ μ l)	0,1
Matryca DNA	1
H ₂ O do 25 μ l	

Warunki reakcji PCR

Wstępna denaturacja matrycy DNA	95°C; 3 minuty
Denaturacja matrycy DNA	94°C; 30 sekund
Hybrydyzacja ssDNA-startery	59°C; 30 sekund
Synteza ssDNA*	72°C; 1 minuta
Liczba cykli PCR	25

*Czas syntezy DNA został dostosowany do długości oczekiwanych produktów PCR, przy założeniu, że 1000 par zasad jest amplifikowanych przez 1 minutę (stosując polimerazę „DreamTaq”).

3.2.3. Reakcja PCR w gradiencie temperatury

PCR w gradiencie temperatury ma na celu określenie optymalnej temperatury hybrydyzacji starterów z matrycą DNA, czyli temperatury „annealingu”. Składy mieszanin reakcyjnych dla gradientowego PCR oraz warunki reakcji PCR, w których wykorzystywano albo polimerazę DNA „DreamTaq” (rozdział 3.1.2), albo polimerazę DNA „Phusion” (rozdział 3.1.2) przedstawiono poniżej.

Skład mieszaniny reakcyjnej dla gradientowego PCR z wykorzystaniem polimerazy DNA „DreamTaq”

Składnik	Objętość [μl]
Bufor (10x)	2
dNTP (10 mM)	0,4
Starter przedni (10 μM)	0,4
Starter wsteczny (10 μM)	0,4
Polimeraza DNA „DreamTaq” (5 U/μl)	0,16
Matryca DNA (10 ng/μl DNA)	1
H ₂ O do 20 μl	

Warunki reakcji PCR z wykorzystaniem polimerazy DNA „DreamTaq”

Wstępna denaturacja matrycy DNA	95°C; 3 minuty
Denaturacja matrycy DNA	94°C; 30 sekund
Hybrydyzacja ssDNA-startery	57-62°C; 30 sekund
Synteza ssDNA	72°C; 1 minuta
Synteza końcowa ssDNA	72°C; 5 minut
Liczba cykli PCR	35

Skład mieszaniny reakcyjnej dla gradientowego PCR z wykorzystaniem polimerazy DNA „Phusion”

Składnik	Objętość [μl]
Bufor (5x)	4
dNTP (10 mM)	0,4
Starter przedni (10 μM)	0,4
Starter wsteczny (10 μM)	0,4
Polimeraza DNA „Phusion” (2 U/μl)	0,2
Matryca DNA (10 ng/μl DNA)	1
H ₂ O do 20 μl	

Warunki reakcji PCR z wykorzystaniem polimerazy DNA „Phusion”

Wstępna denaturacja matrycy DNA	98°C; 30 sekund
Denaturacja matrycy DNA	98°C; 5 sekund
Hybrydyzacja ssDNA-startery	57-62°C; 15 sekund
Synteza ssDNA*	72°C; 30 sekund
synteza końcowa ssDNA	72°C; 5 minut
Liczba cykli DNA	35

*Czas syntezy DNA został dostosowany do długości oczekiwanych produktów PCR, przy założeniu, że 1000 par zasad jest amplifikowanych przez 30 sekund (stosując polimerazę „Phusion”).

3.2.4. Reakcja PCR w celu amplifikacji kasety DNA warunkującej oporność bakterii na kanamycynę

Skład mieszaniny reakcyjnej

Składnik	Objętość [μ l]
Bufor (10x)	40
dNTP (10 mM)	8
Starter przedni (10 μ M)	8
Starter wsteczny (10 μ M)	8
Polimeraza DNA „DreamTaq” (5 U/ μ l)	3,2
Matryca DNA (5 ng/ μ l DNA)	16
H ₂ O do 400 μ l	

Warunki reakcji PCR z wykorzystaniem polimerazy DNA „Phusion”

Wstępna denaturacja matrycy DNA	95°C; 3 minuty
Denaturacja matrycy DNA	94°C; 30 sekund
Hybrydyzacja ssDNA-startery	59°C; 30 sekund
Synteza ssDNA	72°C; 1 minuta
Synteza końcowa ssDNA	72°C; 5 minut
Liczba cykli PCR	40

3.2.5. Reakcja PCR w celu amplifikacji genu *yidR*

Skład mieszaniny reakcyjnej

Składnik	Objętość [μ l]
Bufor (5x)	10
dNTP (10 mM)	1
Starter przedni (10 μ M)	1
Starter wsteczny (10 μ M)	1
Polimeraza DNA “Phusion”	0,5

(2 U/ μ l)

Matryca DNA (5 ng/ μ l)

2

H₂O do 50 μ l

Warunki reakcji PCR z wykorzystaniem polimerazy DNA „Phusion”

Wstępna denaturacja matrycy DNA	98°C; 30 sekund
Denaturacja matrycy DNA	98°C; 5 sekund
Hybrydyzacja ssDNA-startery	60°C; 15 sekund
Synteza ssDNA	72°C; 45 sekund
Synteza końcowa ssDNA	72°C; 5 minut
Liczba cykli PCR	35

3.2.6. Reakcja PCR w celu amplifikacji sekwencji promotora genu *sicA* oraz w celu amplifikacji sekwencji genów *fimA* oraz *sicA* wraz z ich promotorami

Skład mieszaniny reakcyjnej

Składnik	Objętość [μ l]
Bufor (5x)	16
dNTP (10 mM)	1,6
Starter przedni (10 μ M)	1,6
Starter wsteczny (10 μ M)	1,6
Polimeraza DNA “Phusion” (2 U/ μ l)	0,8
Matryca DNA (5 ng/ μ l)	4
H ₂ O	do 80 μ l

Warunki reakcji PCR z wykorzystaniem polimerazy DNA „Phusion”

Wstępna denaturacja matrycy DNA	98°C; 30 sekund
Denaturacja matrycy DNA	98°C; 5 sekund
Hybrydyzacja ssDNA-startery*	°C; 15 sekund

Synteza ssDNA**	72°C; sekund
Synteza końcowa ssDNA	72°C; 5 minut
Liczba cykli	35

*Temperatura dla hybrydyzacji ssDNA-startery (amplifikacja promotora genu *sicA*): 58°C; temperatura dla hybrydyzacji ssDNA-startery (amplifikacja sekwencji genów wraz z ich promotorami): *fimA* - 56°C, *sicA* - 60°C.

**Czas dla syntezy ssDNA (amplifikacja promotora genu *sicA*): 15 sekund; czas dla syntezy ssDNA (amplifikacja sekwencji genów wraz z ich promotorami): 25 sekund.

3.2.7. Sekwencjonowanie DNA

Poprawność sekwencji uzyskanych cząsteczek rekombinowanego DNA potwierdzono sekwencjonowaniem metodą Sangera wykonywanym przez firmę LGC Genomics.

3.2.8. Przygotowanie elektrokompetentnych bakterii i elektroporacja

Bakterie elektrokompetentne przygotowano zgodnie z protokołem Sambrooka i Russella (2006) z niewielkimi modyfikacjami. Jeden ml zawiesiny bakterii hodowanych przez noc w 5 ml pożywki LB (**rozdział 3.1.12**) wirowano (6000xg, 3 minuty) i uzyskany osad przenoszono do 100 ml pożywki LB, kontynuując hodowlę w temperaturze 37°C lub 30°C przy ciągłym wytrząsaniu do momentu, kiedy uzyskała ona gęstość optyczną przy długości fali 600 nm (OD₆₀₀) równą 0,6. Taką hodowlę pozostawiano na lodzie przez 5 minut, następnie wirowano przy 6000xg przez 10 minut w temperaturze 4°C, a otrzymany osad bakterii przemywano jednokrotnie 25 ml podwójnie destylowanej H₂O (ddH₂O, ang. *double distilled H₂O*) i dwukrotnie 15 ml 10% roztworu glicerolu w ddH₂O. Tak przygotowane bakterie wirowano jak wyżej, zawieszano w 0,1 ml 10% roztworu glicerolu w ddH₂O i zamrażano w ciekłym azocie w porcjach po 50 µl.

W celu elektroporacji, przygotowane, jak wyżej bakterie rozmrażano i dodawano do nich po 100, 250 lub 500 ng DNA. Następnie, taką zawiesinę bakterii pozostawiano na lodzie przez 1 minutę i przenoszono do kuwet elektroporacyjnych o szerokości szczeliny 4 mm i poddawano elektroporacji w następujących warunkach: napięcie 1,5 kV, przepustowość 25 uF, oporność 400 Ω . Teraz do kuwet dodawano 900 μ l pożywki SOC (**rozdział 3.1.12**) i taką zawiesinę bakterii przenoszono do próbek typu Eppendorf, które pozostawiano na dwie godziny, w temperaturze 37°C lub 30°C z ciągłym wytrząsaniem. Po tym czasie bakterie wirowano jak wyżej, osad zawieszono w 200 μ l świeżej pożywki LB i wysiewano na płytce Petriego z zestaloną agarą pożywką LB zawierającą odpowiedni antybiotyk.

3.2.9. Przygotowanie bakterii chemokompetentnych i transformacja metodą szoku termicznego

Do przygotowania chemokompetentnych bakterii wykorzystywano protokół Dagerta i Ehrlicha (1979) z niewielkimi modyfikacjami. Dwoma ml całonocnej kultury bakterii hodowanych w pożywce LB zaszczipiano 200 ml pożywki LB z dodatkiem tetracykliny (10 μ g/ml) i kontynuowano hodowlę w temperaturze 37°C przy ciągłym wytrząsaniu, aż do uzyskania przez nie OD₆₀₀ równej 0,4. Następnie, takie bakterie pozostawiano przez okres 10 minut na lodzie i wirowano przy 6000xg przez 10 minut, w temperaturze 4°C. Otrzymany osad bakterii zawieszono w 80 ml 50 mM roztworu CaCl₂ schłodzonego do temperatury 4°C, ponownie pozostawiano na lodzie przez okres 20 minut i wirowano jak wyżej. Ostatecznie osad bakterii zawieszono w 4 ml zimnego 50 mM CaCl₂ i do takiej zawiesiny bakterii dodawano 1 ml zimnego 50% glicerolu. Po dokładnym wymieszaniu, całość porcjowano po 100 μ l i przechowywano w -80°C.

Celem transformacji, do przygotowanych jak wyżej chemokompetentnych bakterii dodawano, po ich rozmrożeniu, po 100, 250 lub 500 ng plazmidowego DNA i pozostawiano na lodzie przez okres 30 minut. W kolejnym etapie bakterie poddawano szokowi termicznemu

w temperaturze 42°C przez okres 45 sekund, a następnie schładzano na lodzie przez 2 minuty. Teraz do zawiesiny bakterii dodawano 900 µl pożywki SOC, pozostawiano je w temperaturze 37°C przez okres 2 godzin przy ciągłym wytrząsaniu i wirowano jak wyżej. Osad bakterii zawieszano w 200 µl pożywki SOC i wysiewano w porcjach 50 lub 100 µl na płytki Petriego z zestaloną agarową pożywką LB z dodatkiem odpowiedniego antybiotyku.

3.3. Metody wykorzystywane w pracy z bakteriami

3.3.1. Mikroskopia fluorescencyjna

Do analizy zmutowanych szczepów bakterii pod kątem zmian morfologicznych oraz zdolności do tworzenia agregatów wykorzystywano mikroskopię fluorescencyjną. W celu przygotowania preparatów mikroskopowych, pojedynczą kolonią bakterii zaszczipiano 5 ml pożywki LB i prowadzono hodowlę przez 16 godzin w temperaturze 37°C, z ciągłym wytrząsaniem. Z takiej hodowli pobierano po 2 µl zawiesin bakterii, które наносzono na szkiełko podstawowe; jedne zawiesiny pozostawiając nierozcieńczone, drugie rozcieńczając 2-krotnie 0,9% roztworem NaCl. Teraz, do takich bakterii dodawano po 2 µl roztworu oranżu akrydyny (**rozdział 3.1.1.**) rozpuszczonego w ddH₂O (1 mg/ml) i preparat przykrywano szkiełkiem nakrywkowym. Tak przygotowane preparaty oglądano w odwróconym mikroskopie fluorescencyjnym (**rozdział 3.1.15**) przy powiększeniu 40x.

3.3.2. Wyznaczanie krzywych wzrostu

Chcąc wyznaczyć krzywe wzrostu, jedną kolonię bakterii pobraną z płytki Petriego pokrytej zestaloną agarową pożywką LB zaszczipiano 1 ml pożywki LB i bakterie hodowano przez noc w temperaturze 37°C, z ciągłym wytrząsaniem. Następnego dnia mierzono gęstość optyczną każdej z kultur bakteryjnych, a następnie dodawano taką objętość pożywki LB, aby OD₆₀₀ nie przekraczało wartości 0,05. Hodowle bakterii kontynuowano w warunkach jak

wyżej, aż do osiągnięcia $OD_{600}=0,5$, co odpowiada wczesnej fazie logarytmicznej wzrostu. Następnie, z takich kultur pobierano po 1 ml zawiesiny bakterii i próbki wirowano przy 6000xg przez 3 minuty. Osady przepłukiwano 1 ml 0,9% NaCl, zawiesiny bakterii wirowano przy 6000xg przez 5 minut i ponownie zawieszano w 0,4 ml 0,9% NaCl. Po oznaczeniu gęstości optycznej, do kultur bakterii dodawano takie objętości pożywki LB, aby liczba jednostek tworzących kolonie (ang. *colony-forming unit*, CFU) wynosiła 5×10^6 CFU/ml. W celu wyznaczenia krzywych wzrostu, do studzienek 96-dółkowej płytki przenoszono po 200 μ l zawiesiny bakterii w 3. powtórzeniach i hodowle, prowadzone w temperaturze 37°C, kontynuowano przez kolejnych 16 godzin. Pomiarów OD_{600} kultur bakterii dokonywano co 15 minut w czytniku do płytek firmy „Tecan”. Przed każdym pomiarem płytkę poddawano wytrząsaniu przez 30 sekund.

3.3.3. Wyznaczanie krzywych wzrostu bakterii w obecności różnych źródeł węgla (określenie profilu metabolicznego za pomocą Mikromacierzy Fenotypowych)

Mikromacierze Fenotypowe (ang. *Phenotype MicroArrays*, PMs), opracowane przez firmę BIOLOG INC., pozwalają na równoczesną analizę setek fenotypów bakterii w oparciu o ich hodowle w 96-dółkowych płytkach hodowlanych zawierających odpowiednio zdefiniowane podłoża hodowlane. Podczas hodowli, najczęściej prowadzonej przez 48 godzin, monitorowane jest zachowanie bakterii poprzez oznaczanie aktywności ich enzymów oddechowych za pomocą metody kolorymetrycznej.

Do określenia profili metabolicznych szczepów *S. Enteritidis* wykorzystywano dostarczone przez producenta płytki PM1 i PM2A, zawierające podłoża różniące się od siebie związkami pełniącymi rolę jedyne źródła węgla (**Ryc. 3**). Dla celów tej analizy, bakterie hodowano na płytkach Petriego pokrytych zestaloną pożywką BUG+B agar (**rozdział 3.1.12**) przez noc (około 16 godzin) w temperaturze 37°C. Następnego dnia pojedyncze kolonie bakterie wysiewano na nowe płytki Petriego z zestaloną pożywką BUG+B agar i hodowle

kontynuowano przez następnych 16 godzin w temperaturze 37°C. Kolejne etapy służące przygotowaniu bakterii do wysiania na płytki mikromacierzowe były wykonywane zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. Ostatecznie, z tak przygotowanych hodowli pałeczek *Salmonella* pobierano 100 µl zawiesiny bakterii i przenoszono do studzienek 96-dółkowych płytek PM1 i PM2. Hodowle prowadzono przez 48 godzin w inkubatorze z czytnikiem kolorymetrycznym MicroStation Biolog, dokonując odczytów co 15 minut (**rozdział 3.1.15**). Uzyskane wyniki analizowano posługując się oprogramowaniem OmniLog (Biolog).

Wyniki uzyskane za pomocą Mikromacierzy Fenotypów poddawano walidacji poprzez wyznaczenie krzywych wzrostu (**rozdział 3.3.2**) badanych szczepów *S. Enteritidis*, które hodowano w pożywce M9 (**rozdział 3.1.12**), z dodatkiem glukozy (5 mM, 10 mM lub 20 mM) lub kwasu jabłkowego (5 mM, 10 mM lub 20 mM).

A1 Negatywna kontrola	A2 L-Arabinoza	A3 N-Acetylo-D-Glukozamina	A4 Kwas D-Glukarowy	A5 Kwas Bursztynowy	A6 D-Galaktoza	A7 Kwas L-Asparaginowy	A8 L-Prolina	A9 D-Alanina	A10 D-Trehaloza	A11 D-Mannoza	A12 Galaktiol
B1 D-Seryna	B2 D-Sorbitol	B3 Glicerol	B4 L-Fukoza	B5 Kwas D-Glukuronowy	B6 Kwas D-Glukonowy	B7 D,L- α -Fosforan Glicerolu	B8 D-Ksýloza	B9 Kwas L-Mlekowy	B10 Kwas Mrówkowy	B11 D-Mannitol	B12 Kwas L-Glutaminowy
C1 Glukoza-6-Fosforan	C2 D- γ -Lakton Kwasu Glukonowego	C3 Kwas D,L-Jablkowy	C4 D-Ryboza	C5 Tween 20	C6 L-Ramnoza	C7 D-Fruktoza	C8 Kwas Octowy	C9 α -D-Glukoza	C10 Maltoza	C11 D-Melibioza	C12 Tymidyna
D1 L-Asparagina	D2 Kwas D-Asparaginowy	D3 Kwas D-Glukozaminowy	D4 1,2-Glikol Propylenowy	D5 Tween 40	D6 Kwas α -Ketoglutarowy	D7 Kwas α -Ketomasłowy	D8 α -Metylo-D-Galaktoza	D9 α -D-Laktoza	D10 Laktoza	D11 Sukroza	D12 Urydyna
E1 L-Glutamina	E2 Kwas M-Winowy	E3 Glukoza-1-Fosforan	E4 Fruktozo-6-Fosforan	E5 Tween 80	E6 α,γ -Lakton Kwasu Hydroksyglutajowego	E7 Kwas α -Hydroksymasłowy	E8 β -Metylo-D-Glukozyl	E9 Rybitol	E10 Maltotrioza	E11 2-Deoksyadenozyna	E12 Adenozyna
F1 Kwas Kargluminowy	F2 Kwas Cytrynowy	F3 M-Inozytol	F4 D-Treonina	F5 Kwas Fumarowy	F6 Kwas 2-Bromo-3-Chloro-Bursztynowy	F7 Kwas Propionowy	F8 Kwas Siłozowy	F9 Kwas Glikolowy	F10 Kwas Glioksalowy	F11 D-Celobioza	F12 Inozyna
G1 Kwas L-Glutamylglycynowy	G2 Kwas Propano-1,2,3-Trikarboksylowy	G3 L-Seryna	G4 L-Treonina	G5 L-Alanina	G6 L-Alanyloglicyna	G7 Kwas Acetylooctowy	G8 N-Acetylo- β -D-Mannozamina	G9 Kwas 2-Metylobursztynowy	G10 Pirogronian Metylu	G11 Kwas D-Jablkowy	G12 Kwas L-Jablkowy
H1 Glicylo-L-Prolina	H2 Kwas 4-Hydroksyfenylooctowy	H3 Kwas 3-Hydroksyfenylooctowy	H4 Tyramina	H5 D-Psikoza	H6 L-Liksoza	H7 Glukuronamid	H8 Kwas Pirogronowy	H9 L, γ -Lakton Kwasu Galaktonowego	H10 Kwas D-Galakturnowy	H11 2-Fenyletyloamina	H12 Eranoloamina

A1 Negatywna kontrola													A12 Pektyna
B1 N-Acetylo-D-Glukozamina	B2 Kwas N-Acetyloneuraminowy	A3 α -Cyklodekstryn	A4 β -Cyklodekstryn	A5 γ -Cyklodekstryn	A6 Dekstryna	A7 Żelatyna	A8 Glikogen	A9 Inulina	A10 Laminaryna	A11 Mannan	A12 Pektyna	B12 Sambubioza	
C1 Gencjobjoza	B3 β -D-Alloza	C3 Laktitol	C4 D-Melezytoza	C5 Maltitol	C6 α -Metylo-D-Glukozyl	C7 α -Metylo-D-Galaktozyl	C8 3-Metylo-glukoza	C9 Kwas β -Metylo D-Glukuronowy	C10 α -Metylo-D-Mannozyd	C11 β -Metylo-D-Ksylozyd	C12 Palatynoza		
D1 D-Rafinoza	D2 Salicyna	D3 Seduheptuloza	D4 L-Sorboza	D5 Stachyzoza	D6 D-Tagatoza	D7 Turanoza	D8 Ksylitol	D9 N-Acetylo-D-Glukozaminitol	D10 Kwas γ -Aminomasłowy	D11 Kwas Aminowalerianowy	D12 Kwas Masłowy		
E1 Kwas Dekanowy	E2 Kwas Kapronowy	E3 Kwas Cytrynowy	E4 Kwas Cytrajabłkowy	E5 Glukozamina	E6 Kwas Salicylowy	E7 Kwas 4-Hydroksybenzoesowy	E8 Kwas 3-Hydroksymasłowy	E9 Kwas 4-Hydroksybutanowy	E10 Kwas α -Ketowalerianowy	E11 Kwas Itakonowy	E12 Kwas Galakturonowy		
F1 Ester Metylowy Kwasu Mlekowego	F2 Kwas Malonowy	F3 Kwas Melibionowy	F4 Kwas Szczawliowy	F5 Kwas Oksalomalowy	F6 Kwas Chinowy	F7 D-Ribono-1,4-Lactone	F8 Kwas Sebacynowy	F9 Kwas Sorbowy	F10 Kwas Sukcynamowy	F11 Kwas D-Winowy	F12 Kwas L-Winowy		
G1 Acetamid	G2 L-Alaninamid	G3 Kwas N-Acetyloglutaminowy	G4 L-Arginina	G5 Glicyna	G6 L-Histydyna	G7 L-Homoseryna	G8 Hydroksy-L-Prolina	G9 L-Izoleucyna	G10 L-Leucyna	G11 L-Lizyna	G12 L-Metionina		
H1 L-Ornityna	H2 L-Fenylalanina	H3 Kwas Piroglutaminowy	H4 L-Walina	H5 D,L-Karnityna	H6 Sec-Butyloamina	H7 D,L-Oktopamina	H8 Putrescyna	H9 Dihydroksy-aceton	H10 2,3-Butanodiol	H11 3-Metylo-2-Butanon	H12 Acetoina		

Rycina 3. Mikromacierze Fenotypowe PM1 i PM2A z podłożami różniącymi się od siebie związkami pełniącymi rolę jedyne go źródła węgla.

3.4. Metody pracy z komórkami eukariotycznymi

3.4.1. Linie komórkowe i warunki hodowli

Komórki Chic-8E11 nabłonka jelit kury, Ipec-J2 nabłonka jelit świni i Caco-2 ludzkiego raka okrężnicy (**rozdział 3.1.13**) hodowano w pełnej pożywce D-MEM/Ham's F12 (Millipore) z dodatkiem, odpowiednio, 5% FBS, 5% FBS i 10% FBS (**rozdział 3.1.1**). Hodowle prowadzono w naczyniach hodowlanych T-25 i T-75 (Thermo Scientific), odpowiednio, o powierzchni 25 lub 75 cm² oraz 24-dołkowych płytkach (Nest Scientific Biotechnology), w temperaturze 37°C, w atmosferze wzbogaconej do 5% CO₂.

Komórki pasażowano w momencie, kiedy porosły one 80 - 90% powierzchni naczynia hodowlanego. W tym celu, komórki przemywano PBS (**rozdział 3.1.5**), a następnie odrywano od dna naczynia (**rozdz. 3.4.1**) przy użyciu 0,25% roztworu trypsyny zawierającego 1 mM EDTA (**rozdział 3.1.14**). Po inaktywacji trypsyny przez dodanie pełnej pożywki D-MEM/Ham's F12, komórki wirowano przy 200xg, w temperaturze pokojowej przez 5 minut. Osad komórek zawieszano w pełnej pożywce i przenoszono do naczynia hodowlanego w liczbie 6x10⁴.

3.4.2. Rozmrażanie i zamrażanie komórek

Komórki zamrażano w momencie, kiedy porosły one 80 - 90% powierzchni dna naczynia hodowlanego. W tym celu, najpierw odrywano je od dna naczynia przy użyciu 0,25% roztworu trypsyny zawierającego 1 mM EDTA, a następnie zawieszono w pełnej pożywce D-MEM/Ham's F12 zawierającej 5% DMSO w przypadku komórek Chic-8E11 i Ipec-J2 oraz 10% DMSO w przypadku komórek Caco-2. Z tak przygotowanych próbek pobierano po 1 ml zawiesiny komórek i przenoszono do krioprobówek (Nunc), które

przechowywano najpierw w temperaturze -80°C przez 24 godziny, a następnie przechowywano w ciekłym azocie.

Po wyjęciu z ciekłego azotu, krioprobówki z komórkami pozostawiano w temperaturze 37°C na 2 – 3 minuty. Po tym czasie komórki przenoszono do 5 ml pełnej pożywki D-MEM/Ham's F12 i wysiewano do naczyń hodowlanych.

3.4.3. Test adhezyjny i inwazyjny

Pałeczki *Salmonella* zarówno do testu adhezyjnego jak i inwazyjnego przygotowywano w ten sam sposób. W przeddzień eksperymentu, pojedynczą kolonią bakterii pobraną z płytki Petriego pokrytej zestaloną agarem pożywką LB zaszczipiano 1 ml pożywki LB. Hodowlę prowadzono przez 16 godzin w temperaturze 37°C , przy ciągłym wytrząsaniu. Następnego dnia pobierano odpowiednią objętość zawiesiny bakteryjnej i mierzono OD_{600} , a następnie dodawano taką objętość pożywki LB, aby końcowe OD_{600} wyniosło 0,05. Hodowlę kontynuowano, aż do osiągnięcia przez nią $\text{OD}_{600}=2,0$, co odpowiada stacjonarnej fazie wzrostu bakterii. Z takiej kultury pobierano 1 ml zawiesiny bakterii, które wirowano przy $6000 \times g$, przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Po usunięciu supernatantu, osad bakterii zawieszano w 1 ml PBS i ponownie wirowano, ostatecznie zawieszając bakterie w pożywce „infekcyjnej” (rozdział 3.1.14), tak, aby ich liczba w 1 ml wynosiła $1,16 \times 10^7$. Po raz kolejny mierzono gęstość optyczną przy długości fali 600nm i bakterie zawieszano w takiej objętości pożywki, aby w hodowli 100 bakterii przypadło na jedną komórkę eukariotyczną. Taki stosunek bakterii do komórek eukariotycznych nosi nazwę wielokrotności infekcji (ang. *Multiplicity Of Infection*, MOI).

Komórki eukariotyczne do testu adhezyjnego i inwazyjnego przygotowywano również w ten sam sposób, hodując je w studzienkach 24-dołkowej płytki (NEST) tak długo, aż porosły one 80 - 90% powierzchni dna dołka. W dniu wykonania testu, komórki

przepłukiwano dwukrotnie 1 ml PBS, a następnie, zamiast pełnej pożywki, do studzienek dodawano 500 μ l pożywki "infekcyjnej". Do takich komórek dodawano teraz przygotowane jak wyżej pałeczki *Salmonella*. W przypadku testu adhezyjnego, inkubację komórek z bakteriami prowadzono przez 1 godzinę w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO₂. Po tym czasie, pożywkę zawierającą niezwiązane bakterie usuwano i komórki przepłukiwano 3-krotnie 1 ml PBS. Kontrolę stanowiły komórki, które hodowano w nieobecności bakterii. W celu określenia liczby bakterii, zarówno tych, które związały się z powierzchnią komórek, jak i tych, które wniknęły do ich wnętrza podczas godzinnej inkubacji, przepłukane PBS komórki poddawano lizie przez pozostawienie w 1 ml schłodzonego 1% Triton X-100 (**rozdział 3.1.1**) w PBS przez okres 5 minut w temperaturze pokojowej. Uzyskane lizaty komórkowe zawierające bakterie rozcieńczano seryjnie buforem PBS i przenoszono na płytki Petriego z pożywką LB zestaloną agarem i hodowano w temperaturze 37°C przez noc.

W przypadku testu inwazyjnego postępowano tak samo jak w przypadku testu adhezyjnego, z tym, że aby wyznaczyć liczbę tylko tych bakterii, które wniknęły do wnętrza komórek eukariotycznych, dodatkowo, po 1-godzinnej inkubacji bakterii z komórkami i przepłukaniu, do studzienek dodawano na okres 30 min 0,5 ml pożywki „infekcyjnej” zawierającej gentamycynę w stężeniu 50 μ g/ml, postępując dalej jak w przypadku testu adhezyjnego.

Liczby bakterii obecnych w lizatach komórek, definiowanych jako CFU, wyznaczano w oparciu o zmodyfikowaną metodę Milesa i Misra (1938), polegającą na wysianiu seryjnych rozcieńczeń hodowli bakteryjnych na płytki Petriego pokryte zestaloną agarem pożywką LB, podzielone na sektory odpowiadające danemu rozcieńczeniu. Liczbę CFU/ml określano w oparciu o liczbę wyrosłych kolonii bakterii po całonocnej hodowli w temperaturze 37°C.

3.5. Metody stosowane w pracy z białkami

3.5.1. Oznaczanie białka z użyciem zestawu „Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit”

Do próbki białka o całkowitej objętości 20 μ l dodawano 160 μ l zmieszanych ze sobą w stosunku 1:50 (v/v) roztworów siarczanu miedzi i kwasu bicynchoninowego (dostarczonych przez producenta). W celu wywołania reakcji barwnej, tak przygotowane próbki inkubowano w temperaturze 37°C przez okres 30 minut. Absorbancję mierzono wobec próbki kontrolnej przy długości fali 562 nm. Krzywą standardową wyznaczano wykorzystując następujące stężenia BSA: 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 i 0,5 mg/ml.

3.5.2. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS (SDS-PAGE) (wg Laemmli, 1970)

Skład 12% żelu rozdzielającego (całkowita objętość 5 ml)

Składnik	Objętość [ml]
H ₂ O	1,6
30% mieszanina akrylamidu i bisakrylamidu	2,0
1,5 M Tris pH 8,8	1,3
10% SDS	0,05
10% nadsiarczan amonu	0,05
TEMED	0,002

Skład żelu zagęszczającego (całkowita objętość 2 ml)

Składnik	Objętość [ml]
H ₂ O	1,4
30% mieszanina akrylamidu i bisakrylamidu	0,33
1,0 M Tris pH 6,8	0,25

10% SDS	0,02
10% nadsiarczan amonu	0,02
TEMED	0,002

Do poszczególnych studzienek żelu zagęszczającego наносzono próbki zawierające 20 µg białka, które do końcowej objętości 20 µl rozcieńczono buforem „próbkowym” (**rozdział 3.1.5**). Białka przed rozdziałem denaturowano termicznie, pozostawiając próbki przez 5 minut w temperaturze 95°C. Rozdział elektroforetyczny prowadzony był przy stałym napięciu 80 V, w buforze do elektroforezy SDS-PAGE (**rozdział 3.1.5**). Elektroforezę prowadzono do momentu, kiedy barwny prążek odpowiadający błękitowi bromofenolowemu obecnemu w buforze „próbkowym” migrował na wysokość dolnej krawędzi żelu.

3.5.3. Barwienie białek w żelu poliakrylamidowym za pomocą błękitu brylantowego „Coomassie Brilliant Blue R-250”

W celu wykrycia prążków białek rozdzielonych za pomocą SDS-PAGE, żel poliakrylamidowy pozostawiano w roztworze błękitu brylantowego „Coomassie Brilliant Blue R-250” (**rozdział 3.1.5**) przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Niezwiązany z białkami barwnik usuwano przez pozostawienie żelu w roztworze odbarwiającym (**rozdział 3.1.5**) do czasu uwidocznienia prążków.

3.5.4. Barwienie białek w żelu poliakrylamidowym za pomocą azotanu srebra

W celu wybarwienia prążków białka za pomocą azotanu srebra po ich rozdziale elektroforetycznym (**rozdz. 3.5.2**), żel poliakrylamidowy: (1) pozostawiano w roztworze 50% metanolu, 12% kwasu octowego, 0,02% paraformaldehydu w ddH₂O przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej, (2) płukano przez 10 minut 50% etanolem, a następnie 30%

etanolem, (3) przetrzymywano przez 1 minutę w 0,1% roztworze $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ w ddH_2O i (4) płukano 3-krotnie przez 20 sekund w ddH_2O . Tak przygotowany żel poliakryloamidowy traktowano 0,1% AgNO_3 z dodatkiem 0,025% paraformaldehydu przez 20 minut i płukano 3-krotnie przez 20 sekund w ddH_2O . Ostatecznie, żel traktowano 6% Na_2CO_3 z dodatkiem 0,025% paraformaldehydu i 0,1% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ do momentu uwidocznienia się prążków białek (zwykle kilka minut). Reakcję barwną hamowano poprzez dodanie 5% kwasu octowego.

3.5.5. Western blotting

Po przeprowadzonej elektroforezie SDS-PAGE, białka przenoszono na błonę nitrocelulozową (0,45 μm , GE Healthcare Life Sciences) w aparacie do elektrotroblotingu i buforze do transferu (**rozdział 3.1.5**), przy natężeniu prądu 350 mA, przez 90 minut. Po tym czasie taką nitrocelulozę pozostawiano w 5% roztworze BSA w buforze PBST (**rozdział 3.1.5**) przez okres 1 godziny, w temperaturze pokojowej. Następnie membranę płukano 3-krotnie PBST, za każdym razem przez 10 minut. Białka przeniesione na błonę nitrocelulozową wykrywano za pomocą swoistych przeciwciał (**rozdział 3.1.4**), rozcieńczanych odpowiednio buforem PBST z dodatkiem 2% BSA. Inkubację białek związanych z membraną z takimi pierwszorzędowymi przeciwciałami prowadzono przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Następnie nitrocelulozę płukano ponownie PBST jak wyżej i inkubowano z drugorzędowymi przeciwciałami (**rozdział 3.1.4**) (rozcieńczonymi odpowiednio PBST) przez okres 1 godziny w temperaturze pokojowej. Teraz membranę płukano najpierw 3-krotnie PBST jak wyżej, a następnie 5-krotnie mieszaniną gotowych odczynników wchodzących w skład zestawu Bio-Rad Clarity™ Western ECL, wykorzystując do wykrywania związanych przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z HRP zjawisko chemiluminescencji i jako substrat luminol. Do roztworu substratu dołączony jest roztwór

tw. „wzmacniacza” zwiększającego trwałość i intensywność emitowanego światła. Pomiar chemiluminescencji prowadzono w aparacie ChemiDoc XRS+ (**rozdział 3.1.15**).

3.5.6. Otrzymywanie rekombinowanego białka YidR

W celu ekspresji białka YidR, konstruktem genowym pET-22b(+)*yidR* (**rozdział 3.1.10**) transformowano, metodą szoku cieplnego (**rozdział 3.2.8**), bakterie *E. coli* szczepu Lemo21(DE3) (**rozdział 3.1.11**), które wysiewano następnie na płytkę Petriego z pożywką LB zestaloną agarem z dodatkiem ampicyliny (100 µg/ml) oraz chloramfenikolu (25 µg/ml). Następnego dnia z takiej płytki pobierano pojedyncze kolonie bakterii, którymi zaszczepiano 5 ml pożywki LB z dodatkiem chloramfenikolu (25 µg/ml). Hodowlę prowadzono przez noc w temperaturze 37°C przy ciągłym wytrząsaniu i kolejnego dnia z takiej hodowli pobierano tyle zawiesiny bakterii, aby po uzupełnieniu objętości do 5 ml pożywką LB, gęstość optyczna zawiesiny OD₆₀₀ wyniosła 0,05. Hodowlę bakterii kontynuowano do uzyskania przez nią gęstości optycznej OD₆₀₀=0,4. Ekspresję rekombinowanego białka YidR uzyskiwano przez dodanie do takiej kultury bakterii IPTG, aby jego końcowe stężenie wyniosło 0,5 mM, i hodowlę kontynuowano w temperaturze 37°C przez kolejne 4 godziny. Po tym czasie z takiej kultury pobierano 1 ml zawiesiny bakterii, które wirowano, a uzyskany osad bakterii zawieszano w 150 µl buforu do lizy z dodatkiem mocznika (**rozdział 3.1.5**). Jako kontrolę poziomu indukcji rekombinowanego białka wykorzystywano hodowle bakterii prowadzone w tych samych warunkach, ale bez dodatku IPTG.

W oparciu o powyższy protokół, w celu otrzymania większych ilości rekombinowanego białka YidR, hodowlę *E. coli* szczepu Lemo21(DE3) z konstruktem genowym pET-22b(+)*yidR* prowadzono ostatecznie w 300 ml pożywki LB. Do oczyszczania rekombinowanego białka YidR, ze względu na obecność metki, HisTag wykorzystywano chromatografię powinowactwa na złożu Ni²⁺-NTA-agarozu. W tym celu, lizaty bakteryjne

wirowano (10 000 x g, 10 minut, temperatura 4°C), a otrzymane supernatanty nanoszono na kolumnę ze złożem Ni²⁺-NTA-agarozą o objętości 1 ml, uprzednio zrównoważonym buforem do lizy z mocznikiem. Aby usunąć niespecyficzne białka kolumnę przemywano 30 ml buforu do płukania złoża (**rozdział 3.1.5**). Następnie, w celu usunięcia związanego ze złożem białka YidR, kolumnę przemywano 10 ml buforu do elucji z dodatkiem 200 mM imidazolu (**rozdział 3.1.5**), zbierając 1 ml frakcje. Zebrane frakcje łączono i tak uzyskany preparat rekombinowanego białka YidR zagęszczano poprzez wirowanie (2500 x g) w probówkach z błoną półprzepuszczalną o wielkości porów 10 kDa (Amicon Ultra-15 Filter - Millipore) przez 10 minut, w temperaturze 4°C, do uzyskania końcowej objętości 250 µl. Czystość tak uzyskanego preparatu białka YidR analizowano metodą SDS-PAGE (**rozdział 3.5.2**) i Western blotting (**rozdział 3.5.5**).

3.5.7. Produkcja i oczyszczanie króliczych przeciwciał skierowanych przeciwko białku YidR *S. Enteritidis*

W celu produkcji króliczych surowic odpornościowych zawierających przeciwciała skierowane przeciwko białku YidR *S. Enteritidis* preparaty oczyszczonego rekombinowanego białka YidR (**rozdział 3.5.6**) przesyłano do firmy Davids Biotechnologie GmbH (Regensburg, Niemcy), gdzie przeprowadzono immunizacje zwierząt i wykonano oznaczenia miana przeciwciał metodą ELISA.

Z uzyskanych surowic odpornościowych izolowano frakcję przeciwciał anti-YidR za pomocą chromatografii powinowactwa, wykorzystując złożę agarozowe „Aminolink Plus CouplinResin” [wchodzące w skład zestawu „Aminolink Plus Immobilization Trial Kit” (**rozdział 3.6**)] z przyłączonym kowalencyjnie rekombinowanym białkiem YidR. Immobilizację białka YidR prowadzono zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. W skrócie, oczyszczony preparat białka YidR (około 1 mg) nanoszono na kolumnienkę wypełnioną 2 ml złoża „Aminolink Plus Immobilization Trial Kit”, uprzednio

zrównoważonego 2 ml buforu o pH 10 (dostarczonego przez producenta). Całość pozostawiano przez noc w temperaturze 4°C przy ciągłym mieszaniu. Następnego dnia niezwiązane ze złożem białka usuwano przez wirowanie i złożę przemywano dwukrotnie 2 ml gotowego buforu o pH 7,2 (bufor „wiązący”). Teraz złożę traktowano 2 ml tego samego buforu „wiążącego” z dodatkiem 40 µl 5 M roztworu cyjanoborowodoru sodu w 1 M NaOH w temperaturze 4°C przez całą noc, przy ciągłym mieszaniu. Następnego dnia, po usunięciu buforu „wiążącego” przez kolejne wirowanie (1 min, 1000xg) i ponownym przemyciu 2 ml buforu „wiążącego” z dodatkiem 40 µl roztworu cyjanoborowodoru sodu, złożę ze związanym kowalencyjnie białkiem YidR równoważono 6 ml buforu płuczającego (dostarczonego przez producenta).

W kolejnym etapie, na tak przygotowaną kolumnę nanoszono 3 ml lizatu pałeczek *S. Enteritidis* P125109Δ*yidR* (otrzymanego przez traktowanie bakterii odczynnikiem BugBuster (Millipore) przez 20 min w temperaturze pokojowej, przy delikatnym wytrząsaniu) i pozostawiano przez noc w temperaturze 4°C przy ciągłym mieszaniu. Następnego dnia niezwiązane ze złożem białka bakteryjne usuwano przez wirowanie, a kolumnę przemywano 3-krotnie 2 ml gotowego buforu „przymywającego”. Ostatecznie, w celu izolacji frakcji przeciwciał anti-YidR, na kolumnę nanoszono 10 ml surowicy odpornościowej rozcieńczonej 1-krotnie buforem „wiązącym” i pozostawiano na 2 godziny w temperaturze pokojowej. Po tym czasie, złożę przemywano przez wirowanie 5-krotnie 1 ml buforu „płuczającego”. W celu elucji przeciwciał anti-YidR związanych ze złożem, kolumnę przemywano 3-krotnie 2 ml buforu do elucji, zbierając poszczególne frakcje do probówek zawierających po 100 µl buforu neutralizującego. Próbkę łączono i oznaczano stężenie białka (**rozdział 3.5.1**).

3.6. Analiza statystyczna

Analizy statystyczne wyników wykonano korzystając z programu Statistica (StatSoft Polska). Za różnice znaczące statystycznie, akceptowano wartości poziomu istotności testu t Welcha, gdy $P < 0,05$. W ramach statystyki opisowej obliczono medianę oraz absolutne odchylenie względem mediany.

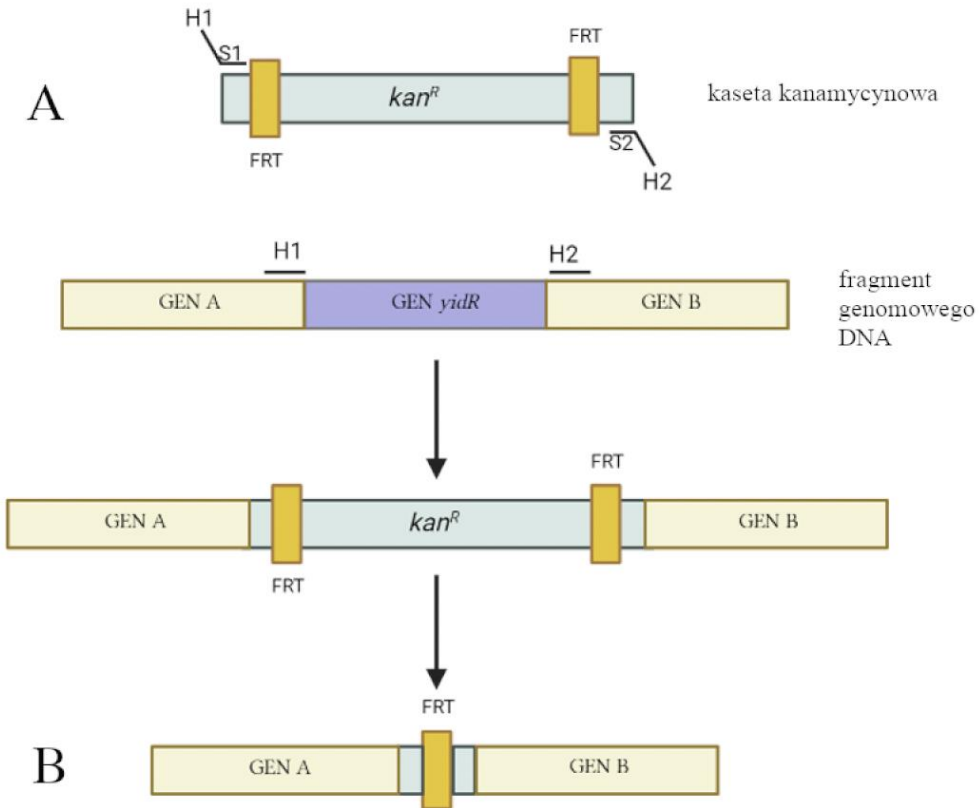
4. Wyniki

4.1. Otrzymanie zmutowanego szczepu *S. Enteritidis* z delecją genu *yidR*

Pracę nad uzyskaniem pałeczek *S. Enteritidis* z delecją genu *yidR* rozpoczęto od wstępnej analizy szczepu *S. Enteritidis* P125109 (**rozdział 3.1.11**) pod kątem jego wrażliwości na ampicylinę, chloramfenikol i kanamycynę. Było to konieczne, ponieważ do konstrukcji mutanta z insercyjną inaktywacją genu *yidR* wykorzystywano wektory plazmidowe: pKD4 z genem oporności na kanamycynę, pKD46 z genem oporności na ampicylinę i pCP20 z genami oporności na ampicylinę i chloramfenikol (**rozdział 3.1.10**). Wykazano, że wykorzystywany w badaniach szczep *S. Enteritidis* P125109 był wrażliwy na każdy z trzech testowanych antybiotyków.

Do utworzenia zmutowanego szczepu *S. Enteritidis* z delecją genu *yidR* wykorzystano metodę opracowaną przez Datsenko i Wannera (2000). Umożliwia ona delecję specyficznych genów w oparciu o homologiczną rekombinację z udziałem rekombinazy λ Red pomiędzy genomowym DNA, a fragmentem liniowego DNA zawierającym marker selekcyjny - gen oporności na antybiotyk, dwa regiony FRT (ang. *Flippase Recognition Target*) rozpoznawane przez flipazę i dwie sekwencje komplementarne do specyficznych sekwencji bakteryjnego DNA. Homologiczna rekombinacja prowadząca do insercyjnej inaktywacji genu *yidR* obejmowała dwa etapy: (1) ekspresję w pałeczkach *S. Enteritidis* P125109 rekombinazy λ Red w wyniku transformacji wektorem pKD46, (2) homologiczną rekombinację pomiędzy genomowym DNA, a liniową kasetą DNA. Prowadzi to do usunięcia (delecji) genu *yidR* z genomu *S. Enteritidis* P125109 i zastąpienie go genem *kan^R* w wyniku transformacji pałeczek *S. Enteritidis* P125109 ekspresjonujących rekombinazę λ Red kasetą DNA obejmującą gen *kan^R*, dwie sekwencje FRT i sekwencje homologiczne do genu *yidR* (kasetę kanamycynową)

(Ryc. 4). Dodatkowym krokiem było usunięcie kasety kanamycynowej z genomu mutantu *S. Enteritidis* P125109 z delecją genu *yidR* poprzez transformację bakterii plazmidem pCP20.

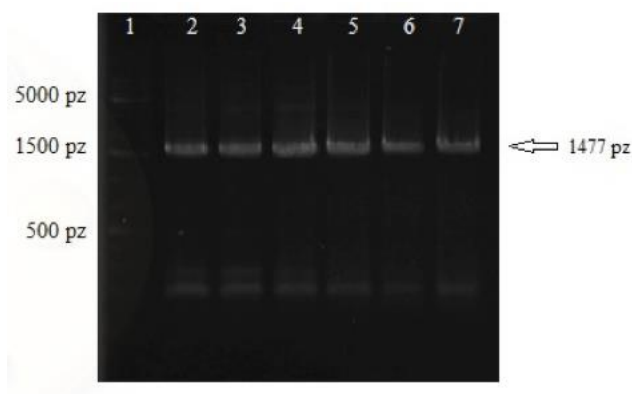


Rycina 4. Otrzymanie mutantu *S. Enteritidis* P125109 Δ *yidR* z delecją genu *yidR* (wg Datsenko i Wanner, 2000). (A) Homologiczna rekombinacja pomiędzy genomowym DNA, a kasetą kanamycynową; (B) usunięcie kasety kanamycynowej i pozostawienie „blizny”; FRT – regiony rozpoznawane przez flipazę; gen A – gen poprzedzający docelowy gen *yidR*; gen B – gen następujący po docelowym genie *yidR*; H1/H2 – regiony homologiczne; S1/S2 – miejsca przyłączenia się starterów.

4.1.1. Otrzymanie kasety DNA *yidR::kan* w celu insercyjnej inaktywacji genu *yidR* pałeczek *S. Enteritidis*

Do otrzymania fragmentu DNA zawierającego gen *kan^R* (kasetka kanamycynowa) posłużono się reakcją PCR, wykorzystując jako matrycę wektor plazmidowy pKD4 (rozdział 3.1.10) oraz parę starterów: *yidR_del_for* i *yidR_del_rev* (rozdział 3.1.9). W tak uzyskanej kasecie DNA, gen antybiotykooporności flankowany jest przez miejsca FRT, które umożliwiają jego usunięcie po udanej rekombinacji przy udziale flipazy. Optymalną temperaturę hybrydyzacji starterów z matrycą DNA określano za pomocą reakcji PCR w

gradientie temperatury 57°C - 62°C (**Ryc. 5**), uzyskując najwyższy poziom amplifikacji DNA przy temperaturze „annealingu” 59°C. Zamplifikowaną kasetę kanamycynową o długości 1477 pz warunkującą oporność na kanamycynę nazwano *yidR::kan*.

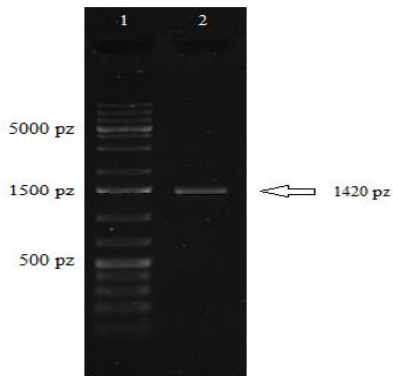


Rycina 5. Otrzymanie kasety DNA *yidR::kan* z genem *kan^R* warunkującym oporności na kanamycynę. Elektroforeza w żelu agarozowym produktów reakcji PCR w gradientie temperatury 57°C – 62°C, w której wykorzystano jako matrycę plazmid pKD4 oraz parę starterów: *yidR_del_for* *yidR_del_rev*. **Ścieżka 1** – standard DNA GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, **ścieżka 2** – temperatura hybrydyzacji 57°C, **ścieżka 3** – temperatura hybrydyzacji 58°C, **ścieżka 4** - temperatura hybrydyzacji 59°C, **ścieżka 5** – temperatura hybrydyzacji 60°C, **ścieżka 6** – 61°C, **ścieżka 7** – temperatura hybrydyzacji 62 °C.

4.1.2. Insercyjna inaktywacja genu *yidR* pałeczek *S. Enteritidis*

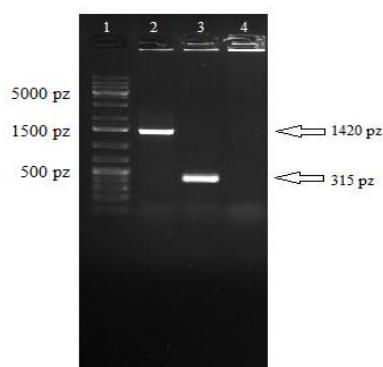
Aby uzyskać zmutowany szczep z delecją genu *yidR* pałeczki *S. Enteritidis* P125109 poddawano elektroporacji (**rozdział 3.2.8**) w celu wprowadzenia do nich wektora pKD46 zawierającego geny faga λ (**rozdział 3.1.10**). Następnie bakterie hodowano do osiągnięcia $OD_{600} = 0,2$, kontynuując hodowlę przez kolejnych 45 minut w obecności L-arabinozy o stężeniu końcowym 5 mM celem indukcji ekspresji genów faga λ odpowiedzialnych za homologiczną rekombinację z udziałem kasety DNA *yidR::kan*, którą wprowadzano do bakterii za pomocą kolejnej elektroporacji. Tak stransformowane bakterie wysiewano na płytki Petriego z zestaloną agarą pożywką LB z dodatkiem ampicyliny w stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$. Wyrosłe na podłożu z antybiotykiem kolonie pałeczek *S. Enteritidis* analizowano następnie, w celu potwierdzenia obecności kasety *yidR::kan*, metodą PCR dla pojedynczej

kolonii bakteryjnej (**rozdział 3.2.4**), wykorzystując parę starterów: *yidR100UpstreamFor* i *yidR100Downstream-Rev* (**rozdział 3.1.9**) (**Ryc. 6**). Spośród dziewięciu przebadanych w ten sposób kolonii, 7 wykazało obecność kasety kanamycynowej.



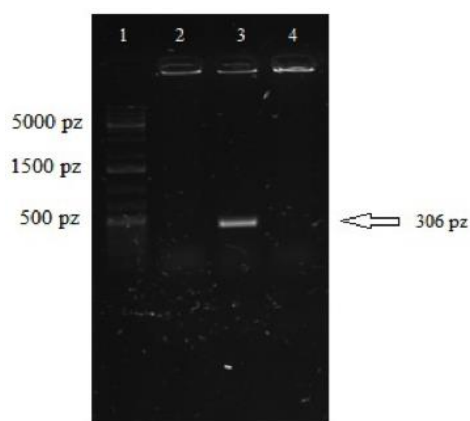
Rycina 6. Elektroforeza w żelu agarozowym fragmentu DNA będącego produktem reakcji PCR z genomowym DNA izolowanym z pałeczek *S. Enteritidis* P125109 po homologicznej rekombinacji z udziałem kasety *yidR::kan* jako matrycy i starterami *yidR100UpstreamFor* i *yidR100DownstreamRev*. **Ścieżka 1** - standard DNA GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, **ścieżka 2** - produkt reakcji PCR.

W kolejnym kroku, aby potwierdzić prawidłowy przebieg homologicznej rekombinacji, czyli zastąpienia kasetą *yidR::kan* sekwencji genu *yidR*, dla tych kolonii bakterii, w których stwierdzono obecność kasety „kanamycynowej” przeprowadzono reakcję PCR z genomowym DNA i trzema parami starterów. I tak, dzięki dwóm parom starterów: *yidR100UpstreamFor* i *yidR100DownstreamRev* oraz *yidR100UpstreamFor* i *k1* potwierdzono obecność kasety *yidR::kan* w locus genu *yidR*, o czym świadczyła obecność, odpowiednio, fragmentu DNA o wielkości 1420 pz i 315 pz (**Ryc. 7**). Natomiast, dzięki parze starterów: *yidR100UpstreamFor* i *yidRinternalRev* wykluczono obecność genu *yidR* w tym locus, o czym świadczył brak produktu PCR. Spośród siedmiu przebadanych w ten sposób kolonii pałeczek *S. Enteritidis* P125109, w których stwierdzono obecność kasety *yidR::kan*, jedynie w jednej potwierdzono zajście prawidłowej rekombinacji homologicznej. Kolonia ta, nazwana P125109 Δ *yidR*, została wykorzystana w dalszych badaniach.



Rycina 7. Elektroforeza w żelu agarozowym fragmentów DNA będących produktami reakcji PCR na matrycy genomowego DNA izolowanego z pałeczek *S. Enteritidis* P125109 z delecją genu *yidR* (mutant P125109 Δ *yidR*). **Ścieżka 1** - standard DNA GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, **ścieżka 2** – produkt reakcji PCR ze starterami: *yidR100UpstreamFor* i *yidR100DownstreamRev*, **ścieżka 3** – produkt reakcji PCR ze starterami *yidR100UpstreamFor* i *k1*; **ścieżka 4** – brak produktu reakcji PCR ze starterami *yidR_*UpstreamFor i *yidR*internalRev.

W kolejnym etapie, mutant delecyjny P125109 Δ *yidR* poddawany był transformacji za pomocą plazmidu pCP20 (**rozdział 3.1.10**) w celu usunięcia kasety *yidR::kan*. Po elektroporacji i wysianiu bakterii na płytce Petriego z podłożem LB zestalonym agarem z dodatkiem ampicyliny i chloramfenikolu, pojedyncze kolonie analizowano za pomocą reakcji PCR dla pojedynczej kolonii bakterii pod kątem obecności kasety kanamycynowej, wykorzystując powtórnie 3 pary starterów opisane powyżej. Brak kasety *yidR::kan* w pałeczkach *S. Enteritidis* P125109 Δ *yidR* potwierdziła obecność produktu PCR o długości 306 pz, kiedy w reakcji wykorzystano parę starterów *yidR100UpstreamFor* i *yidR100DownstreamRev* (**rozdział 3.1.9**) i brak produktów PCR, kiedy w reakcji PCR stosowano dwie pozostałe pary starterów (**Ryc. 8**).



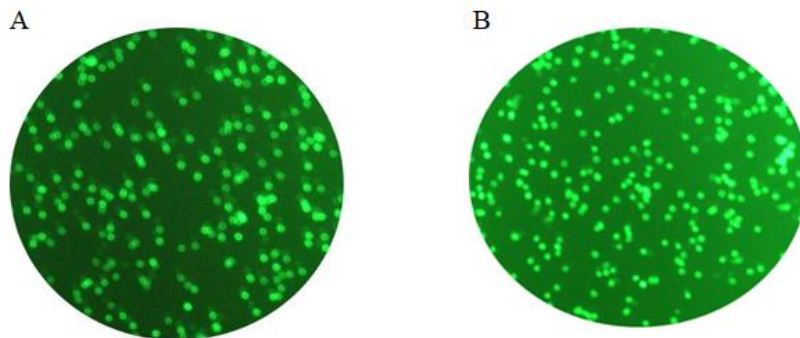
Rycina 8. Elektroforeza w żelu agarozowym fragmentów DNA będących produktami reakcji PCR na matrycy genomowego DNA izolowanego z pałeczek *S. Enteritidis* P125109 Δ *yidR*. **Ścieżka 1** - standard DNA GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, **ścieżka 2** – brak produktu reakcji PCR z parą starterów *yidR100UpstreamFor* i *yidRinternalRev*, **ścieżka 3** - produkt reakcji PCR z parą starterów *yidR100UpstreamFor* i *yidR100DownstreamRev*, **ścieżka 4** – brak produktu reakcji PCR ze starterami *yidR100UpstreamFor* i *k1*.

4.2. Charakterystyka mutantu P125109 Δ *yidR* z delecją genu *yidR* pod kątem morfologii, zdolności agregacyjnych i wzrostu

4.2.1. Morfologia i agregacja

Wprowadzenie do genomu bakterii mutacji delecyjnej poprzez homologiczną rekombinację może prowadzić do pojawienia się dodatkowych mutacji i zmian typu *off-target*, co skutkuje niepożądanymi zmianami we właściwościach takich bakterii w porównaniu ze szczepem macierzystym. Biorąc pod uwagę dotychczasowe informacje dotyczące roli biologicznej produktu genu *yidR* założono, że delecja tego genu nie powinna mieć wpływu na morfologię, właściwości agregacyjne i wzrost otrzymanego mutantu P125109 Δ *yidR*. Stąd, aby sprawdzić, czy delecji genu *yidR* nie towarzyszą dodatkowe zmiany w genotypie wpływające na te właściwości, porównywano go z macierzystym szczepem *S. Enteritidis* P125109. Wykorzystując mikroskop fluorescencyjny (**rozdział 3.1.15**) i barwienie bakterii oranżem akrydyny (**rozdział 3.1.1**) wykazano, że delecja genu *yidR* nie wpływa zarówno na wygląd/morfologię mutantu P125109 Δ *yidR*, jak i jego właściwości agregacyjne w

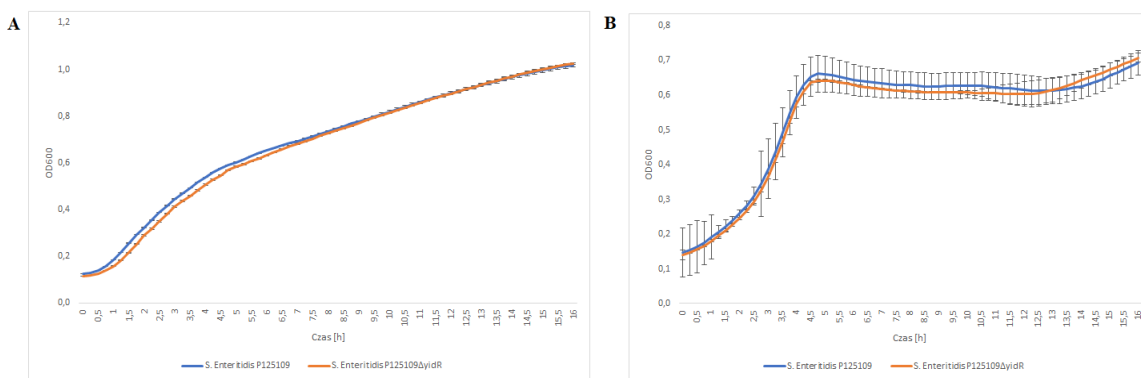
porównaniu ze szczepem wyjściowym *S. Enteritidis* P125109, który w niniejszej pracy nazywano dalej szczepem typu dzikiego (**Ryc. 9**).



Rycina 9. Zdjęcie spod mikroskopu fluorescencyjnego pałeczek *S. Enteritidis* reprezentujących (**A**) szczep wyjściowy P125109 (szczep typu dzikiego) i (**B**) szczep zmutowany P125109 Δ *yidR* z delecją genu *yidR*. Bakterie barwiono oranżem akrydyny. Powiększenie 40x

4.2.2. Krzywe wzrostu

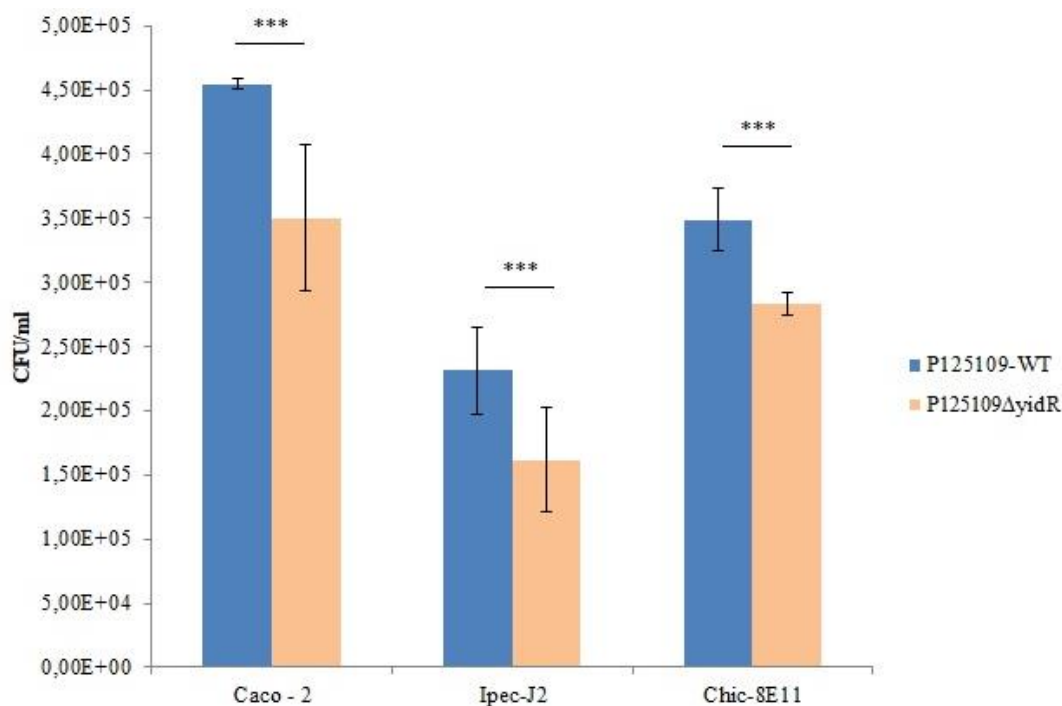
W celu sprawdzenia, czy delecji genu *yidR* nie towarzyszą zmiany w tempie wzrostu bakterii wyznaczano krzywe wzrostu (**rozdział 3.3.2**), hodując pałeczki *S. Enteritidis* typu dzikiego i mutantu P125109 Δ *yidR* zarówno w pożywce LB jak i w pożywce „infekcyjnej” (**rozdział 3.1.14**) wykorzystywanej w testach adhezji i inwazji. Uzyskane wyniki pokazały, że delecja genu *yidR* nie wpływa na potencjał proliferacyjny mutantu P125109 Δ *yidR*, ponieważ nie zaobserwowano zmian w szybkościach wzrostu pomiędzy szczepem typu dzikiego, a szczepem z delecją genu *yidR* (**Ryc. 10**).



Rycina 10. Krzywe wzrostu pałeczek *S. Enteritidis* P125109 typu dzikiego i mutantu P125109Δ*yidR* hodowanych w (A) pożywce LB i (B) pożywce „infekcyjnej”. Krzywe reprezentują uśrednione wyniki z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych.

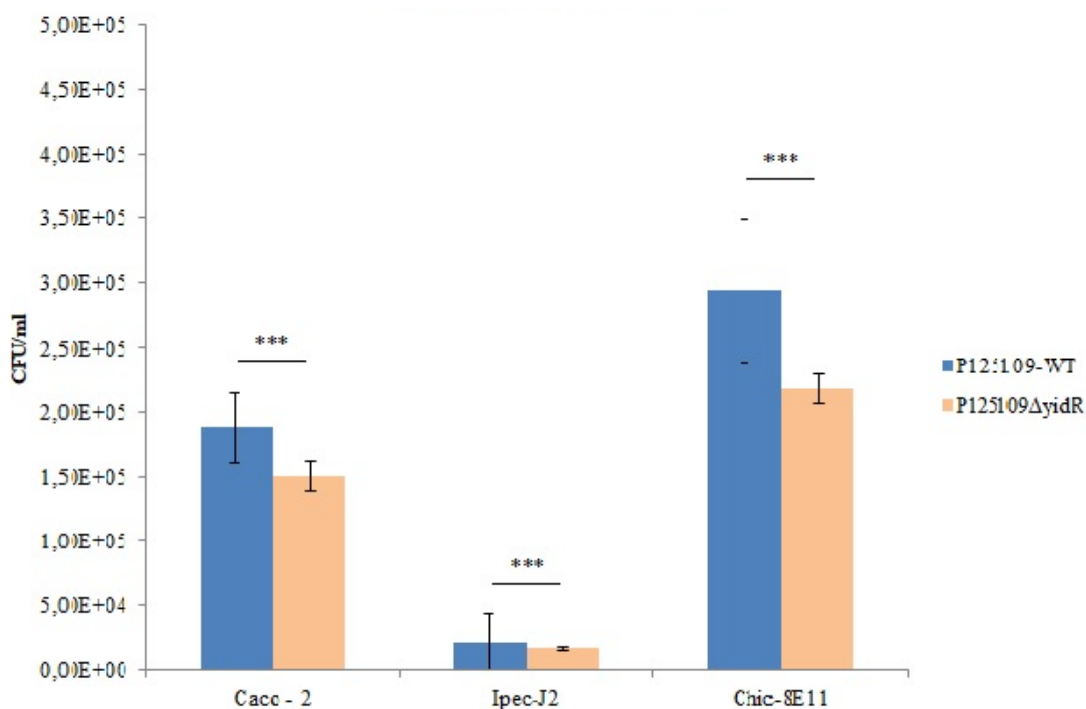
4.3. Adhezja do i inwazyjność pałeczek *S. Enteritidis* typu dzikiego i mutantu P125109Δ*yidR* względem komórek wywodzących się z nabłonka jelitowego

W badaniach nad rolą genu *yidR* w adhezji do i inwazyjności pałeczek *S. Enteritidis* względem komórek nabłonka jelitowego wykorzystano mutantu P125109Δ*yidR* z delecją genu *yidR*. Do testów adhezyjnych i inwazyjnych, jako komórki wywodzące się z nabłonka układu pokarmowego wybrano komórki Ipec-J2 świni (rozdział 3.1.13), kurcze komórki Chic-8E11 (rozdział 3.1.13) i ludzkie komórki Caco-2 (rozdział 3.1.13). Wykazano, że delecja genu *yidR* prowadzi do statystycznie istotnego obniżenia adhezji pałeczek *S. Enteritidis* do komórek każdej z linii niezależnie od jej gatunkowego pochodzenia (Ryc. 11). Największa liczba bakterii wiązała się do ludzkich komórek Caco-2 i w przypadku adhezji pałeczek *S. Enteritidis* P125109 odpowiadała ona $4,5 \times 10^5$ CFU/ml, natomiast w przypadku pałeczek *S. Enteritidis* z delecją genu *yidR* była istotnie niższa i wynosiła $3,5 \times 10^5$ CFU/ml. Prawie dwukrotnie niższa liczba pałeczek *S. Enteritidis* wiązała się do komórek Ipec-J2 świni. W przypadku szczepu dzikiego P125109 odpowiadała ona $2,3 \times 10^5$ CFU/ml, a szczepu P125109Δ*yidR* - $1,6 \times 10^5$ CFU/ml. Wreszcie, jeżeli chodzi o adhezję do kurzych komórek Chic-8E11, to dla szczepu dzikiego liczba CFU wynosiła $3,5 \times 10^5$ /ml, a dla szczepu z delecją genu *yidR* - $3,0 \times 10^5$ CFU/ml.



Rycina 11. Adhezja pałeczek *S. Enteritidis* P125109 typu dzikiego (WT) i mutantu P125109Δ*yidR* z delecją genu *yidR* do ludzkich komórek Caco-2, świńskich komórek Ipec-J2 i kurzych komórek Chic-8E11. Prezentowana liczba CFU/ml jest sumą bakterii, które związały się do powierzchni komórek eukariotycznych i tych bakterii, które wniknęły do ich wnętrza. Symbol * oznacza różnicę istotną statystycznie na poziomie $p < 0,05$; symbol ** oznacza różnicę na poziomie $p < 0,01$; symbol *** oznacza różnicę na poziomie $p < 0,001$. Testy przeprowadzono w trzech niezależnych powtórzeniach biologicznych.

Nieobecność genu *yidR* powodowała również statystycznie istotne obniżenie inwazyjności pałeczek *S. Enteritidis* wobec każdej z badanych linii komórkowych (**Ryc. 12**). Z tym, że najwyższą inwazyjność obserwowano w przypadku kurzych komórek Chic-8E11. Liczba pałeczek *S. Enteritidis* P125109, które wniknęła do ich wnętrza odpowiadała $3,0 \times 10^5$ CFU/ml, zaś pałeczek szczepu z delecją genu *yidR* - $2,2 \times 10^5$ CFU/ml. W przypadku komórek Caco-2, liczba pałeczek *S. Enteritidis* szczepu dzikiego, które wniknęła do wnętrza komórek odpowiadała $1,9 \times 10^5$ CFU/ml, a szczepu z delecją genu *yidR* - $1,5 \times 10^5$ CFU/ml. Pałeczki *S. Enteritidis*, podobnie jak w przypadku adhezji, najmniej inwazyjne były wobec komórek Ipec-J2. Liczby CFU/ml wynosiły, odpowiednio, $2,0 \times 10^4$ dla szczepu dzikiego i $1,0 \times 10^4$ CFU/ml dla szczepu z delecją genu *yidR* (**Ryc. 12**).



Rycina 12. Inwazja pałeczek *S. Enteritidis* P125109 typu dzikiego i mutantu P125109Δ*yidR* z delecją genu *yidR* wobec ludzkich komórek Caco-2, świńskich komórek Ipec-J2 i kurzych komórek Chic-8E11. Prezentowana liczba CFU/ml odpowiada liczbie bakterii, które wniknęły do wnętrza komórek eukariotycznych. Symbol * oznacza różnicę istotną statystycznie na poziomie $p < 0,05$; symbol ** oznacza różnicę na poziomie $p < 0,01$; symbol *** oznacza różnicę na poziomie $p < 0,001$. Testy przeprowadzono w trzech niezależnych powtórzeniach biologicznych.

4.4. Ekspresja genów kodujących wybrane białka fimbrii typu 1 i T3SS-1 w pałeczkach *S. Enteritidis* P125109 typu dzikiego i mutancie P125109Δ*yidR*

W celu sprawdzenia, czy białko YidR wpływa na ekspresję genów kluczowych dla adhezji i inwazji pałeczek *S. Enteritidis*, analizowano ekspresję genów *fimA* i *sicA* w pałeczkach *S. Enteritidis* P125109 typu dzikiego i mutancie P125109Δ*yidR*. Geny *fimA* i *sicA* kodują, odpowiednio, białko FimA stanowiące główne białko strukturalne fimbrii typu 1 i białko SicA systemu sekrecji typu III, którego geny zlokalizowane są w obrębie SPI-1 (T3SS-1). Kröger i wsp. (2013) przeanalizowali dane dotyczące globalnej ekspresji genów oparte na RNA w warunkach istotnych z punktu widzenia infekcji i stworzyli mapę ekspresji wszystkich wysp patogenności *S. Typhimurium*, wskazując odmienne profile ekspresji w różnych warunkach środowiskowych. Jednym z prezentowanych genów był gen *sicA*, który

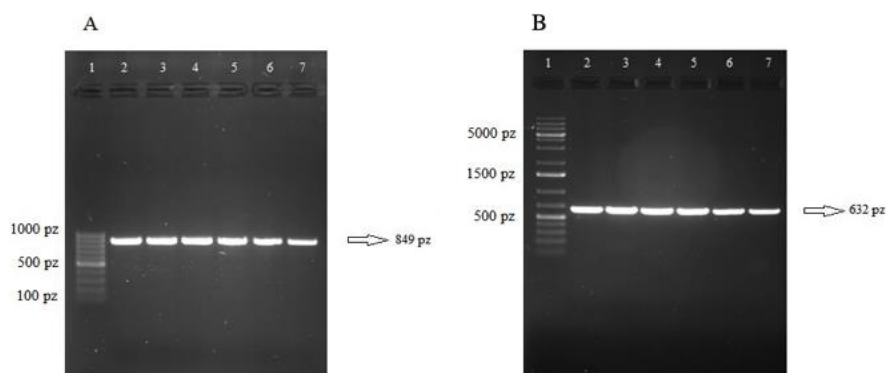
został wybrany do poniższych badań, również z tych powodów, że jego ekspresja jest wykładnikiem poziomu ekspresji innych genów kodowanych przez SPI-1 (Kröger i wsp., 2013; Lou i wsp., 2019). Co ważne, warunki hodowli pałeczek *S. Enteritidis* *in vitro*, w których dochodzi do optymalnej ekspresji *fimA* i *sicA* są powszechnie znane (Kuźmińska-Bajor i wsp., 2012; Kröger i wsp., 2013).

W celu uzyskania optymalnego poziomu ekspresji genu *fimA* na poziomie białka, pałeczki *S. Enteritidis* hodowano w pożywce LB w warunkach statycznych przez 24 godziny, powtarzając ten etap określony jako pasaż pierwszy, jeszcze 3-krotnie (Kuźmińska-Bajor i wsp., 2012). Natomiast, dla indukcji ekspresji genu *sicA*, szczepy *S. Enteritidis* hodowano w pożywce LB do osiągnięcia przez kulturę bakteryjną późnej fazy stacjonarnej (**rozdział 4.4.2**) (Kröger i wsp., 2013). Ekspresję genów analizowano w dwojaki sposób. Najpierw, różnice w poziomie ekspresji wykrywano w sposób bezpośredni, czyli na poziomie białka, które wykrywano w lizatach bakteryjnych za pomocą elektroforezy SDS-PAGE (**rozdział 3.5.2**) i metody Western blotting (**rozdział 3.5.5**). Następnie pośrednio, poprzez określenie aktywności promotorów analizowanych genów przy pomocy systemu reporterowego wykorzystującego wektor pQF50/GFP zawierający gen białka GFP, którego poziom ekspresji pozostaje pod kontrolę analizowanego promotora (McKelvie i wsp., 2004). Ze względu na obecność białka GFP ten system reporterowy opiera się na pomiarach intensywności fluorescencji emitowanej przez to białko.

4.4.1. Klonowanie promotorów wraz z genami *fimA* i *sicA* do plazmidu pFPV25.1GFPmut3Kan_2xHA

Do klonowania fragmentów DNA obejmujących zarówno sekwencje promotorów jak i genów *fimA* i *sicA* wykorzystano reakcję PCR (**rozdział 3.2.6**), w której jako matrycę wykorzystano genomowe DNA *S. Typhimurium* szczepu SL1344 oraz następujące pary starterów: dla genu *fimA* i jego promotora - *fimA*::2xHASacFor i *fimA*::2xHABglRev oraz

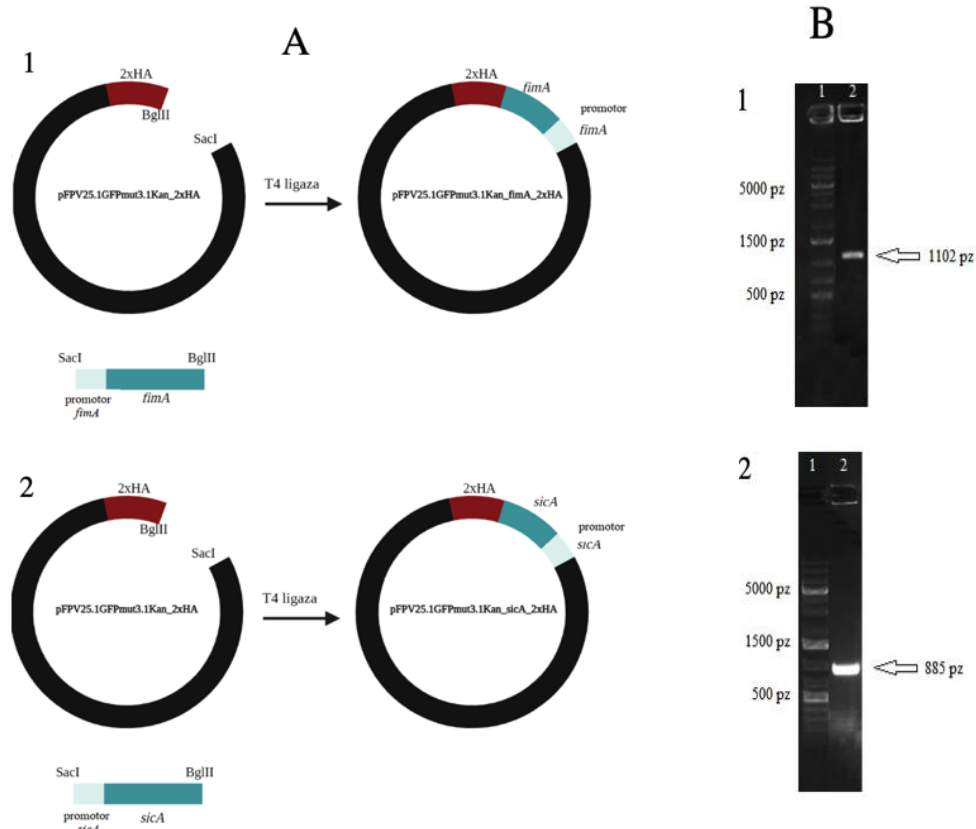
dla genu *sicA* i jego promotora - *sicA*::2xHASacFor i *sicA*::2xHABglRev (**rozdział 3.1.9**). W celu ustalenia optymalnej temperatury hybrydyzacji starterów z matrycą posłużono się reakcją PCR w gradiencie temperatur 52°C - 62°C (**rozdział 3.2.2**). W przypadku promotora i genu *fimA* optymalne okazało się przyłączanie starterów w temperaturze 54°C, z kolei w przypadku promotora i genu *sicA* najwięcej produktu PCR uzyskano przy przyłączaniu starterów w temperaturze 60°C. W ten sposób otrzymano sekwencje promotora i genu *fimA* o długości 849 pz oraz promotora i genu *sicA* o długości 632 pz (**Ryc. 13**).



Rycina 13. Elektroforeza w żelu agarozowym fragmentów DNA stanowiących (**A**) sekwencję genu *fimA* wraz z jego promotorem i (**B**) genu *sicA* wraz z jego promotorem. Sekwencje te otrzymywano w reakcji PCR prowadzonej w gradiencie temperatury 52°C - 62 °C, wykorzystując jako matrycę genomowe DNA *S. Typhimurium* SL1344 oraz startery *fimA*::2xHASacFor i *fimA*::2xHABglRev dla promotora i genu *fimA*. i startery *sicA*::2xHASacFor i *sicA*::2xHABglRev dla promotora i genu *sicA*. **Ścieżki 1** - standard DNA GeneRuler 100 bp DNA Ladder (A) lub standard DNA GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (B), **ścieżki 2** – temperatura hybrydyzacji 52°C, **ścieżki 3** – temperatura hybrydyzacji 54°C, **ścieżki 4** – temperatura hybrydyzacji 56°C, **ścieżki 5** – temperatura hybrydyzacji 58°C, **ścieżki 6** – temperatura hybrydyzacji 60°C, **ścieżki 7** – temperatura hybrydyzacji 62°C.

Geny *fimA* i *sicA* wraz z ich promotorami klonowano do wektora pFPV25.1GFPmut3Kan_2xHA (**rozdział 3.1.10**) (**Ryc. 14A1 i A2**) wykorzystując obecność sekwencji flankujących rozpoznawanych przez enzymy ScaI i BglII. Po transformacji „mieszaniną ligacyjną”, antybiotykooporne kolonie bakterii analizowano pod kątem obecności cząsteczek rekombinowanego DNA za pomocą reakcji PCR dla pojedynczej kolonii bakteryjnej (**rozdział 3.2.4**). Wykorzystując parę starterów pFPVforSEQ i pFPVrevSEQ (**rozdział 3.1.9**) w przypadku bakterii transformowanych konstruktem

zawierającym promotor i gen *fimA* otrzymano fragment DNA o długości 1102 pz (**Ryc. 14B1**), a w przypadku bakterii transformowanych konstruktem zawierającym promotor i gen *sicA* otrzymano fragment DNA o długości 885 pz (**Ryc. 14B2**). Oprócz tego, w celu potwierdzenia poprawności klonowania insertu do wektora plazmidowego z pozytywnych klonów bakterii izolowano plazmidowe DNA, które trawiono enzymami *SacI* i *BglII* (analiza restrykcyjna) i ostatecznie fragmenty rekombinowanych cząsteczek DNA obejmujące wprowadzoną kasetę DNA (insert) sekwencjonowano metodą Sangera. Uzyskane konstrukty genowe zawierające geny *fimA* i *sicA* wraz z ich promotorami nazwano, odpowiednio, pFPV25.1GFPmut3.1Kan_ *fimA*_2xHA i pFPV25.1GFPmut3.1Kan_ *sicA*_2xHA.



Rycina 14. (A) Schematy przedstawiające otrzymanie konstruktyw: (1) pFPV25.1GFPmut3.1Kan_ *sicA*_2xHA i (2) pFPV25.1GFPmut3.1Kan_ *fimA*_2xHA na bazie wektora plazmidowego pFPV25.1GFPmut3.1Kan_2xHA i insertu odpowiadającego, odpowiednio, genowi *fimA* wraz z jego promotorem i genowi *sicA* wraz z jego promotorem. (B) Elektroforeza w żelu agarozowym produktów reakcji PCR, w których matrycę stanowiły konstrukty: (1) pFPV25.1GFPmut3.1Kan_ *sicA*_2xHA i (2) pFPV25.1GFPmut3.1Kan_ *fimA*_2xHA oraz para starterów pFPVforSEQ i pFPVrevSEQ. **Ścieżki 1** - standard DNA GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, **ścieżki 2** - produkt reakcji PCR.

4.4.2. Poziomy ekspresji białek FimA i SicA w pałeczkach *S. Enteritidis* typu dzikiego i mutantu P125109 Δ *gidR*

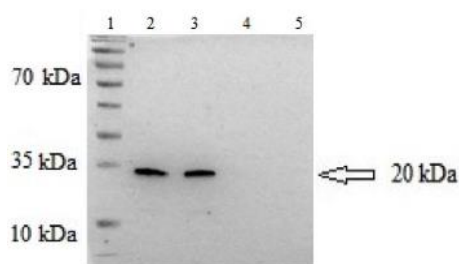
W celu analizy ekspresji genów *fimA* i *sicA* na poziomie białka, pałeczki *S. Enteritidis* P125109 oraz mutantu P125109 Δ *gidR* transformowano wektorami ekspresyjnymi pFPV25.1GFPmut3Kan_*fimA*_2xHA i pFPV25.1GFPmut3Kan_*sicA*_2xHA. W ten sposób uzyskano szczepy *S. Enteritidis*, które nazwano: P125109/pFPV25.1GFPmut3Kan_*fimA*_2xHA w przypadku ekspresji egzogenego białka FimA i P125109/pFPV25.1GFPmut3Kan_*sicA*_2xHA w przypadku ekspresji egzogenego białka SicA. Z kolei, analogiczne szczepy mutantu P125109 Δ *gidR* nazwano P125109 Δ *gidR*/pFPV25.1GFPmut3Kan_*fimA*_2xHA i P125109 Δ *gidR*/pFPV25.1GFPmut3Kan_*sicA*_2xHA. Pałeczki *S. Enteritidis* transformowane samym wektorem nazwano, odpowiednio, P125109/pFPV25.1GFPmut3Kan_2xHA i P125109 Δ *gidR*/pFPV25.1GFPmut3Kan_2xHA. Poziomy ekspresji białek FimA i SicA oznaczano metodą Western blotting.

W celu otrzymania hodowli bakterii z najwyższą ekspresją genu *fimA*, pałeczki *S. Enteritidis* hodowano w warunkach prowadzących do maksymalnej ekspresji fimbrii typu 1. W tym celu, pojedynczą kolonią pałeczek P125109/pFPV25.1GFPmut3Kan_*fimA*_2xHA lub P125109 Δ *gidR*/pFPV25.1GFPmut3Kan_*fimA*_2xHA zaszczepiano 5 ml pożywki LB i po całonocnej hodowli, którą prowadzono bez wytrząsania w temperaturze 37°C, pobierano z niej 0,1 ml zawiesiny bakterii, które przenoszono do kolejnych 5 ml świeżej pożywki LB. Ten etap definiowany jako pasaż pierwszy, powtarzano jeszcze trzykrotnie. Z tak przygotowanych bakterii sporządzano lizaty (**rozdział 3.5.6**), które poddawano rozdzielni elektroforetycznemu w 12% żelu poliakrylamidowym (**rozdział 3.5.2**).

Aby uzyskać bakterie z ekspresją egzogenego białka SicA, pojedynczą kolonią pałeczek P125109/pFPV25.1GFPmut3Kan_*fimA*_2xHA lub P125109 Δ *gidR*/pFPV25.1GFPmut3Kan_*fimA*_2xHA zaszczepiano 1 ml płynnej pożywki LB,

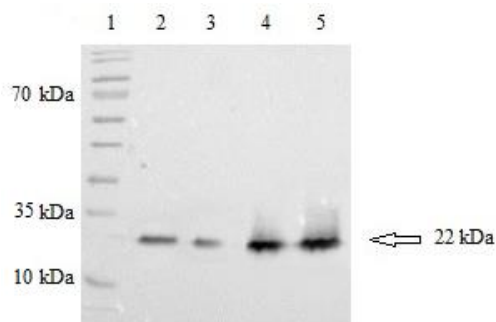
prowadząc hodowle z wytrząsaniem przez 16 godzin w temperaturze 37°C. Ponieważ optymalny poziom ekspresji białka SicA zależy od fazy wzrostu pałeczek *S. Enteritidis* oraz sposobu prowadzenia hodowli (**rozdział 4.5.5**), w kolejnym etapie, całonocne kultury szczepów *S. Enteritidis* typu dzikiego (P125109/pFPV25.1GFPmut3Kan_ SicA_2xHA) lub pałeczek *S. Enteritidis* z delecją genu *yidR* (P125109Δ*yidR*/pFPV25.1GFPmut3Kan_ SicA_2xHA) i ekspresją egzogennego białka SicA, „rozcieńczano” pożywką LB w taki sposób, aby uzyskać OD₆₀₀ = 0,05 i kontynuowano hodowle przez 2 godziny do momentu uzyskania wartości OD₆₀₀ = 0,5 (wczesna faza logarytmiczna) lub przez 4 godziny, czyli do momentu uzyskania wartości OD₆₀₀ = 2,0 (późna faza stacjonarna). Wówczas z takich kultur pobierano, odpowiednio, 1,2 ml i 0,3 ml zawiesin bakterii, z którymi postępowano analogicznie, jak przy analizie ekspresji białka FimA.

Po rozdiale elektroforetycznym, białka FimA i SicA wykrywano metodą Western blotting, wykorzystując, ze względu na obecność w nich metki hemaglutyninowej (2xHA), przeciwciała skierowane przeciwko temu znacznikowi (**rozdz. 3.1.4**). W przypadku ekspresji białka FimA, kiedy bakterie hodowano w warunkach optymalnych dla ekspresji fimbrii typu 1, w lizatach pałeczek *S. Enteritidis* typu dzikiego (P125109/pFPV25.1GFPmut3Kan_ SicA_2xHA) i *S. Enteritidis* z delecją genu *yidR* (P125109Δ*yidR*/pFPV25.1GFPmut3Kan_ SicA_2xHA) nie stwierdzono różnic w poziomie jego ekspresji w analizowanych szczepach (**Ryc. 15**). Zgodnie z oczekiwaniami, nie stwierdzono natomiast obecności białka FimA w lizatach pałeczek *S. Enteritidis*, kiedy hodowano je tylko przez 24 godziny, a więc po pierwszym pasażu.



Rycina 15. Analiza ekspresji białka FimA w lizatach pałeczek *S. Enteritidis* P125109 typu dzikiego (P125109/pFPV25.1GFPmut3Kan_ *fimA*_2xHA) z ekspresją egzogenego białka FimA i pałeczkach P125109Δ*yidR* z delecją genu *yidR* (P125109Δ*yidR*/pFPV25.1GFPmut3Kan_ *fimA*_2xHA) i ekspresją egzogenego białka FimA za pomocą metody Western blotting z użyciem króliczego monoklonalnego przeciwciała IgG skierowanego przeciwko metce hemaglutyninowej. **Ścieżka 1** - standard białek PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, **ścieżka 2** - lizat pałeczek *S. Enteritidis* typu dzikiego hodowanych przez cztery pasaży w warunkach statycznych, **ścieżka 3** - lizat pałeczek *S. Enteritidis* z delecją genu *yidR* hodowanych przez cztery pasaży w warunkach statycznych, **ścieżka 4** - lizat pałeczek *S. Enteritidis* typu dzikiego hodowanych przez 24 godziny (po 1. pasażu), **ścieżka 5** - lizat pałeczek *S. Enteritidis* z delecją genu *yidR* hodowanych przez 24 godziny (po 1. pasażu)

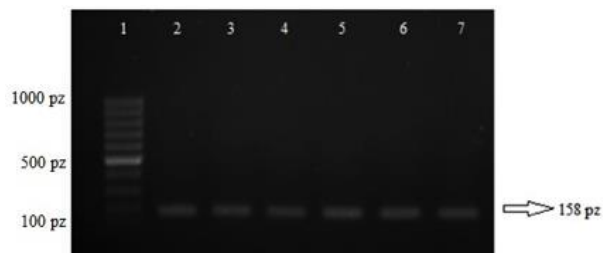
Natomiast, w przypadku białka SicA, kiedy pałeczki *S. Enteritidis* szczepu dzikiego (P125109/pFPV25.1GFPmut3Kan_ *sicA*_2xHA) i mutantu z delecją genu *yidR* P125109Δ*yidR*/pFPV25.1GFPmut3Kan_ *fimA*_2xHA znajdowały się we wczesnej fazie logarytmicznej wyższy poziom ekspresji SicA obserwowano w szczepie rodzicielskim (**Ryc. 16**). Różnice te zanikały, przy równocześnie znacznie nasilonej ekspresji białka SicA, kiedy pałeczki *S. Enteritidis* znajdowały się w późnej fazie stacjonarnej.



Rycina 16. Analiza ekspresji białka SicA w lizatach pałeczek *S. Enteritidis* typu dzikiego (P125109 Δ *yidR*/pFPV25.1GFPmut3Kan_*sicA*_2xHA) z ekspresją egzogenego białka SicA i pałeczkach *S. Enteritidis* z delecją genu *yidR* (P125109/pFPV25.1GFPmut3Kan_*sicA*_2xHA) i ekspresją egzogenego białka SicA za pomocą metody Western blotting z użyciem króliczego, monoklonalnego przeciwciała IgG skierowanego przeciwko metce hemaglutyninowej. **Ścieżka 1** - standard białek PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, **ścieżka 2** - lizat pałeczek *S. Enteritidis* typu dzikiego znajdujących się we wczesnej fazie logarytmicznej ($OD_{600} = 0,5$), **ścieżka 3** - lizat pałeczek *S. Enteritidis* z delecją genu *yidR* znajdujących się we wczesnej fazie logarytmicznej ($OD_{600} = 0,5$), **ścieżka 4** – lizat pałeczek *S. Enteritidis* typu dzikiego znajdujących się w późnej fazie stacjonarnej ($OD_{600} = 2,0$), **ścieżka 5** - lizat pałeczek *S. Enteritidis* z delecją genu *yidR* znajdujących się w późnej fazie stacjonarnej ($OD_{600} = 2,0$)

4.4.3. Klonowanie promotora genu *sicA*

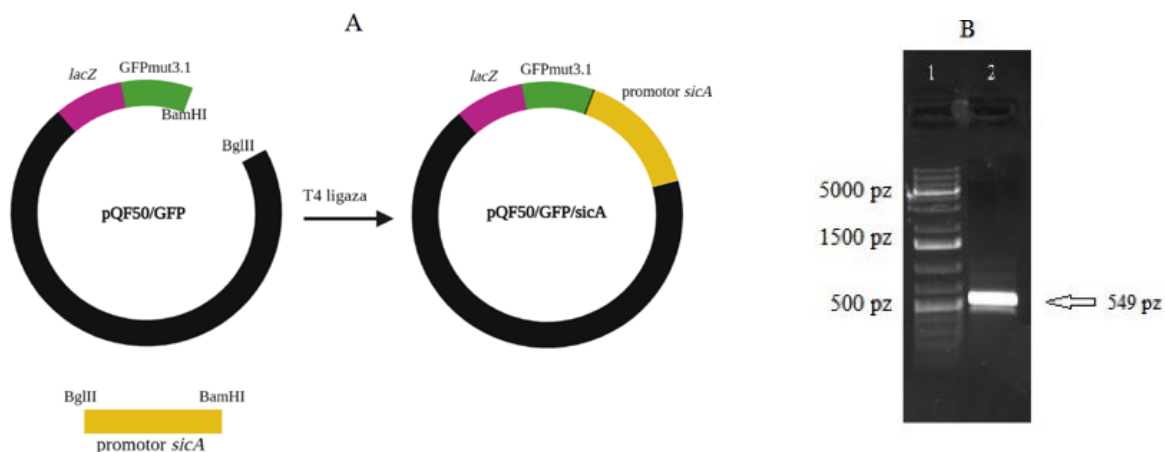
Do klonowania promotora genu *sicA* wykorzystywano reakcję PCR (**rozdział 3.2.6**), w której jako matrycę wykorzystano genomowe DNA *S. Enteritidis* szczepu SL1344 (**rozdział 3.1.11**) oraz następujące pary starterów *sicABglFor* i *sicA2BamRev* (**rozdział 3.1.9**). W celu ustalenia optymalnej temperatury hybrydyzacji starterów posłużono się reakcją PCR w gradiencie temperatur 52°C - 62°C, uzyskując najwięcej produktu w temperaturze 58°C (**Ryc. 17**). W ten sposób otrzymano sekwencję promotorową genu *sicA* o długości 158 pz.



Rycina 17. Elektroforeza w żelu agarozowym fragmentów DNA stanowiących sekwencję promotora genu *sicA*. Sekwencję promotorową uzyskiwano w reakcji PCR prowadzonej w gradiencie temperatury 52°C - 62°C, wykorzystując jako matrycę genomowe DNA *S. Typhimurium* szczepu SL1344 oraz startery *sicABglFor* i *sicA2BamRev*. **Ścieżka 1** - standard DNA GeneRuler 100 bp DNA Ladder, **ścieżka 2** – temperatura hybrydyzacji 52°C, **ścieżka 3** – temperatura hybrydyzacji 54 °C, **ścieżka 4** - temperatura hybrydyzacji 56°C, **ścieżka 5** - temperatura hybrydyzacji 58 °C, **ścieżka 6** - temperatura hybrydyzacji 60°C, **ścieżka 7** - temperatura hybrydyzacji 62°C

4.4.4. Klonowanie promotora genu *sicA* do wektora pQF50/GFP

Stworzenie systemu reporterowego opartego na białku GFP rozpoczęto od klonowania promotora genu *sicA* do wektora pQF50/GFP, wykorzystując obecność przy końcach sekwencji promotorowej miejsc restrykcyjnych dla enzymów BglIII i BamHI (**Ryc. 18A**). „Mieszaninę ligacyjną” wykorzystano do transformacji chemokompetentnych bakterii *E. coli* XL1-Blue (**rozdział 3.1.11**), które w kolejnym kroku wysiewano na płytki Petriego pokryte pożywką LB zestaloną agarem z dodatkiem ampicyliny (100 µg/ml) i hodowano przez 16 godzin w temperaturze 37°C. Kolonie bakterii odporne na działanie antybiotyku analizowano za pomocą reakcji PCR ze starterami pQF50for i pQF50rev (**rozdział 3.1.9**) pod kątem obecności w bakteriach konstruktów zawierającego promotor genu *sicA* (**Ryc. 18B**). Dodatkowo, w celu potwierdzenia poprawności klonowania insertu do wektora plazmidowego, z pozytywnych klonów bakterii izolowano plazmidowe DNA, które trawiono enzymami BamHI i BglIII. Otrzymanemu konstruktowi utworzonemu z sekwencji promotorowej, wklonowanej w wektor pQF50/GFP nadano nazwę pQF50/GFP/*sicA*.

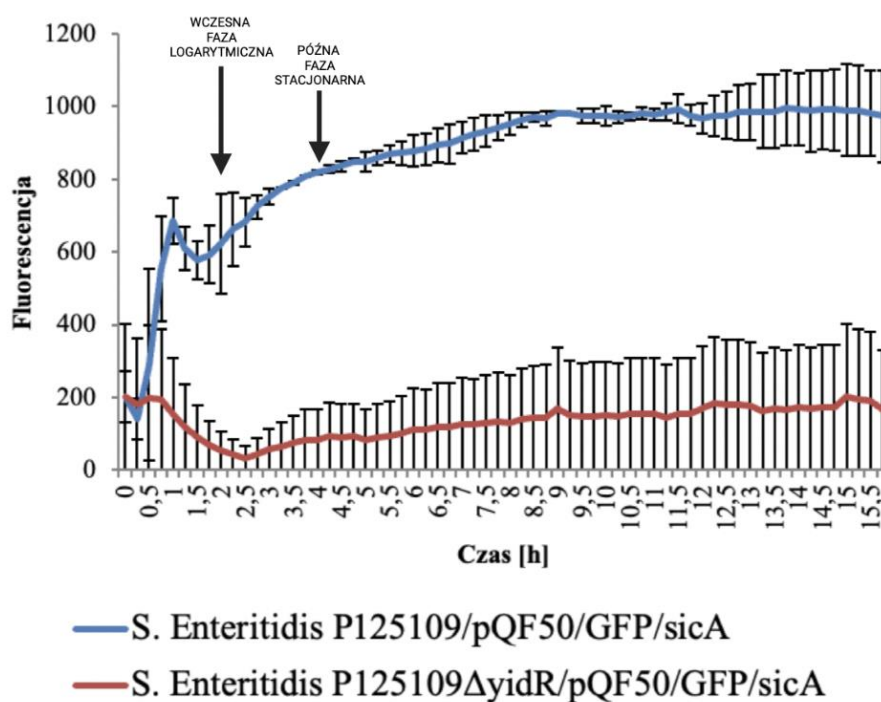


Rycina 18. Schemat przedstawiający otrzymanie konstruktu: (A) pQF50/GFP/*sicA* na bazie wektora plazmidowego pQF50/GFP i insertu odpowiadającego sekwencji promotora genu *sicA*. (B) Elektroforeza w żelu agarozowym produktu reakcji PCR ze starterami pQF50for i pQF50rev, w których matrycę stanowił konstrukcja pQF50/GFP/*sicA*. Ścieżka 1 - standard DNA GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, ścieżka 2 - produkt reakcji PCR.

4.4.5. Analiza aktywności promotora genu *sicA* w pałeczkach *S. Enteritidis* typu dzikiego i mutantu P125109Δ*idR*

W celu oznaczenia aktywności promotora genu *sicA*, pałeczki *S. Enteritidis* P125109 oraz mutantu P125109Δ*idR* z delecją genu *yidR* transformowano konstruktem pQF50/GFP/*sicA* albo samym wektorem pQF50/GFP za pomocą elektroporacji (rozdział 3.2.8), a następnie bakterie wysiewano na płytki Petriego z zestaloną agarem pożywką LB z dodatkiem ampicyliny w celu selekcji antybiotykoopornych klonów, które przyjęły obce DNA. Uzyskane w ten sposób klony pałeczek *S. Enteritidis* z ekspresją białka GFP pod kontrolą egzogenego promotora genu *sicA* nazwano P125109/pQF50/GFP/*sicA* i P125109Δ*idR*/pQF50/GFP/*sicA*. Kontrolne szczepy *S. Enteritidis* P125109 typu dzikiego oraz mutantu z delecją genu *yidR* otrzymały nazwy: P125109/pQF50/GFP i P125109Δ*idR*/pQF50/GFP. Aktywność promotora oznaczano poprzez pomiar fluorescencji emitowanej przez białko GFP.

W celu oznaczenia aktywności promotora, najpierw pojedynczymi koloniami wymienionych powyżej szczepów *S. Enteritidis* zaszczepiano 1 ml płynnej pożywki LB z dodatkiem ampicyliny (100 µg/ml) i prowadzono hodowle najpierw do uzyskania przez nie wartości $OD_{600} = 0,05$, a następnie $OD_{600} = 0,5$, co odpowiada wczesnej logarytmicznej fazie wzrostu bakterii. Kolejno, każdą z hodowli wirowano (6000 x g, 3 min, temperatura pokojowa) i uzyskane osady przemywano 1 ml 0,9% roztworu NaCl. W następnym kroku otrzymane osady zawieszano w 1 ml 0,9% roztworu NaCl i dodawano taką objętość pożywki LB, aby w 1 ml znalazło się 5×10^6 CFU. Z tak przygotowanych zawiesin bakterii pobierano po 0,2 ml, które przenoszono do studzienek 96-dołkowej płytki i dokonywano pomiarów, najpierw gęstości optycznej (OD_{600}), a następnie intensywności fluorescencji, co 15 minut (z wytrząsaniem przez 30 sekund przed każdym pomiarem), do momentu, kiedy $OD_{600} = 2,0$, co odpowiada późnej fazie stacjonarnej. Aktywność promotora wyznaczano jako stosunek intensywności fluorescencji do wartości gęstości optycznej dla każdego punktu czasowego odpowiadającego logarytmicznej fazie wzrostu bakterii, a następnie obliczono medianę oraz absolutne odchylenie względem mediany. Wyższą aktywność promotora genu *sicA* obserwowano w przypadku pałeczek *S. Enteritidis* typu dzikiego P125109/pQF50/GFP/ w porównaniu z pałeczkami *S. Enteritidis* z delecją genu *yidR* (P125109 Δ *yidR*/pQF50/GFP/*sicA* (**Ryc. 19**).

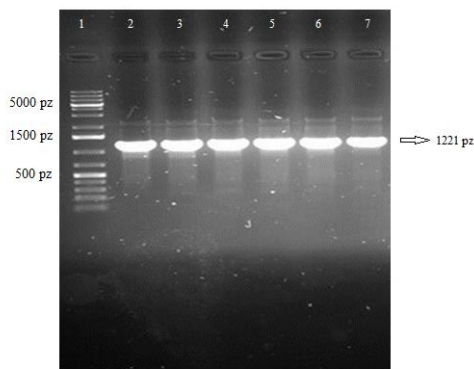


Rycina 19. Aktywność promotora genu *sicA* (z oznaczonym absolutnym odchyleniem od mediany) w szczepach *S. Enteritidis* P125109/pQF50/GFP/*sicA* (typu dzikiego) i P125109Δ*yidR*/pQF50/GFP/*sicA* (z delecją genu *yidR*) z ekspresją białka GFP pozostającą pod kontrolą tego promotora. Bakterie hodowano w warunkach, w których dochodzi do optymalnej ekspresji genu *sicA*, tzn. hodowano je w płynnej pożywce LB z ciągłym wytrząsaniem do osiągnięcia przez kulturę bakteryjną najpierw wczesnej fazy logarytmicznej, a następnie późnej fazy stacjonarnej. Eksperyment wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach biologicznych

4.5. Otrzymanie rekombinowanego białka YidR w celu produkcji specyficznych przeciwciał

4.5.1. Klonowanie genu *yidR*

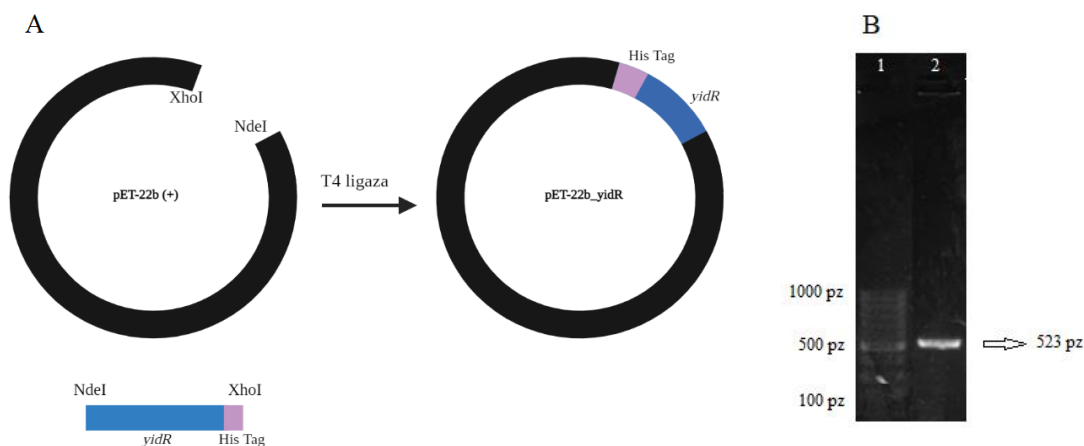
Otrzymanie rekombinowanego białka YidR rozpoczęto od klonowania genu *yidR* metodą PCR (**rozdział 3.2.3**), wykorzystując jako matrycę genomowe DNA izolowane z pałeczek *S. Enteritidis* P125109 i parę starterów P0147-pET22b-*yidR*1NdeFor i P0148-pET22b-*yidR*1XhoRev (**rozdział 3.1.9**). Optymalną temperaturę hybrydyzacji starterów z matrycą DNA określano za pomocą reakcji PCR w gradiencie temperatury 57°C - 62°C, uzyskując najlepsze wyniki przy temperaturze „annealingu” 60°C. Produkty reakcji PCR analizowano elektroforetycznie w 1% żelu agarozowym (**Ryc. 20**).



Rycina 20. Elektroforeza w żelu agarozowym fragmentu DNA odpowiadającemu genowi *yidR* będącego produktem reakcji PCR w gradiencie temperatury, w których jako matrycy użyto genomowego DNA *S. Enteritidis* P125109 oraz starterów P0147-pET22b-*yidR*1NdeFor i P0148-pET22b-*yidR*1XhoRev. **Ścieżka 1** - standard DNA GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, **ścieżka 2** – temperatura hybrydyzacji 57°C, **ścieżka 3** – temperatura hybrydyzacji 58°C, **ścieżka 4** – temperatura hybrydyzacji 59°C, **ścieżka 5** – temperatura hybrydyzacji 60°C, **ścieżka 6** – temperatura hybrydyzacji 61°C, **ścieżka 7** - temperatura hybrydyzacji 62°C

4.5.2. Otrzymanie wektorów ekspresyjnych zawierających sekwencję genu *yidR*

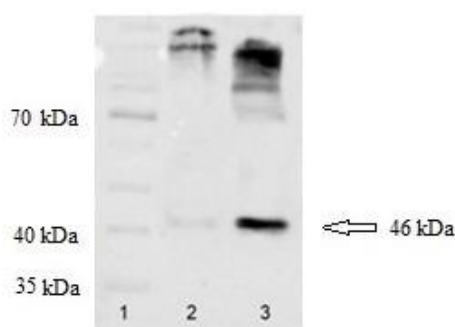
Fragment DNA odpowiadający genowi *yidR* zawierający dodatkowe sekwencje rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne Xho I i Nde I klonowano w analogiczne miejsca restrykcyjne obecne w wektorze pET 22b(+) (**rozdział 3.1.10**) (**Ryc. 21A**), po jego uprzednim trawieniu tymi samymi enzymami. W kolejnym kroku, „mieszaniną ligacyjną” transformowano bakterie chemikompetentne, które wysiewano na płytki Petriego z zestaloną agarową pożywką LB. Po całkowitej hodowli, pojedyncze kolonie bakterii analizowano metodą PCR dla pojedynczej kolonii bakteryjnej, wykorzystując parę starterów pET-T7up i *yidR*internalRev (**rozdział 3.1.9**), w celu amplifikacji fragmentu DNA o długości 523 pz (**Ryc. 21B**). Wybrane kolonie bakterii, w których stwierdzono obecność rekombinowanej cząsteczki DNA, którą nazwano pET-22b(+)*yidR*, namnażano celem izolacji plazmidowego DNA (**rozdział 3.2.1**). Poprawność sekwencji tak uzyskanej cząsteczki rekombinowanego DNA potwierdzono za pomocą sekwencjonowania (**rozdział 3.2.8**).



Rycina 21. (A) Schemat przedstawiający uzyskanie konstruktów genowych pET-22b_yidR powstałego na bazie wektora pET-22b i insertu obejmującego gen *yidR*. (B) Elektroforeza w żelu agarozowym produktu reakcji PCR, w których matrycę stanowił wektor pET-22b_yidR i para starterów pET-T7up i yidRinternalRev. Ścieżka 1 - standard DNA GeneRuler 100 bp DNA Ladder, ścieżka 2 - produkt reakcji PCR

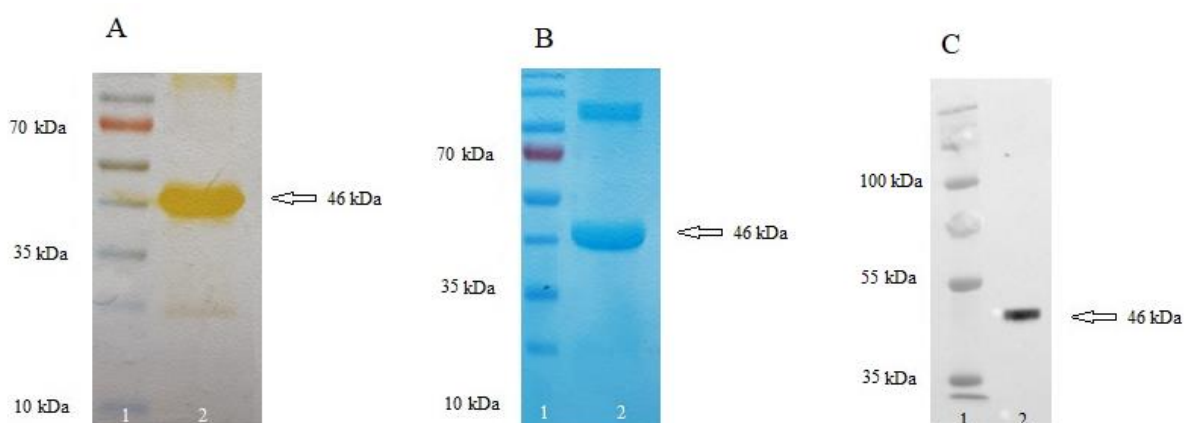
4.5.3. Ekspresja i oczyszczanie rekombinowanego białka YidR

W celu ekspresji białka YidR, konstrunktem genowym pET-22b(+)*yidR* transformowano, metodą szoku cieplnego (rozdział 3.2.10), bakterie *E. coli* szczepu Lemo21(DE3) (rozdział 3.1.11). Po rozdziale elektroforetycznym i przeniesieniu na błonę nitrocelulozową, rekombinowane białko YidR wykrywano wstępnie w lizatach bakteryjnych wykorzystując przeciwciało skierowane przeciwko metce 6x-HisTag (Ryc. 22).



Rycina 22. Wykrywanie rekombinowanego białka YidR w lizatach *E. coli* szczepu Lemo21(DE3) transformowanych konstrunktem genowym pET-22b(+)*yidR* metodą Western blotting. Do wykrycia białka YidR wykorzystano monoklonalne przeciwciało skierowane przeciwko metce HisTag. Ścieżka 1 – standard białek PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, ścieżka 2 – lizat *E. coli* szczepu Lemo21(DE3) transformowanych konstrunktem genowym pET-22b(+)*yidR* przed indukcją ekspresji białka YidR za pomocą IPTG, ścieżka 3 – lizat *E. coli* szczepu Lemo21(DE3) transformowanych konstrunktem genowym pET-22b(+)*yidR* po indukcji ekspresji białka YidR za pomocą IPTG

Następnie, rekombinowane białko YidR oczyszczano metodą chromatografii powinowactwa na złożu Ni²⁺-NTA-agaroza białko YidR i czystość uzyskanego preparatu białka oceniano metodą SDS-PAGE i Western blotting. Kiedy do wykrywania białek w żelu poliakrylamidowym wykorzystywano azotan srebra lub błękit brylantynowy Coomassie R-250, w analizowanym preparacie stwierdzono obecność głównego prążka białkowego o pozornej masie cząsteczkowej 46 kDa, co odpowiada pozornej masie cząsteczkowej natywnego białka YidR, oraz kilku dodatkowych prążków o znacznie słabszej intensywności (**Ryc. 23A i 23B**). Analiza oczyszczonego preparatu białka YidR metodą Western blotting i monoklonalnego przeciwciała skierowanego przeciwko metce HisTag potwierdziła identyczność głównego pasma białkowego z białkiem rekombinowanym (**Ryc. 23C**) Ilość otrzymanego w tym systemie ekspresji oczyszczonego białka YidR wynosiła 1,0 – 1,5 mg białka z 2 litrów hodowli bakteryjnej.



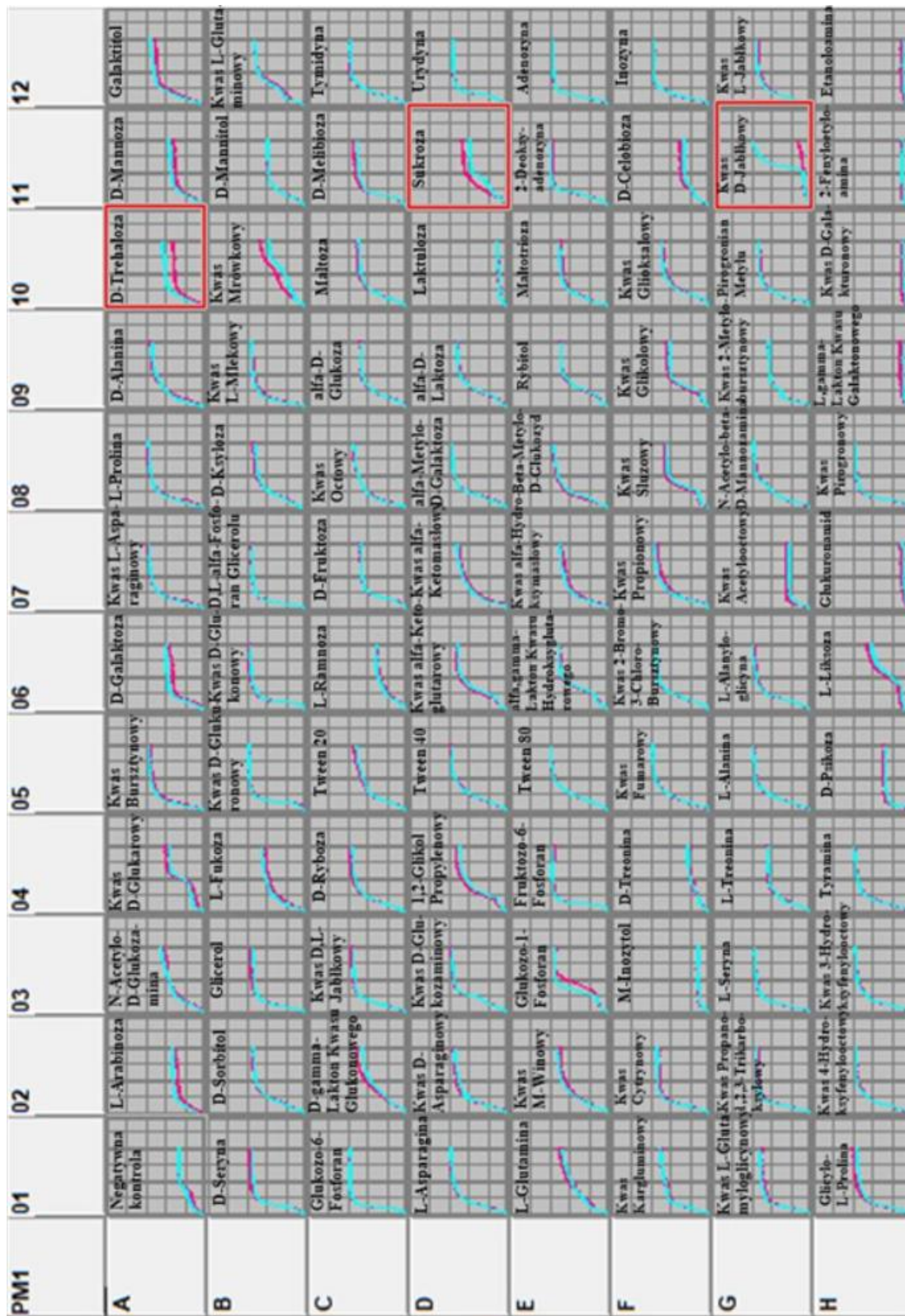
Rycina 23. Analiza rekombinowanego białka YidR, oczyszczonego metodą chromatografii powinowactwa na złożu Ni²⁺-NTA-agaroza, metodą SDS-PAGE i Western blotting. (A) Preparat białka YidR po SDS-PAGE i barwieniu azotanem srebra, (B) preparat białka YidR po SDS-PAGE i barwieniu błękitem brylantynowym Coomassie R-250, (C) preparat białka YidR po SDS-PAGE analizowany metodą Western blotting, gdzie do wykrycia białka YidR wykorzystano monoklonalne przeciwciała skierowane przeciwko metce HisTag. **Ścieżki 1** - standard białka PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, **ścieżki 2** – rekombinowane białko YidR. W przypadku wykrywania białek azotanem srebra lub błękitem brylantynowym do SDS-PAGE stosowano 10 µg białka/ścieżkę, w przypadku Western blottingu - 50 ng białka/ścieżkę. Rozdział elektroforetyczny prowadzono w 12% żelu.


4.6. Ekspresja białka YidR w pałeczkach *S. Enteritidis* hodowanych w warunkach optymalnych dla ekspresji genów *sicA* i *fimA*


Kolejnym krokiem mającym na celu wyjaśnienie biologicznej roli białka YidR i powiązanie jego obecności z adhezją i inwazją pałeczek *S. Enteritidis* była analiza jego ekspresji podczas hodowli bakterii w warunkach, w których dochodzi do optymalnej ekspresji białek T3SS SPI-1 i fimbrii typu 1 (**rozdział 4.4**). Stąd, pałeczki *S. Enteritidis* P125109WT i P125109 Δ *yidR* hodowano w warunkach, w których dochodzi do optymalnej indukcji genów *fimA* i *sicA* (**rozdział 4.4**). Następnie, z takich bakterii sporządzano lizaty białkowe, które poddawano analizie metodą SDS-PAGE i Western blotting w celu wykrycia białka YidR, wykorzystując przeciwciała anti-YidR (**rozdział 3.1.4**). Niestety, pomimo rozlicznych prób nie udało się wykazać obecności białka YidR w żadnym z analizowanych lizatów bakteryjnych, co wydaje się świadczyć o bardzo niskim naturalnym poziomie ekspresji tego białka.

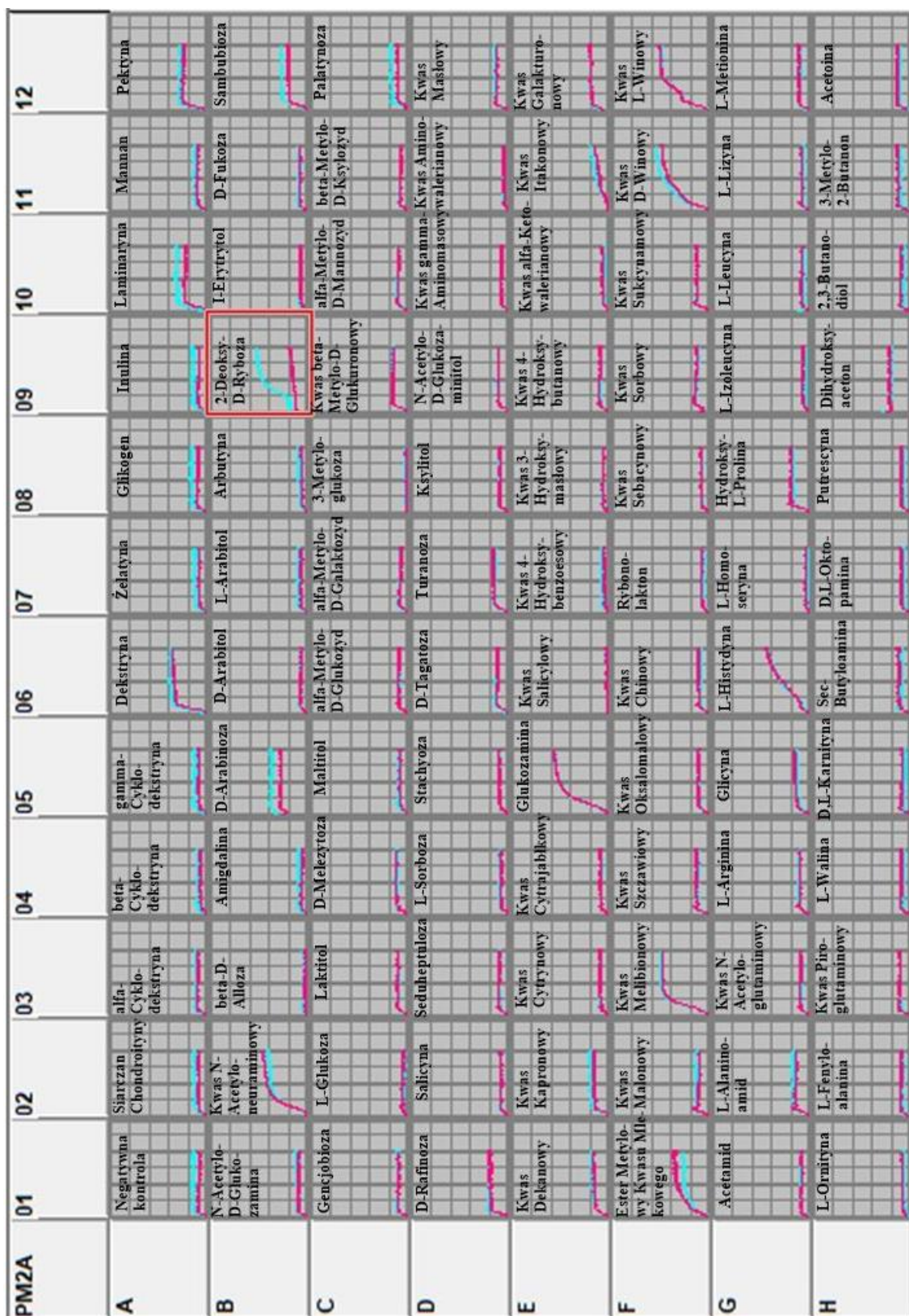
4.7. Charakterystyka metaboliczna pałeczek *S. Enteritidis* typu dzikiego i mutantu P125109 Δ *yidR* pod kątem wykorzystania różnych źródeł węgla w celu ich wzrostu


Ponieważ w wcześniejszych badaniach pokazano, że w przypadku pałeczek *E. coli* gen *yidR* wpływa na przebieg szlaków metabolicznych przemiany cukrowej, hamując wzrost bakterii na podłożach pozbawionych glukonianu i kwasu glukuronowego, jako jedynych źródeł węgla (Fuhrer i wsp., 2017), pałeczki *S. Enteritidis* P125109 typu dzikiego i mutantu P125109 Δ *yidR* z delecją genu *yidR* analizowano pod kątem wykorzystania różnych źródeł węgla posługując się Mikromacierzami Fenotypowymi PM1 i PM2A (BIOLOG) (**rozdział 3.3.3**). Krzywe wzrostu uzyskane w wyniku 48 godzinnej hodowli (**rozdział 3.3.2**) pokazały, że mutant P125109 Δ *yidR* różni się od wyjściowych pałeczek *S. Enteritidis* P125109 zdolnościami do wykorzystania D-trehalozy, sacharozy, kwasu jabłkowego i 2-deoksy-D-rybozy, kiedy cukry te stanowią jedyne źródła węgla podczas wzrostu bakterii (**Ryc. 24**)




 S. Enteritidis P125109

 S. Enteritidis P125109deltayidR

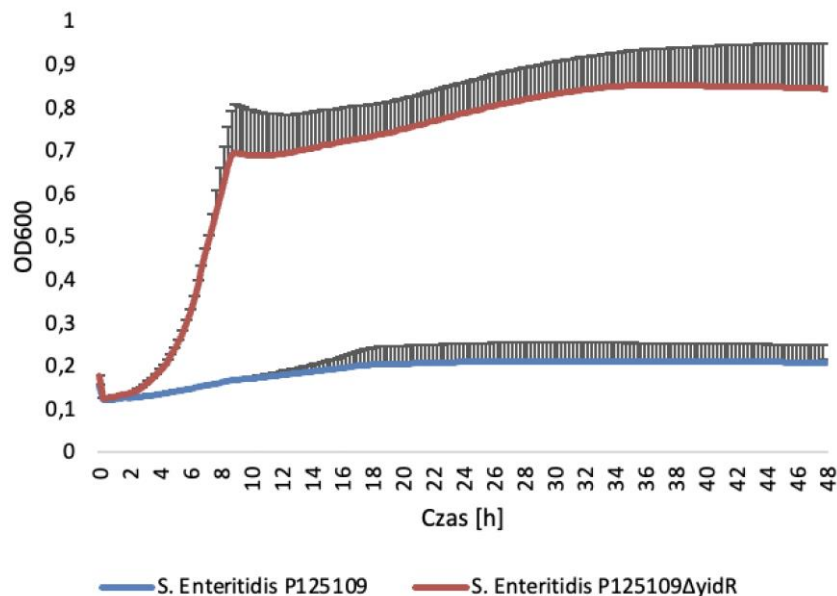


 *S. Enteritidis* P125109

 *S. Enteritidis* P125109deltayidR

Rycina 24. Charakterystyka metaboliczna pałeczek *S. Enteritidis* P125109 typu dzikiego i mutantu *S. Enteritidis* P125109 Δ idR za pomocą Mikromacierzy Fenotypowych (A) PM1 i (B) PM2A (BIOLOG). Hodowle prowadzono przez 48 godzin. Testy przeprowadzono w trzech niezależnych powtórzeniach biologicznych

W celu potwierdzenia powyższych wyników, pałeczki *S. Enteritidis* P125109 typu dzikiego i mutantu P125109 Δ *yidR* hodowano w pożywce M9 z dodatkiem różnych stężeń kwasu jabłkowego, D-trehalozy, sacharozy, i 2-deoksy-D-rybozy, jako jedynych źródeł węgla koniecznych dla ich wzrostu. Jedynie w przypadku kwasu jabłkowego potwierdzono wyniki uzyskane za pomocą Mikromacierzy Fenotypowych i pokazano, że pałeczki *S. Enteritidis* z delecją genu *yidR* rosną zdecydowanie lepiej na pożywce z dodatkiem 5 mM kwasu jabłkowego w porównaniu ze szczepem wyjściowym (**Ryc. 25**).



Rycina 25. Krzywe wzrostu pałeczek *S. Enteritidis* P125109 szczepu dzikiego oraz mutantu P125109 Δ *yidR* z delecją genu *yidR* hodowanych na pożywce M9 z dodatkiem 5 mM kwasu jabłkowego przez 48 godzin. Wyniki są średnimi z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych

5. Dyskusja

Pałeczki *Salmonella* są jednym z najczęściej izolowanych ludzkich patogenów, które przenoszone są drogą pokarmową. Zakażenia pałeczkami *Salmonella* stanowią poważny problem dla zdrowia publicznego na całym świecie, przyczyniając się do obciążenia ekonomicznego zarówno krajów uprzemysłowionych, jak i słabo rozwiniętych poprzez koszty związane z nadzorem, zapobieganiem i leczeniem (Crump i wsp., 2004). W przypadku *S. Enteritidis* najczęstszą postacią zakażenia tymi pałeczkami jest zapalenie żołądka i jelit, których następstwem, w przypadku osób z niedoborami immunologicznymi lub poddanych immunosupresji, może być uogólniona postać choroby w postaci bakteriemii (Majowicz i wsp., 2010). Pomimo intensywnych badań nad tymi enteropatogenami, biologia i patogenezą zakażeń tymi pałeczkami jest ciągle stosunkowo słabo poznana, czego dowodem jest fakt, że wciąż około 35 - 40% genów *Salmonella* nie ma doświadczalnie potwierdzonej funkcji. Ostatnio, Kolenda i wsp. (2021) przeprowadzili analizę genomów szczepów *Salmonella* należących do serowarów: Enteritidis, Choleraesuis, Dublin, Gallinarum i Typhimurium, różniących się od siebie w testach *in vitro* adhezją i inwazją wobec komórek nabłonka jelitowego różnego pochodzenia. Wykorzystując sekwencjonowanie nowej generacji zidentyfikowano mutacje w 13 genach, które można było powiązać z określonym fenotypem reprezentującym wariant nisko-adhezyjno-inwazyjny lub wysoko-adhezyjno-inwazyjny. Zgodnie z dostępną literaturą geny te, albo mają związek z regulacją ekspresji genów wirulencji, albo syntezą elementów składowych błony zewnętrznej, lub też ich białkowe produkty są elementami strukturalnymi tej błony (Azriel i wsp., 2015; Hara-Kaonga i wsp., 2004; Kroupitski i wsp., 2013; Rida i wsp., 1996; Ilg i wsp., 2009; Ahmer i wsp., 1999; Moral i wsp., 1998; Mouslim i Hughes, 2014; Guttenplan i Kearns, 2013; Gil i wsp., 2007; Das i wsp., 2013; Ellermeier i Slauch, 2003; Yoshida i wsp., 2003), a nie jak można było oczekiwać z adhezją i/lub inwazją pałeczek *Salmonella*. Należy też podkreślić, że dla niektórych z tych

genów funkcja biologiczna jest bardzo słabo poznana. Przykładem takiego genu jest gen *yidR*, przy czym dotychczasowe badania wskazują na jego udział w adhezji pałeczek *Salmonella*. Kroupitski i wsp. (2013) wykazali bowiem, że szczep *S. Typhimurium* z delecją genu *yidR* wiązał się znacznie słabiej zarówno do nienaruszonych, jak i uszkodzonych liści sałaty w porównaniu ze szczepem typu dzikiego. W związku z tym, w pierwszym etapie przeprowadzono badania mające na celu potwierdzeniu udziału tego genu już nie tylko w adhezji, ale również inwazji pałeczek *Salmonella*, a konkretnie *S. Enteritidis*, do komórek nabłonkowych człowieka, świni i kury. Wykorzystując mutantą delecyjnego *S. Enteritidis* P125109 wykazano, że knock-out genu *yidR* prowadzi do statystycznie istotnego obniżenia zarówno adhezji jak i inwazji do wszystkich trzech rodzajów komórek nabłonka jelitowego w porównaniu z pałeczkami *S. Enteritidis* typu dzikiego. Jakkolwiek, co należy podkreślić, efekt ten nie był drastyczny, i w przypadku adhezji spadała ona o 14% w przypadku kurzych komórek Chic-8E11, o 22% w przypadku ludzkich komórek Caco-2 i o 37,5% w przypadku komórek Ipec-J2 świni. Jeżeli chodzi o inwazyjność, to jej spadek był bardzo podobny w przypadku wszystkich analizowanych linii komórkowych i wynosił, odpowiednio, 27%, 21% i 25%.

Ponieważ adhezja do i inwazja komórek wyściełających światło przewodu pokarmowego, takich jak enterocyty i komórki M, odgrywają kluczową rolę w jelitowej fazie zakażeń pałeczkami *S. Enteritidis* (Hopkins i Kraehenbuhl, 1997; Alun i wsp., 2002), zadano sobie pytanie w jaki sposób białko YidR, będące produktem genu *yidR*, wpływa na poziomie molekularnym na te procesy. Biorąc pod uwagę fakt, że białko YidR jest najprawdopodobniej zlokalizowane w cytoplazmie, założono, że nie bierze one bezpośredniego udziału zarówno w adhezji, jak i inwazji, ale funkcjonuje jako białko regulatorowe wpływając na ekspresję genów, których białkowe produkty odgrywają kluczową rolę w tych procesach. W przypadku adhezji, jako gen docelowy dla działania białka YidR wybrano gen *fimA* kodujący główne

białko strukturalne fimbrii typu 1, o nazwie FimA (Purcell i wsp., 1987; Boyd i Hartl, 1999). Jak to zostało wcześniej pokazane, fimbrie typu 1 odgrywają kluczową rolę w adhezji pałeczek *S. Enteritidis* do komórek eukariotycznych (Kisiela i wsp., 2006, 2012; Grzymajło i wsp., 2010; Kuźmińska-Bajor i wsp., 2012; Ugorski i wsp., 2011; Kolenda i wsp., 2019). Jeżeli chodzi o inwazyjność, to jako gen docelowy dla białka YidR wybrano gen *sicA*, kodujący białko SicA stanowiące element strukturalno-czynnościowy T3SS-1 i pełniące rolę chaperonu dla innych białek tego systemu sekrecyjnego (Kaniga i wsp., 1995). W badaniach własnych ekspresję genu *fimA* oceniano poprzez analizę ekspresji białka metodą Western blotting. Przedstawione wyniki, nie wykazały różnic w ekspresji białka FimA w szczepie dzikim, jak i w szczepie z delecją genu *yidR*. Natomiast, analizę ekspresji genu *sicA* prowadzono w dwojaki sposób, wykorzystując metodę Western blotting oraz na poziomie transkrypcji, poprzez oznaczenie aktywności promotorów tych genów.

Kiedy analizę białka SicA prowadzono w przypadku hodowli pałeczek *S. Enteritidis* szczepu dzikiego (P125109/pFPV25.1GFPmut3Kan_*sicA*_2xHA) i mutantu z delecją genu *yidR* (P125109Δ*yidR*/pFPV25.1GFPmut3Kan_*fimA*_2xHA) znajdujących się we wczesnej fazie logarytmicznej wzrostu, mniejsze ilości tego białka obserwowano w lizatach *S. Enteritidis* z delecją genu *yidR* w porównaniu z *S. Enteritidis* typu dzikiego. Te ilościowe różnice zanikały, kiedy wzrost bakterii kontynuowano do późnej fazy stacjonarnej. Dla potwierdzenia powyższych wyników oraz pokazania, że różnice w ekspresji białka związane są z regulacją genu *sicA* na poziomie transkrypcji, w szczepach *S. Enteritidis* P125109/pQF50/GFP/*sicA* i P125109Δ*yidR*/pQF50/GFP/*sicA* oznaczano aktywność promotora genu *sicA* zarówno, kiedy bakterie znajdowały się we wczesnej fazie logarytmicznej wzrostu, jak i wczesnej fazie stacjonarnej wzrostu. Zgodnie z oczekiwaniami, kiedy bakterie znajdowały się we wczesnej fazie stacjonarnej wzrostu, znacznie wyższą aktywność promotora genu *sicA* obserwowano w przypadku pałeczek *S. Enteritidis* typu

dzikiego w porównaniu z pałeczkami z delecją genu *yidR*. Z tym, że te różnice w aktywnościach promotorów obserwowano również, kiedy pałeczki *S. Enteritidis* znajdowały się w późnej fazie stacjonarnej. Tak więc, na obecnym poziomie badań uzyskane wyniki wskazują na udział genu/białka YidR w regulacji ekspresji genu *sicA* na poziomie transkrypcji. Należy zaznaczyć, że regulacja T3SS-1, skład którego wchodzi białko SicA jest procesem złożonym, w który zaangażowanych jest kilka białek regulatorowych. Kluczową rolę odgrywa tutaj białko HilA, będące przedstawicielem rodziny białek OmpR/ToxR (Lostroh i Lee, 2001; Jones, 2005), które bezpośrednio aktywuje dwa zespoły genów (operonów) zlokalizowanych na SPI-1 (Lostroh i Lee, 2001; Lostroh i wsp., 2000). Jeden z tych operonów obejmuje gen *invF*, którego produkt – białko InvF - aktywuje ekspresję kilku białek efektorowych T3SS (Darwin i Miller, 1999; Eichelberg i Galan, 1999). Z kolei, białko InvF dla swojej aktywności wymaga obecności białka SicA (Darwin i Miller, 2000, 2001). Jednakże mechanizm, za pomocą którego InvF/SicA indukuje ekspresję genów docelowych pozostaje nieokreślony, tzn. nie wiadomo, czy InvF/SicA działa, jako czynnik anty-H-NS (białko odgrywające kluczową rolę regulacyjną u *Salmonella*, działając jako represor na większość genów wirulencji), jak w przypadku HilD, czy też pośredniczy w ekspresji genów jako klasyczny czynnik transkrypcyjny (Smith i wp., 2016). Stąd wyjaśnienie, na czym dokładniej polega rola białka YidR, jako aktywatora transkrypcji genu *sicA* wymaga dalszych badań.

Ponieważ drugim z analizowanych genów, stanowiących potencjalny cel działania białka YidR, był gen *fimA*, pałeczki *S. Enteritidis* hodowano w warunkach umożliwiających optymalną ekspresję fimbrii typu 1, tzn. hodując je przez cztery kolejne pasaży w płynnej pożywce LB bez wytrząsania (hodowla stacjonarna) (Kuźmińska-Bajor i wsp., 2012). Założono, że poziom ekspresji fimbrii typu 1 bezpośrednio koreluje z poziomem ekspresji białka FimA, które jest zasadniczym elementem strukturalnym tej struktury wytwarzanej

przez *Enterobacteriaceae* (Duguid i wsp., 1966; Clegg i Gerlach, 1987). Zgodnie z oczekiwaniami nie obserwowano produkcji białka FimA przez pałeczki *S. Enteritidis* po pierwszym pasażu, z kolei znaczne jego ilości były obecne w lizatach bakterii po 4. pasażu. Natomiast nie obserwowano żadnych różnic w ilościach białka FimA pomiędzy pałeczkami *S. Enteritidis* typu dzikiego, a pałeczkami *S. Enteritidis* z delecją genu *yidR*, co wskazuje, że białko YidR nie bierze udziału w regulacji ekspresji genu *fimA* i tym samym nie wpływa ono na wytwarzanie fimbrii typu 1 przez pałeczki *S. Enteritidis*. Tak więc, obniżona adhezja pałeczek *S. Enteritidis* z delecją genu *yidR*, jak to już opisano powyżej, jest prawdopodobnie związana jedynie z defektem w funkcjonowaniu T3SS-1.

W powiązaniu z badaniami nad rolą genu *yidR* w regulacji ekspresji genów związanych z właściwościami adhezyjnymi i inwazyjnymi pałeczek *Salmonella*, podjęto próbę analizy ekspresji białka YidR w pałeczkach *S. Enteritidis* hodowanych w warunkach optymalnych dla ekspresji białka FimA, czyli fimbrii typu 1 i białka SicA, czyli T3SS-1. Zakładano, że ewentualnym zmianom w poziomie ekspresji tych białek powinny towarzyszyć zmiany w ekspresji białka YidR. Niestety, najprawdopodobniej z powodu zbyt niskiej ekspresji, nie udało się wykazać naturalnej obecności tego białka w pałeczkach *S. Enteritidis* hodowanych w różnych warunkach.

Dotychczasowe badania nad biologiczną rolą genu *yidR* wskazują, że przynajmniej w przypadku pałeczek *E. coli* bierze on udział w metabolizmie komórkowym, a konkretnie partycypuje w metabolizmie galaktozy i glukonianu/galaktorunianu (Fuhrer i wsp., 2017). Wykazano, że pałeczki *E. coli* z delecją genu *yidR*, w przeciwieństwie do *E. coli* typu dzikiego charakteryzują się upośledzonym wzrostem na podłożu z glukonianem lub glukuronianem jako jedynymi źródłami węgla, co wskazuje na udział genu *yidR* w przyswajaniu tych związków. Tym niemniej, brak jest na chwilę obecną bardziej szczegółowych informacji, co do specyficznej roli genu *yidR* w metabolizmie tych związków.

Biorąc pod uwagę te informacje, podjęto badania mające na celu powiązanie funkcji genu *yidR* z metabolizmem również w przypadku pałeczek *Salmonella*. Wykorzystując, Mikromacierze Fenotypowe firmy BIOLOG, porównywano wzrost pałeczek *S. Enteritidis* typu dzikiego i ich mutantu delecyjnego z brakiem ekspresji genu *yidR* na pożywkach zawierających różne związki jako jedyne źródła węgla. Jedynym związkiem węgla, spośród 192 przebadanych, co do którego różniły się pod względem wymagań wzrostowych analizowane szczepy *S. Enteritidis*, okazał się kwas jabłkowy. Pokazano, że pałeczki *S. Enteritidis* z delecją genu *yidR* rosną zdecydowanie lepiej na pożywce z 5 mM kwasem jabłkowym jako jedynym źródłem węgla w porównaniu z pałeczkami *S. Enteritidis* typu dzikiego. Uzyskane wyniki z jednej strony pokrywają się z badaniami Fuhrera i wsp. (2017) nad rolą genu *yidR* w metabolizmie pałeczek *E. coli*, wskazując na udział genu *yidR* w metabolizmie komórkowym, z drugiej różnią się, co do jego związku z konkretnymi metabolitami, którymi w przypadku *E. coli* są glukonian lub glukuronian, a w przypadku *S. Enteritidis* - kwas jabłkowy. Na obecnym poziomie badań, na czym polega rola genu *yidR* w metabolizmie kwasu jabłkowego pozostaje sprawą niewyjaśnioną i wymaga dalszych badań. To z kolei powinno dać odpowiedź, co do ewentualnego związku pomiędzy metabolizmem kwasu jabłkowego, a adhezją i/lub inwazją pałeczek *Salmonella*.

Podsumowując, otrzymane wyniki wskazują, że białko YidR może być zaangażowane w regulację ekspresji genu *sicA* na poziomie transkrypcji, na co wskazuje spadek aktywności promotora genu *sicA* w pałeczkach *S. Enteritidis* z delecją genu *yidR*. Ponieważ białko YidR jest jednym z elementów składowych T3SS-1, pełniącego kluczową rolę w inwazji pałeczek *Salmonella* względem komórek nabłonkowych (Santos i wsp., 2001; Wallis i Galyov, 2000; Lostroh i Lee, 2001), obniżoną inwazję pałeczek *S. Enteritidis* z delecją genu *yidR* można tłumaczyć zmniejszoną aktywnością systemu sekrecyjnego. T3SS-1. Jako że, T3SS-1, obok inwazji, może również brać udział w adhezji, jako tzw. atypowa adhezyna (Wagner i Hensel,

2011), również i obniżoną adhezję pałeczek *S. Enteritidis* z delecją genu *yidR* do komórek nabłonkowych, można powiązać z obniżoną ekspresją genu *sicA*. Tym niemniej, na czym dokładnie polega regulatorowa rola białka YidR i jakie molekularne mechanizmy leżą u podstaw jego aktywności wymaga dalszych szczegółowych badań.

6. Wnioski

1. Delecja genu *yidR* prowadzi do obniżenia zdolności adhezyjnych i inwazyjnych pałeczek *S. Enteritidis* względem komórek nabłonka jelitowego człowieka, świni i kury.
2. Gen *yidR* wydaje się pełnić rolę pozytywnego regulatora ekspresji genu *sicA* i w ten sposób wpływać na adhezję do i inwazję komórek nabłonka jelitowego przez pałeczki *S. Enteritidis*.
3. Szybszy wzrost pałeczek *S. Enteritidis* z delecją genu *yidR* na pożywce z kwasem jabłkowym jako jedynym źródłem węgla w porównaniu z pałeczkami *S. Enteritidis* typu dzikiego sugeruje, że białkowy produkt gen *yidR* może być zaangażowany w szlaki metaboliczne z jego udziałem.

7. Piśmiennictwo

1. Ahmer B. M., Tran M., Heffron F.: The virulence plasmid of *Salmonella* Typhimurium is self-transmissible. *J. Bacteriol.* 181(4):1364-8 (1999).
2. Aleksandrowicz A., Khan M. M., Sidorczyk K., Noszka M., Kolenda R.: Whatever makes them stick – Adhesins of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Vet. Microbiol.* 257:109095 (2021).
3. Alun C. K., Yrlid U., Wick M. J.: The Innate Immune Response Differs in Primary and Secondary *Salmonella* Infection. *J. Immunol.* 169, 4450-4459 (2002).
4. Azriel S., Goren A., Rahav G., Gal-Mor O.: The Stringent Response Regulator DksA Is Required for *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Growth in Minimal Medium, Motility, Biofilm Formation, and Intestinal Colonization. *Infect. Immun.* 84(1):375-84 (2015).
1. Biedzka-Sarek M., Skurnik M. E.: How to outwit the enemy: dendritic cells face *Salmonella*. *APMIS.* 114(9):589-600 (2006).
2. Birhanu B. T., Park Na-Hye., Lee Seung-Jin, Hossain M. A., Park Seung-Chun.: Inhibition of *Salmonella* Typhimurium adhesion, invasion, and intracellular survival via treatment with methyl gallate alone and in combination with marbofloxacin. *Vet. Res.* 49(1):101 (2018).
3. Boyd E.F., Hartl D.L.: Analysis of the type 1 pilin gene cluster fim in *Salmonella*: its distinct evolutionary histories in the 5' and 3' regions. *J. Bacteriol.* 181(4):1301-8 (1999).
4. Broz P., Ohlson M. B., Monack D. M.: Innate immune response to *Salmonella* Typhimurium, a model enteric pathogen. *Gut*
5. Canals R., Hammarlöf D. L., Kröger C., Owen S. V., Fong, W. Y., Lacharme-Lora, L., Zhu X., Wenner N., Carden S. E., Honeycutt J., Monack D. M., Kingsley R. A., Brownridge P., Chaudhuri R. R., Rowe W. P., Predeus A. V., Hokamp K., Gardon M. A., Hinton J. C. D.: Adding function to the genome of African *Salmonella* Typhimurium ST313 strain D23580. *PLoS Biol.* 17, e3000059 (2019).
6. Cascales E., Buchanan S. K., Duche D., Kleanthous C., Lloubes R., Postle K., Riley M., Slatin S., Cavard D.: Colicin biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71(1):158-229 (2007).

7. Cherepanov, P.P., Wackernagel, W.: Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene*. 158, 9–14 (1995).
8. Clegg S., Gerlach G.F.: Enterobacterial fimbriae. *J. Bacteriol.* 169(3):934-8 (1987).
9. Coburn B., Grasll G. A., Finlay B. B.: *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunol. Cell Biol.* 85(2):112-8 (2007).
10. Connell H., Hedlund M., Agace W., Svanborg C.: Bacterial attachment to uro-epithelial cells: mechanisms and consequences. *Adv. Dent. Res.* 11(1):50-8 (1997).
11. Crump J. A., Luby S. P., Mintz E. D.: The global burden of typhoid fever. *Bull World Health Organ.* 82(5):346-53 (2004).
12. Dagert M, Ehrlich S. D.: Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene*. 6(1):23-8 (1979).
13. Darwin K. H., Miller V. L.: Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clin. Microbiol. Rev.* 12(3):405-28 (1999).
14. Darwin K.H., Miller V.L.: The putative invasion protein chaperone SicA acts together with InvF to activate the expression of *Salmonella* Typhimurium virulence genes. *Mol. Microbiol.* 35, 949–959 (2000).
15. Darwin K. H., Miller V. L.: Type III secretion chaperone-dependent regulation: activation of virulence genes by SicA and InvF in *Salmonella* Typhimurium. *EMBO J.* 20(8): 1850–1862 (2001).
16. Das S., Singh S., McClelland M., Forst S., Gvaneshwar P.: Characterization of an Acid-Inducible Sulfatase in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Appl. Environ. Microbiol.* 79(6): 2092–2095 (2013).
17. Datsenko K.A. and Wanner B.L.: One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:6640–6645 (2000).
18. Daigle F.: Typhi genes expressed during infection or involved in pathogenesis. I. *Infect. Dev. Ctries.* 2(6):431-7 (2008).
19. Dubuisson J. F., Vianney A., Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Lazzaroi J. C.: Tol-Pal proteins are critical cell envelope components of *Erwinia chrysanthemi* affecting cell morphology and virulence. *Microbiology* 151(Pt 10):3337-3347 (2005).
20. Duguid J. P., Anderson E. S., Campbell I.: Fimbriae and adhesive properties in *Salmonellae*. *J. Pathol. Bact.* 92, 107-138 (1966).

21. Dunne Jr. W. M.: Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin. Microbiol. Rev.* 15(2):155-66 (2002).
22. Eichelberg, Galan J. E.: Differential Regulation of *Salmonella* Typhimurium Type III Secreted Proteins by Pathogenicity Island 1 (SPI-1)-Encoded Transcriptional Activators InvF and HilA. *Infect. Immun.* 67(8): 4099–4105 (1999).
23. Ellermeier C. D., Slauch J. M.: RtsA and RtsB coordinately regulate expression of the invasion and flagellar genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* 5096-5108 (2003).
24. Eng S. K., Pusparajah P., Mutalib N. S. A., Ser H. L., Chan K. G., Lee L. H.: *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science.* 8, 284–293 (2015).
25. Feasey N. A., Dougan G., Kingsley R. A., Heyderman R. S., Gordon M. A.: Invasive non-typhoidal *Salmonella* disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa. *Lancet.* 379(9835):2489-2499 (2012).
26. Fink R. C., Evans M. R., Porwollik S., Vazques-Torres A., Jones-Carson J., Troxell B., Libby S. J., McClelland M., Hassan H. M.: FNR is a global regulator of virulence and anaerobic metabolism in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (ATCC 14028s). *J. Bacteriol.* 189(6):2262-73 (2007).
27. Fuhrer T., Zampieri M., Sévin D. C., Sauer U., Zamboni N.: Genomewide landscape of gene- metabolome associations in *Escherichia coli*. *Mol. Syst. Biol.* 13, 907 (2017).
28. Galanis E., Lo Fo Wong D. M. A., Patrick M. E., Binsztein N., Cieřlik A., Chalermchikit T., Aidara-Kane A., Ellis A., Angulo F. J., Wegener H. C., World Health Organization Global Salm-Surv: Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000-2002. *Emerg. Infect. Dis.* 12(3):381-8 (2006).
29. Ghatak S., King Z. A., Sastry A., Palsson B. O.: The y-ome defines the 35% of *Escherichia coli* genes that lack experimental evidence of function. *Nucleic Acids Res.* 47, 2446–2454 (2019).
30. Gil F., Ipinza F., Fuentes J., Fumeron R., Villarreal J. M., Aspee A., Mora G. C., Vasquez C. C., Saavedra C.: The ompW (porin) gene mediates methyl viologen (paraquat) efflux in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Res. Microbiol.* 158(6):529-36 (2007).
31. Grzymajł K., Ugorski M., Kolenda R., Kędzierska A., Kuźmińska-Bajor M., Wieliczko A.: FimH adhesin from host unrestricted *Salmonella* Enteritidis binds to different glycoprotein ligands expressed by enterocytes from sheep, pig and cattle than

- FimH adhesins from host restricted *Salmonella* Abortus-ovis, *Salmonella* Choleraesuis and *Salmonella* Dublin. *Vet. Microbiol.* 166, 550–557 (2013).
32. Guttenplan S. B., Kearns D. B.: Regulation of flagellar motility during biofilm formation. *FEMS Microbiol. Rev.* 37(6):849-71 (2013).
 33. Hallstrom K., McCormick B. A.: *Salmonella* interaction with and passage through to intestinal mucosa: through the lens of the organism. *Front. Microbiol.* 2:88 (2011).
 34. Haraga A., Ohlson M. B., Miller S. I.: *Salmonellae* interplay with host cells. *Rev. Microbiol.* 6(1):53-66 (2008).
 35. Hara-Kaonga B., Pistole T. G.: OmpD but not OmpC is involved in adherence of *Salmonella enterica* serovar typhimurium to human cells. *Can. J. Microbiol.* 50(9):719-27 (2004).
 36. Hayward R. D., McGhie E. J., Koronakis V.: Membrane fusion activity of purified SipB, a *Salmonella* surface protein essential for mammalian cell invasion. *Mol. Microbiol.* 37(4):727-39 (2000).
 37. Hensel M.: *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol. Microbiol.* 36(5):1015-23 (2000).
 38. Hopkins S.A., Kraehenbuhl J. P.: Dendritic cells of Peyer's patches colocalize with *Salmonella* Typhimurium avirulent mutants in the subepithelial dome. *Adv. Exp. Med. Biol.* 417, 105-109 (1997).
 39. Hueck C. J.: Type III Protein Secretion Systems in Bacterial Pathogens of Animals and Plants. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 62, 379–433 (1998).
 40. Ilg K., Endt K., Misselwitz B., Stecher B., Aebi M., Hardt W. D.: O-antigen-negative *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is attenuated in intestinal colonization but elicits colitis in streptomycin-treated mice. *Infect. Immun.* 77(6):2568-75 (2009).
 41. Jajere S.M.: A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Vet. World.* 12(4): 504–521 (2019).
 42. Jones B. D., Ghori N., Falkow S.: *Salmonella* Typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J. Exp. Med.* 180: 15-23 (1994).
 43. Jones B. D., Falkow S.: Salmonellosis: host immune responses and bacterial virulence determinants. *Annu. Rev. Immunol.* 14:533-61 (1996).
 44. Jones B. D.: *Salmonella* invasion gene regulation: a story of environmental awareness. *J. Microbiol.* 43 Spec No:110-7 (2005).

45. Jones M. A., Hulme S. D., Barrow P. A., Wigley P.: The *Salmonella* pathogenicity island 1 and *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion systems play a major role in pathogenesis of systemic disease and gastrointestinal tract colonization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the chicken. *Avian Pathol.* 36, 199–203 (2007).
46. Kaniga K., Trollinger D., Galán J. E.: Identification of two targets of the type III protein secretion system encoded by the *inv* and *spa* loci of *Salmonella* Typhimurium that have homology to the *Shigella* IpaD and IpaA proteins. *J. Bacteriol.* 177: 7078–7085 (1995).
47. Kao C. Y., Lin W. H., Tseng C. C., Wu A. B., Wang M. C., Wu J. J.: The complex interplay among bacterial motility and virulence factors in different *Escherichia coli* infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 33 (12):2157-62 (2014).
48. Kirby A. C., Yrlid U., Wick M. J.: The innate immune response differs in primary and secondary *Salmonella* infection. *J. Immunol.* 69(8):4450-9 (2002).
49. Kisiela D., Laskowska A., Sapeta A., Kuczkowski M., Wieliczko A., Ugorski M.: Functional characterization of the FimH adhesin from *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Microbiology SGM* 152: 1337 – 1346 (2006).
50. Kisiela D., Chattopadhyay S., Libby S. J., Karlinsey J. E., Fang F. C., Tchesnokova V., Kramer J. J., Beskhlebnaya V., Samadpour M., Grzymajło K., Ugorski M., Lankau E. W., Mackie R. I., Clegg S., Sokurenko E. V.: Evolution of *Salmonella enterica* virulence via point mutations in the fimbrial adhesin. *Plos Pathog.* 8(6):e1002733 (2012).
51. Koebnik R., Locher K. P., van Gelder P.: Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol. Microbiol.* 37(2):239-53 (2000).
52. Kolenda R., Ugorski M., Grzymajło K.: Everything You Always Wanted to Know About *Salmonella* Type 1 Fimbriae, but Were Afraid to Ask. *Front. Microbiol.* 10, 1017 (2019).
53. Kolenda R., Burdukiewicz M., Wimoné M., Aleksandrowicz A., Ali A., Szabo I., Tedin K., Bartholdson S., Pickard D., Schierack P.: Identification of Natural Mutations Responsible for Altered Infection Phenotypes of *Salmonella enterica* Clinical Isolates by Using Cell Line Infection Screens. *Appl. Environ. Microbiol.* 87(2):e02177-20 (2021).
54. Kröger C., Colgan A., Srikumar S., Händler K., Sivasankaran S. K., Hammarlöf D. L., Canals R., Grissom J. E., Conway T., Hokamp K., Hinton J. C. D.: An infection-

- relevant transcriptomic compendium for *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Cell Host Microbe* 14, 683–695 (2013).
55. Kroupitski Y., Brandl M. T., Pinto R., Belausov E., Tamir-Ariel D., Burdman S., Sela S.: Identification of *Salmonella enterica* genes with a role in persistence on lettuce leaves during cold storage by recombinase-based in vivo expression technology. *Phytopathology* 103, 362–372 (2013).
56. Kuźmińska-Bajor M., Kuczkowski M., Grzymajło K., Wojciech Ł., Sabat M., Kisiela D., Wieliczko A., Ugorski M.: Decreased colonization of chicks by *Salmonella enterica* serovar Gallinarum expressing mannose-sensitive FimH adhesin from *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Vet. Microbiol.* 158, 205–210 (2012).
57. Lee M. D., Curtiss III R., Peay T.: The effect of bacterial surface structures on the pathogenesis of *Salmonella* Typhimurium infection in chickens. *Avian Dis.* 40: 28 – 36 (1996).
58. Lin J., Lee I. S., Frey J., Slonczewski J. L., Foster J. W.: Comparative analysis of extreme acid survival in *Salmonella* Typhimurium, *Shigella flexneri*, and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177:4097– 4104 (1995).
59. Lostroh C. P., Bajaj V., Lee C. A.: The cis requirements for transcriptional activation by hilA, a virulence determinant encoded on SPI-1. *Mol. Microbiol.* 37; 300-315 (2000).
60. Lostroh C. P., Lee C. A.: The *Salmonella* pathogenicity island-1 type III secretion system. *Microbes Infect.* 3(14-15):1281-91 (2001).
61. Lou L., Zhang P., Piao R., Wang Y.: *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI-1) and its complex regulatory network. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 9:270 (2019).
62. Majowicz S. E., Musto J., Scallan E., Angulo F. J., Kirk M., O’Brein S. J., Jones T. F.: The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin. Infect. Dis.* 50(6):882-9 (2010).
63. McKelvie N. D., Stratford R., Wu T., Bellaby T., Aldred E., Hughes N. J., Chatfield S. N., Pickard Derek., Hale C., Dougan G., Khan A. S.: Expression of heterologous antigens in *Salmonella* Typhimurium vaccine vectors using the in vivo-inducible, SPI-2 promoter, ssaG. *Vaccine.* 22(25-26):3243-55 (2004).
64. Miller S. I., Pegues D. A.: *Salmonella* species, including *Salmonella* Typhi. Principles and practice in infectious diseases. Churchill Livingstone, Philadelphia. 2344–2363 (2000).

65. Mogensen J. E., Otzen D. E.: Interactions between folding factors and bacterial outer membrane proteins. *Mol. Microbiol.* 57(2):326-46 (2005).
66. Moral C. H., del Castillo E. F., Fierro P. L., Cortes A. V., Castillo J. A., Soriano A. C.: Molecular characterization of the *Aeromonas hydrophila aroA* gene and potential use of an auxotrophic *aroA* mutant as a live attenuated vaccine. *Infect. Immun.* 66(5):1813-21 (1998).
67. Mouslim C., Hughes K. T.: The Effect of Cell Growth Phase on the Regulatory Cross-Talk between Flagellar and Spi1 Virulence Gene Expression. 10(3) (2014).
68. Nastasi A., Mammina C., Villafrate M. R., Massenti M. F. Scarlata G., Diguattro M.: Multiple typing of strains of *Salmonella enterica subsp. bongori* ser. 48:Z35:- isolated in southern Italy. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* 139(5):605-12 (1988).
69. Neutra M. R., Frey A., Kraehenbuhl J. P.: Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. *Cell.* 86(3):345-8 (1996).
70. Niess J. H., Brand S., Gu X., Landsman L., Jung S., McCormick B. A., Vyas J. M., Boes M., Ploegh H. L., Fox J. G., Littman D. R., Reinecker H. C.: CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science.* 307(5707):254-8 (2005).
71. O'Neill J., Wellcome Trust, and UK Government: Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. Lond. Wellcome Trust. Available at: https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf (2014).
72. Pradhan D., Devi Negi V.: Stress-induced adaptations in *Salmonella*: A ground for shaping its pathogenesis. *Microbiol. Res.* 229:126311 (2019).
73. Purcell, B. K., J. Pruckler, S. Clegg.: Nucleotide sequences of the genes encoding type 1 fimbrial subunits of *Klebsiella pneumoniae* and *Salmonella Typhimurium*. *J. Bacteriol.* 169:5831–5834 (1987).
74. Radtke A. L., Wilson J. W., Sarker S., Nickerson C. A.: Analysis of interactions of *Salmonella* type three secretion mutants with 3-D intestinal epithelial cells. *Plos One.* 5(12):e15750 (2010).
75. Rida, S., Caillet, J., Alix, J.H.: Amplification of a novel gene, *sanA*, abolishes a vancomycin-sensitive defect in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178, 94 (1996).

76. Sabbagh S. C., Forest C. G., Lepage C., Leclerc J. M., Daigle F.: So similar, yet so different: uncovering distinctive features in the genomes of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi. 305(1):1-13 (2010).
77. Sambrook J., Russell D.W.: Molecular Cloning, a laboratory manual (3-th edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001).
78. Sambrook J., Russell D.: Transformation of *E. coli* by Electroporation. Cold Spring Harb. Protoc. (2006).
79. Sansonetti P.: Phagocytosis of bacterial pathogens: implications in the host response. Semin. Immunol.13(6):381-90 (2001).
80. Santos R. L., Zhang S., Tsolis R. M., Kingsley R. A., Adams L. G., Bäumler A. J.: Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever. Microbes Infect. 3, 1335–1344 (2001).
81. Sarno E., Pezzutto D., Rossi M., Liebana E., Rizzi V.: A Review of Significant European Foodborne Outbreaks in the Last Decade. J. Food. Prot. 84(12):2059-2070 (2021).
82. Schierack P., Nordhoff M., Pollmann M., Weyrauch K. D., Amasheh S., Lodemann U.: Characterization of a porcine intestinal epithelial cell line for in vitro studies of microbial pathogenesis in swine. Histochem. Cell Biol. 125(3):293-305 (2005).
83. Sierro F., Dubois B., Coste A., Kaiserlian D., Kraehenbuhl J. P., Sirard J. C.: Flagellin stimulation of intestinal epithelial cells triggers CCL20-mediated migration of dendritic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98(24):13722-7 (2001).
84. Smith C., Stringer A. M., Mao C., Palumbo M. J., Wad J. T.: Mapping the Regulatory Network for *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Invasion. mBio. 7(5):e01024-16 (2016).
85. Steele-Mortimer O.: The *Salmonella*-containing vacuole: moving with the times. Curr. Opin. Microbiol. 11(1):38-45 (2008).
86. Stones D. H., Krachler A. K.: Fatal Attraction: How Bacterial Adhesins Affect Host Signaling and What We Can Learn from Them. Int. J. Mol. Sci. 16, 2626-2640 (2015).
87. Switt A. I. M., Soyer Y., Warnick L. D., Wiedmann M.: Emergence, distribution, and molecular and phenotypic characteristics of *Salmonella enterica* serotype 4,5,12:i:-. Foodborne Pathog. Dis. 6, 407–415 (2009).
88. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. Eur. Food Saf. Auth. Available at:

<https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/5500> [Accessed November 8, 2019] (2018).

89. Ugorski M., Kuźmińska-Bajor M., Kisiela D.: Rola fimbrii typu 1 w patogenezie zakażeń pałeczkami *Salmonella*. Post. Mikrobiol. 50, 1, 59-68 (2011).
90. van Asten A J. A. M., van Dijk J. E.: Distribution of "classic" virulence factors among *Salmonella spp.* FEMS Immunol. Med. Microbiol. 44(3):251-9 (2005).
91. Voetsch A. C., Van Gilder T. J., Angulo F. J., Farley M. M., Shallow S., Marcus R., Cieślak P. R., Deneen V. C., Tauxe R. V., Emerging Infections Program FoodNet Working Group: FoodNet estimate of the burden of illness caused by nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States. Clin. Infect. Dis. 38 Suppl 3:S127-34 (2004).
92. Wagner C., Hensel M.: Adhesive mechanisms of *Salmonella enterica*. Adv. Exp. Med. Biol. 715, 17–34 (2011).
93. Wallis T. S., Galyov E. E.: Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. Mol. Microbiol. 36(5):997-1005 (2000).
94. Wexler H. M.: Outer-membrane pore-forming proteins in gram-negative anaerobic bacteria. Clin. Infect. Dis. 35(1):65-71 (2002).
95. Wiedemann A., Virlogeux-Payant I., Chausse A. M., Schikora A., Velga P.: Interactions of *Salmonella* with animals and plants. Front. Microbiol. 5:791 (2015).
96. Yan S. S., Pendrak M. L., Abela-Ridder B., Punderson J. W., Fedorko D. P., Foley S. L.: An overview of *Salmonella* typing: Public health perspectives. Clinical and Applied Immunology Reviews. 4, 189-204 (2004).
97. Yoshida T., Avabe Y., Yasunaga M., Usami Y., Habe H., Nojiri H., Omori T.: Genes involved in the synthesis of the exopolysaccharide methanolan by the obligate methylotroph *Methylobacillus sp* strain 12S. Microbiology. 149(Pt 2):431-444 (2003).
98. Yue M., Rankin S. C., Blanchet R. T., Nulton J. D., Edwards R. A., Schifferli D. M.: Diversification of the *Salmonella* Fimbriae: A Model of Macro- and Microevolution. PloS One. 7(6): e38596 (2012).
99. Yue M., Schifferli D. M.: Allelic variation in *Salmonella*: an underappreciated driver of adaptation and virulence. Front. Microbiol. 4:419 (2-13) (2013).
100. Yue M., Han X., De Masi L., Zhu C., Ma X., Zhang J., Wu R., Schmieder R., Kaushki R. S., Fraser G. P., Zhao S., McDermott P. F., Weil F. X., Mainil J. G., Arze C., Fricke W. F., Edwards R. A., Brisson D., Zhang N. R., Rankin S. C., Schifferli D.

M.: Allelic variation contributes to bacterial host specificity. *Nat. Commun.* 6:8754 (2015).