

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej  
im. Ludwika Hirszfelda  
Polskiej Akademii Nauk



**mgr Eva Krzyżewska**

**Zależność pomiędzy długością części O-swoistej lipopolisacharydu  
a potencjałem patogenności bakterii z rodzaju *Salmonella***

The relationship between the O-specific region length of lipopolysaccharide  
and the virulence of bacteria from the genus of *Salmonella*

Promotor

Dr hab. Jacek Rybka, prof. PAN

Praca doktorska wykonana  
w Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej  
Zakładu Immunologii Chorób Zakaźnych

Wrocław, 2021 r.

*Dr hab. Jackowi Rybce, promotorowi niniejszej pracy  
składam serdeczne podziękowania za opiekę merytoryczną,  
cenne uwagi, cierpliwość i zaufanie.*

*Dr Katarzynie Kapczyńskiej, za wsparcie w trudnych chwilach,  
możliwość niekończących się konsultacji,  
wiarę oraz wiele życzliwych słów.*

*Współpracownikom i doktorantom, za przychylną atmosferę  
oraz wszelką pomoc, bez której ta praca nie mogłaby powstać.*

*Bartkowi za wsparcie, humor i motywację.  
Rodzicom za wiarę w moje możliwości.*

*Serdecznie dziękuję*

*Niniejszą pracę dedykuję Babci Trudzi*

## SPIS TREŚCI

<b>1. WYKAZ SKRÓTÓW .....</b>	<b>8</b>
<b>2. STRESZCZENIE .....</b>	<b>11</b>
<b>3. SUMMARY.....</b>	<b>13</b>
<b>4. WPROWADZENIE .....</b>	<b>15</b>
<b>5. WSTĘP.....</b>	<b>16</b>
<b>5.1 Charakterystyka rodzaju <i>Salmonella</i>.....</b>	<b>16</b>
<b>5.2 Chorobotwórczość bakterii z rodzaju <i>Salmonella</i>.....</b>	<b>17</b>
5.2.1 Tyfoidalne szczepy <i>Salmonella</i> .....	17
5.2.2 Nietyfoidalne szczepy <i>Salmonella</i> .....	18
5.2.3 Epidemiologia szczepów <i>Salmonella</i> .....	19
5.2.4 Lekooporność szczepów <i>Salmonella</i> .....	20
<b>5.3 Mechanizm patogenezы zakażeń bakteriami <i>Salmonella</i> .....</b>	<b>21</b>
<b>5.4 Lipopolisacharyd bakterii z rodzaju <i>Salmonella</i>.....</b>	<b>23</b>
5.4.1 Kontrola długości cząsteczki lipopolisacharydu .....	25
5.4.2 Techniki pomiaru długości cząsteczki lipopolisacharydu.....	27
<b>5.5 Interakcja lipopolisacharydu bakterii <i>Salmonella</i> z układem immunologicznym gospodarza .....</b>	<b>29</b>
5.5.1 Układ dopełniacza .....	29
5.5.2 Obrona bakterii <i>Salmonella</i> przed działaniem układu dopełniacza poprzez modyfikację cząsteczki lipopolisacharydu.....	32
5.5.2.1 Wpływ różnych typów lipopolisacharydu: R, SR, S.....	32
5.5.2.2 Modulacja długości cząsteczki lipopolisacharydu przez bakterię.....	34
5.5.2.3 Modyfikacja struktury podjednostki części O-swoistej lipopolisacharydu....	34
5.5.2.4 Badania nad wpływem długości części O-swoistej lipopolisacharydu z wykorzystaniem mutantów długościowych .....	35
5.5.3 Obrona mikroorganizmów przed układem dopełniacza poprzez wytwarzanie otoczki polisacharydowej .....	38
<b>6. CEL PRACY.....</b>	<b>39</b>
<b>7. MATERIAŁY I METODY .....</b>	<b>40</b>
7.1 Szczepy bakteryjne i warunki hodowli.....	40
7.2 Podłoża mikrobiologiczne, bufory i odczynniki ogólne .....	41
7.3 Surowica ludzka .....	44
7.3.1 Określenie poziomu przeciwciał anty- <i>Salmonella</i> w próbkach surowicy.....	44

7.3.2	Blokowanie alternatywnej drogi układu dopełniacza .....	45
7.3.3	Blokowanie klasycznej i lektynowej drogi układu dopełniacza .....	45
<b>7.4</b>	<b>Ocena wpływu surowicy ludzkiej na kształtowanie długości lipopolisacharydu ...</b>	<b>46</b>
7.4.1	Pasażowanie bakterii <i>Salmonella</i> w surowicy ludzkiej.....	46
7.4.2	Pomiar średniej długości lipopolisacharydu po kontakcie z surowicą ludzką .....	46
7.4.3	Izolacja lipopolisacharydu z bakterii <i>Salmonella</i> po kontakcie z surowicą ludzką.....	47
7.4.3.1	Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym wyizolowanych lipopolisacharydów .....	48
7.4.3.1.1	Bufory i odczynniki użyte do elektroforezy lipopolisacharydów .....	48
7.4.3.1.2	Bufory i odczynniki użyte do barwienia lipopolisacharydów.....	50
<b>7.5</b>	<b>Konstrukcja bakteryjnych mutantów chromosomalnych o różnej długości części O-swoistej lipopolisacharydu .....</b>	<b>51</b>
7.5.1	Izolacja plazmidowego DNA .....	53
7.5.2	Przygotowanie komórek elektrokompetentnych <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817 do transformacji plazmidem pKD46, kodującym system $\lambda$ Red.....	53
7.5.3	Transformacja komórek elektrokompetentnych <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817 plazmidem pKD46, kodującym system $\lambda$ Red .....	54
7.5.4	Selekcja pozytywnych kolonii <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817 z wprowadzonym plazmidem pKD46 .....	54
7.5.5	Przygotowanie liniowych fragmentów DNA do transformacji szczepu <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817 pKD46 .....	56
7.5.5.1	Izolacja genomowego DNA .....	56
7.5.5.2	Startery .....	56
7.5.5.3	Łańcuchowa reakcja polimerazy .....	57
7.5.5.4	Oczyszczanie liniowych fragmentów DNA.....	58
7.5.6	Przygotowanie komórek elektrokompetentnych <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817 pKD46 do transformacji liniowymi fragmentami DNA .....	59
7.5.7	Transformacja komórek <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817 pKD46 liniowym fragmentem DNA .....	59
7.5.8	Selekcja pozytywnych kolonii <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817 pKD46 z wbudowanym liniowym fragmentem DNA.....	59
7.5.9	Delecja kanamycynowej kasyety antybiotykooporności z wykorzystaniem rekombinazy FLP .....	60

7.5.10	Sekwencjonowanie.....	60
<b>7.6</b>	<b>Metody pomiaru średniej długości lipopolisacharydu.....</b>	<b>61</b>
7.6.1	Izolacja i oczyszczanie lipopolisacharydów.....	61
7.6.2	Derywatywacja próbek lipopolisacharydu i masy bakteryjnej do analizy cukrowej.....	62
7.6.3	Otrzymywanie acetylowanych metyloglikozydów oraz acetylowanych estrów metylowych metyloglikozydów z próbek lipopolisacharydu i masy bakteryjnej .....	62
7.6.4	Analiza GLC-MS .....	63
<b>7.7</b>	<b>Ocena modelowej patogenności <i>in vitro</i> – wpływ długości lipopolisacharydu na interakcje z układem dopełniacza.....</b>	<b>64</b>
7.7.1	Określenie poziomu przeżywalności badanych mutantów w surowicy ludzkiej... 64	
7.7.2	Określenie poziomu aktywacji układu dopełniacza przez badane szczepy bakteryjne .....	64
7.7.3	Określenie poziomu aktywacji układu dopełniacza przez izolowane typy lipopolisacharydu .....	65
7.7.4	Analiza wiązania składnika C3 układu dopełniacza przez badane szczepy bakteryjne .....	66
7.7.5	Analiza wiązania składnika C3 układu dopełniacza przez izolowane typy lipopolisacharydu .....	67
7.7.6	Analiza rozkładu składnika C3 układu dopełniacza w surowicy pod wpływem badanych szczepów bakteryjnych .....	67
7.7.6.1	Przygotowanie materiału do badań .....	67
7.7.6.2	Rozdział białek w żelu poliakrylamidowym .....	68
7.7.6.3	Transfer białek z żelu na membranę nitrocelulozową oraz detekcja.....	68
7.7.7	Analiza wiązania składnika C9 układu dopełniacza przez badane mutanty bakteryjne .....	69
7.7.8	Określenie wpływu długości lipopolisacharydu na proteolityczną aktywność białka PgtE względem składnika C3 układu dopełniacza .....	69
<b>7.8</b>	<b>Ocena modelowej patogenności <i>in vitro</i> – wpływ długości lipopolisacharydu na pochłanianie bakterii przez komórki ssacze .....</b>	<b>70</b>
7.8.1	Charakterystyka linii komórkowych .....	70
7.8.2	Barwienie komórek bakteryjnych .....	70
7.8.3	Przygotowanie linii komórkowych .....	71

<b>7.9 Ocena modelowej patogenności <i>in vivo</i> z wykorzystaniem modelu larw barciaka większego <i>Galleria mellonella</i></b> .....	<b>72</b>
7.9.1 Selekcja larw .....	72
7.9.2 Przygotowanie inokulum bakteryjnego.....	72
7.9.3 Test przeżywalności larw po iniekcji zawiesiną badanego szczepu bakteryjnego	72
<b>7.10 Wpływ rozkładu długości cząsteczek lipopolisacharydu na kształtowanie proteomu błony zewnętrznej</b> .....	<b>74</b>
7.10.1 Izolacja białek błony zewnętrznej .....	74
7.10.2 Redukcja, alkilacja oraz trawienie białek błony zewnętrznej .....	75
7.10.3 Znakowanie peptydów znacznikami izobarycznymi .....	75
7.10.4 Identyfikacja i oznaczenie ilościowe peptydów i białek .....	77
<b>7.11 Wpływ surowicy ludzkiej na kształtowanie proteomu błony zewnętrznej</b> .....	<b>78</b>
7.11.1 Izolacja białek błony zewnętrznej .....	78
7.11.2 Konstrukcja bakteryjnych mutantów chromosomalnych .....	80
<b>8. WYNIKI</b> .....	<b>82</b>
<b>8.1 Ocena wpływu surowicy ludzkiej na kształtowanie długości lipopolisacharydu</b> ...	<b>82</b>
8.1.1 Określenie poziomu przeżywalności bakterii <i>Salmonella</i> podczas pasażowania w surowicy ludzkiej. ....	82
8.1.2 Analiza średniej długości lipopolisacharydu po kontakcie z surowicą ludzką .....	84
8.1.3 Analiza rozkładu długości lipopolisacharydu po kontakcie z surowicą ludzką.....	84
<b>8.2 Konstrukcja bakteryjnych mutantów chromosomalnych o różnej długości części O-swoistej lipopolisacharydu</b> .....	<b>86</b>
<b>8.3 Pomiar średniej długości lipopolisacharydu badanych mutantów <i>S. Enteritidis</i></b> ..	<b>93</b>
8.3.1 Analiza składu cukrowego .....	93
8.3.2 Analiza średniej długości lipopolisacharydu.....	93
<b>8.4 Określenie poziomu przeciwciał anty-<i>Salmonella</i> w próbkach surowicy</b> .....	<b>101</b>
<b>8.5 Ocena modelowej patogenności <i>in vitro</i> – wpływ długości lipopolisacharydu na interakcje z układem dopełniacza</b> .....	<b>102</b>
8.5.1 Określenie poziomu przeżywalności badanych szczepów w surowicy ludzkiej..	102
8.5.2 Określenie poziomu aktywacji układu dopełniacza przez badane mutanty bakteryjne .....	110
8.5.3 Określenie poziomu aktywacji układu dopełniacza przez izolowane typy lipopolisacharydu .....	111

8.5.4	Analiza wiązania składnika C3 układu dopełniacza przez badane mutanty bakteryjne .....	112
8.5.5	Analiza wiązania składnika C3 układu dopełniacza przez izolowane typy lipopolisacharydu .....	114
8.5.6	Analiza rozkładu składnika C3 układu dopełniacza w surowicy pod wpływem badanych mutantów bakteryjnych.....	116
8.5.7	Analiza wiązania składnika C9 układu dopełniacza przez badane mutanty bakteryjne .....	117
8.5.8	Określenie wpływu długości lipopolisacharydu na proteolityczną aktywność białka PgtE względem składnika C3 układu dopełniacza .....	118
8.6	<b>Ocena modelowej patogenności <i>in vitro</i> – wpływ długości lipopolisacharydu na pochłanianie bakterii przez komórki ssacze .....</b>	<b>119</b>
8.7	<b>Ocena modelowej patogenności <i>in vivo</i> z wykorzystaniem modelu larw barciaka większego <i>Galleria mellonella</i> .....</b>	<b>121</b>
8.8	<b>Wpływ rozkładu długości cząsteczek lipopolisacharydu na kształtowanie proteomu błony zewnętrznej .....</b>	<b>125</b>
8.9	<b>Wpływ surowicy ludzkiej na kształtowanie proteomu błony zewnętrznej .....</b>	<b>130</b>
9.	<b>DYSKUSJA.....</b>	<b>137</b>
10.	<b>WNIOSKI .....</b>	<b>154</b>
11.	<b>LITERATURA .....</b>	<b>155</b>
12.	<b>SPIS RYCIN .....</b>	<b>180</b>
13.	<b>SPIS TABEL.....</b>	<b>183</b>
14.	<b>DOROBEK NAUKOWY.....</b>	<b>185</b>

## 1. WYKAZ SKRÓTÓW

<b>skrót</b>	<b>rozwińnięcie angielskie</b>	<b>rozwińnięcie polskie</b>
Abe	abequose	abekwoza
Abs	absorbance	absorbancja
APC	antigen presenting cells	komórki prezentujące antygen
APS	ammonium persulfate	nadsiarczan amonu
BSA	bovine serum albumin	surowicza albumina wołowa
CDC	Centers for Disease Control and Prevention	Centrum Kontroli i Prewencji Chorób
CFU	colony forming unit	jednostka tworząca kolonię
Da	unified atomic mass unit, dalton	zunifikowana jednostka masy atomowej, dalton
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control	Europejskie Centrum ds. Zapobiegania i Kontroli Chorób
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	kwask wersenowy
EFSA	European Food Safety Authority	Europejski Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności
EGTA	ethylene glycol-bis( $\beta$ -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid	kwask etylenoglikol-O-O'-bis(2-aminoetyl)-N,N,N',N' tetraoctowy
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay	test immunoenzymatyczny
FASP	filter-aided sample preparation	przygotowanie próbek wspomagane filtrem
FLP	flippase	flipaza
FRT	flippase recognition target	miejsce rozpoznawane przez flipazę
GLC	gas-liquid chromatography	chromatografia gazowo-cieczowa
ITS	-	inaktywowana termicznie surowica
Kdo	3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid	kwask 3-deoksy-D-manno-2-oktulozonowy
LB	lysogeny broth	bulion lizogeny
LMW-OAg LPS	low molecular weight O-antigen LPS	LPS o małej masie cząsteczkowej O-antygeny
L-OAg LPS	long O-antigen LPS	LPS z długim łańcuchem O-swoistym



LOS	lipooligosaccharide	lipooligosacharyd
LPS	lipopolysaccharide	lipopolisacharyd
MAC	membrane attack complex	kompleks atakujący błonę
Man	mannose	mannoza
MBL	mannose binding lectin	lektyna wiążąca mannozę
MDR	multidrug-resistance	wielolekooporność
MFI	mean fluorescent intensity	średnia intensywność fluorescencji
MHC	major histocompatibility complex	główny układ zgodności tkankowej
MS	mass spectrometry	spektrometria mas
MuAc	N-acetylmuramic acid	kwas N-acetylmuraminowy
m/z	mass to charge ratio	stosunek masy do ładunku
NeuAc	N-acetylneuraminic acid	kwas N-acetylneuraminowy, kwas sjałowy
NSL	-	normalna surowica ludzka
NSL/A	-	NSL z aktywną drogą alternatywną układu dopełniacza
NSL/KL	-	NSL z aktywną drogą klasyczną i lektynową układu dopełniacza
NTS	non-typhoidal <i>Salmonella</i> strains	niedurowe szczepy <i>Salmonella</i>
OMP	outer membrane proteins	białka błony zewnętrznej
PBS	phosphate buffered saline	buforowana fosforanem sól fizjologiczna
RCKiK	-	Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa
PCM	Polish Collection of Microorganisms	Polska Kolekcja Mikroorganizmów
PCP	polysaccharide co-polimers	kopolimery wielocukrów
PCR	polymerase chain reaction	łańcuchowa reakcja polimerazy
R	rough strain	szczep szorstki
Rha	rhamnose	ramnoza
RT	retention time	czas retencji
S	smooth strain	szczep gładki
SCV	<i>Salmonella</i> containing vacuole	wakuola zawierająca bakterie <i>Salmonella</i>

SDS	sodium dodecyl sulfate	sól sodowa siarczanu dodecyłu
SDS-PAGE	SDS polyacrylamide gel electrophoresis	elektroforeza w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących w obecności SDS
SOC	super optimal catabolite repression	bogata pożywka do mikrobiologicznej hodowli bakterii
SPI	<i>Salmonella</i> pathogenicity island	wyspa patogenności <i>Salmonella</i>
SR	semi-rough strain	szczep półszorstki
T1SS	type one secretion system	system sekrecji typu I
T3SS	type three secretion system	system sekrecji typu III
TBE	tris-borate-EDTA	tris-kwas borowy-EDTA
TCEP	tris(2-carboxyethyl)phosphine	tris(2-karboksyetylo)fosfina
TEAB	triethyl ammonium bicarbonate	wodorowęglan trietyloamonowy
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine	N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina
TLR	toll-like receptor	receptor toll-podobny
TMT	tandem mass tag	znacznik izobaryczny
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane	tris(hydroksymetylo)aminometan
TSS	typhoidal <i>Salmonella</i> strains	durowe szczepy <i>Salmonella</i>
Tyv	tyvelose	tyweloza
UE	European Union	Unia Europejska
WHO	World Health Organisation	Światowa Organizacja Zdrowia
WT	wild type strain	szczep dziki
VBS	veronal buffered saline	bufor weronalowy
VL-OAg LPS	very long O-antigen LPS	LPS z bardzo długim łańcuchem O-swoistym

## 2. STRESZCZENIE

Zakażenia wywołane nietyfoidalnymi szczepami *Salmonella* stanowią, obok zakażeń bakteriami *Campylobacter*, główną przyczynę zatruc pokarmowych w Unii Europejskiej i są poważnym problemem dla zdrowia publicznego. Coraz częściej, oprócz salmonelloz o typowym przebiegu, obserwuje się zakażenia prowadzące do wystąpienia objawów w postaci pozajelitowej lub posocznicy, szczególnie niebezpiecznej dla zdrowia i życia dzieci, osób starszych oraz osób z niedoborami odporności. Oporność bakterii na surowicę jest kluczowym czynnikiem zjadliwości dla rozwoju zakażeń układowych. Istotnym aspektem w procesie wirulencji bakterii *Salmonella* jest generowanie przez nie zmian w ich osłonach zewnętrznych, umożliwiających im przetrwanie i namnożenie się w skrajnie niekorzystnym środowisku. Część szczepów *Salmonella* charakteryzuje rozkład długości cząsteczek lipopolisacharydu (LPS) na powierzchni komórki, w którym wyraźnie wyróżniają się trzy frakcje. Każda z nich charakteryzuje się różną liczbą powtarzających się podjednostek polisacharydu O-swoistego: LPS o niskiej masie cząsteczkowej (LMW-OAg, posiadający do 15 podjednostek), LPS długi (L-OAg, 16-35 podjednostek) oraz LPS bardzo długi (VL-OAg, ponad 100 podjednostek). Za regulację długości części O-swoistej LPS odpowiadają geny *wzz* oraz *wzz<sub>fepE</sub>* (*fepE*). Bakterie z rodzaju *Salmonella* są w stanie modulować syntezę i strukturę LPS w celu ochrony przed litycznym działaniem układu dopełniacza. W celu dokładnego poznania mechanizmów patogenności bakterii, istotne wydaje się być charakteryzowanie interakcji zachodzących pomiędzy składnikami osłon komórkowych bakterii, a składnikami układu immunologicznego gospodarza.

W niniejszej pracy doktorskiej analizowano wpływ rozkładu długości cząsteczek LPS na powierzchni komórek *Salmonella* na jej zdolność unikania odpowiedzi układu dopełniacza gospodarza. Zbadano jak pasażowanie w surowicy ludzkiej wpływa na przeżywalność, długość wytwarzanego lipopolisacharydu oraz kompozycję proteomu błony zewnętrznej bakterii *Salmonella* O48. W celu określenia roli różnych typów LPS w mechanizmach unikania odpowiedzi immunologicznej gospodarza przez bakterie *S. Enteritidis*, skonstruowano panel chromosomalnych mutantów bakteryjnych o skróconej długości części O-swoistej LPS. Panel chromosomalnych mutantów obejmował 4 szczepy wytwarzające odpowiednio: jedną podjednostkę O-swoistą ( $\Delta wzy$ ), LMW-OAg ( $\Delta fepE \Delta wzz$ ), LMW-OAg i L-OAg ( $\Delta fepE$ ) oraz LMW-OAg i VL-OAg ( $\Delta wzz$ ). W celu dokładnej charakterystyki różnych typów LPS opracowano metodę pomiaru średniej długości części O-swoistej z wykorzystaniem chromatografii gazowo-cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas. Istotą

opracowanej metody jest analiza w badanym preparacie proporcji między ilością składnika cukrowego, występującego w powtarzających się podjednostkach części O-swoistej, a jednym ze składników rdzenia LPS. Wykorzystując panel mutantów *S. Enteritidis* oceniono wpływ długości części O-swoistej LPS na patogenność bakterii w testach *in vitro* (określenie oddziaływania ze składnikami układu dopełniacza i stopnia pochłaniania przez komórki ssacze) oraz *in vivo* (określenie poziomu modelowej patogenności z wykorzystaniem larw *Galleria mellonella*). Dodatkowo w pracy określono również wpływ długości części O-swoistej lipopolisacharydu na kształtowanie proteomu błony zewnętrznej utworzonych mutantów *S. Enteritidis*.

Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że pasażowanie bakterii *Salmonella* O48 w surowicy prowadzi do wzrostu przeżywalności bakterii oraz do zmian w ich osłonach komórkowych. Wśród białek występujących w większej ilości po dziewięciokrotnym pasażowaniu w surowicy w stosunku do szczepu przed pasażowaniem zidentyfikowano m.in. białka związane z reakcją na stres środowiskowy oraz białka związane z biosyntezą kwasów tłuszczowych. Z kolei zmiany w profilach LPS były niewielkie i widoczne głównie w frakcji L-OAg LPS. Przeprowadzona analiza panelu mutantów chromosomalnych o skróconej długości części O-swoistej LPS w testach *in vitro* wykazała kluczową rolę L-OAg LPS w ochronie bakterii *S. Enteritidis* przed litycznym działaniem surowicy. Wykazano również związek pomiędzy długością części O-swoistej LPS a właściwością proteolityczną białka PgtE. W eksperymentach z wykorzystaniem linii komórkowych wykazano natomiast zależność pomiędzy skracaniem części O-swoistej LPS a stopniem pochłaniania bakterii przez mysie makrofagi. Badania *in vivo* wykorzystujące model larw *Galleria mellonella* również wykazały, że mutanty *S. Enteritidis* o skróconej długości części O-swoistej LPS charakteryzują się różnym stopniem patogenności. Analizując proteom mutantów o skróconej długości części O-swoistej LPS wykazano, że wraz ze skracaniem LPS następuje wzrost ilości niektórych białek w porównaniu do szczepu dzikiego. Wśród białek występujących w większej ilości u badanych mutantów *S. Enteritidis* można wyróżnić m.in. białka związane z biosyntezą rzęsek oraz białka dwuskładnikowych systemów regulacyjnych.

Podsumowując, badania opisane w niniejszej rozprawie doktorskiej przyniosły szereg informacji dotyczących roli długości części O-swoistej LPS w patogenezie zakażeń bakteriami *Salmonella*. Ponadto w pracy zidentyfikowano wpływ długości lipopolisacharydu na kształtowanie proteomu błony zewnętrznej.

### 3. SUMMARY

Infections caused by non-typhoidal *Salmonella* strains are, along with *Campylobacter* infections, the main cause of food poisoning in the European Union and are a serious public health problem. In addition to the typical course of salmonellosis, an infection with *Salmonella* bacteria can often lead to a parenteral infections and sepsis, which are particularly dangerous for the health and life of children, the elderly and the people with immunodeficiency. Bacterial resistance to serum is a key virulence factor for the development of systemic infections. An important element of *Salmonella* virulence is the ability to change the structures of the outer envelopes, what allows for the survival and multiplication of bacteria in an extremely adverse environment. In the lipopolysaccharide (LPS) of some *Salmonella* strains three fractions, differing by the number of repeating subunits of the O-specific polysaccharide, can be clearly distinguished: : low molecular weight LPS (LMW-OAg, consisting of up to 15 subunits), long LPS (L-OAg, 16-35 subunits) and very long LPS (VL- OAg, over 100 subunits). The number of subunits of the O-antigen is regulated by the *wzz* and *wzz<sub>fepE</sub>* (*fepE*) genes. Bacteria of the *Salmonella* genus are able to modulate the synthesis and structure of LPS to protect the cell from the lytic action of the complement system. In order to fully understand the mechanisms of bacterial pathogenicity, it seems important to characterize the interactions occurring between the components of the bacterial cell envelopes and components of the host's immune system.

This dissertation analyzes the effect of the distribution of LPS molecules with different length located on the surface of *Salmonella* cells on its ability to evade complement response of the host. It was investigated how passaging in human serum influences the bacterial survival rate, the length of the produced lipopolysaccharide and the proteome composition of the outer membrane of *Salmonella* O48. In order to determine the role of different LPS types in the mechanisms of avoiding the host immune response by *S. Enteritidis*, a panel of chromosomal mutants with different length of the O-specific LPS part was constructed. The collection of chromosomal mutants included 4 strains producing, respectively: one O-specific subunit ( $\Delta wzy$ ), LMW-OAg ( $\Delta fepE \Delta wzz$ ), LMW-OAg and L-OAg ( $\Delta fepE$ ), LMW-OAg and VL-OAg ( $\Delta wzz$ ). In order to better characterize the different types of LPS present on the surface of the bacterial cell, and to measure the average length of the O-specific part, a method using gas-liquid chromatography was developed. The method is based on the analysis of the proportion between the amount of the sugar component present in the repeating subunits of the O-specific part and one of the components of the LPS core. Using the panel

of *S. Enteritidis* mutants, the effect of the LPS length on bacterial pathogenicity was tested *in vitro* (determination of the interaction with complement components and the degree of bacteria uptake by mammalian cells) and *in vivo* (determination of the pathogenicity level using *Galleria mellonella* larvae model). Additionally, the study also determined the influence of the length of the O-specific part of LPS on the composition of the outer membrane proteome of the created *S. Enteritidis* mutants.

The conducted experiments have shown that multiple passages of *Salmonella* O48 in serum lead to an increase in the survival rate of the bacteria and changes in their cell envelopes. Among the proteins present in greater quantity after nine-fold passaging in serum, proteins related to the response to environmental stress and proteins related to the biosynthesis of fatty acids were identified. On the other hand, the changes in the LPS profiles were small and concerned mainly L-OAg LPS. The performed *in vitro* tests with the created *S. Enteritidis* mutants showed the key role of L-OAg LPS in the protection of *S. Enteritidis* bacteria against the lytic action of serum. The relationship between the length of the O-specific portion of LPS and the proteolytic activity of the PgtE protein has been demonstrated. A relationship between the O-antigen length and the degree of bacterial uptake by mouse macrophages was also demonstrated. *In vivo* studies using the *Galleria mellonella* larvae model showed that *S. Enteritidis* mutants differ in their pathogenicity. The proteome analysis of the outer membrane proteome of the created *S. Enteritidis* mutants showed that there is an increase in the amount of some proteins produced in the tested strains compared to the wild type strain. Proteins associated with the biosynthesis of flagella and proteins of two-component regulatory systems can be distinguished among the proteins present in greater amounts in the studied *S. Enteritidis* mutants.

In summary, the research described in this doctoral dissertation provided a number of important information on the role of the O-specific chain length of LPS in the pathogenesis of *Salmonella* bacteria. Moreover, the study characterized the effect of lipopolysaccharide length on the composition of the outer membrane proteome.

## 4. WPROWADZENIE

Wyniki zaprezentowane w niniejszej rozprawie doktorskiej są kontynuacją badań prowadzonych przy współpracy z zespołem prof. Gabrieli Bugli Płoskońskiej z Zakładu Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego. Dotychczasowe badania skupiały się na charakteryzowaniu mechanizmów oporności bakterii Gram-ujemnych wobec układu immunologicznego gospodarza [1–6]. Część badań poświęcona była bakteriom *Salmonella* z grupy serologicznej O48, której charakterystyczną cechą jest obecność kwasu N-acetylneuraminowego (ang. N-acetylneuraminic acid, NeuAc) – kwasy sjałowego w strukturze antygeny O-swoistej. Jeden z mechanizmów obronnych bakterii, chroniący przed litycznym działaniem układu dopełniacza polega na wydłużaniu przez bakterie długości części O-swoistej lipopolisacharydu (ang. lipopolysaccharide, LPS) [7]. Analiza poziomu kwasu sjałowego i jego porównanie do komponentu występującego w strukturze cząsteczki lipopolisacharydu w stałej ilości, umożliwia określenie średniej długości części O-swoistej LPS. We wcześniejszych pracach zespołu wykazano, że bakterie *Salmonella* O48 charakteryzują się zróżnicowanym poziomem wrażliwości na surowicę [3,4]. Próba ustalenia czy długość cząsteczki LPS jest bezpośrednio związana z poziomem oporności na surowicę ludzką u szczepów *Salmonella* O48 nie wykazała takiej korelacji [1]. Uzyskane przez zespół wyniki wykazały, że długość części O-swoistej LPS nie odgrywa kluczowej roli w zjawisku oporności *Salmonella* O48 na bakteriobójczą aktywność surowicy [1]. W późniejszych badaniach wykazano, że szczepy *Salmonella* O48 w wyniku przedłużonej ekspozycji na surowicę ludzką nabywają oporność na jej działanie. Ponadto porównanie profili rozdziału cząsteczek LPS na żelu poliakrylamidowym, przed i po pasażowaniu w surowicy, wykazało różnice w proporcjach pomiędzy poszczególnymi regionami części O-swoistej [5]. Obok bakterii *Salmonella* O48, drugim serowarem badanym pod kątem mechanizmów warunkujących oporność na lityczne działanie układu dopełniacza był serowar Enteritidis. Uzyskane przez zespół wyniki wskazują, że szczepy kliniczne *S. Enteritidis* izolowane od pacjentów w Polsce różnią się między sobą poziomem wrażliwości na działanie surowicy ludzkiej i charakteryzują się podobnym rozkładem długości części O-swoistej LPS [6]. Autorzy wykazali, że szczepy różniące się poziomem wrażliwości na działanie 75% surowicy ludzkiej wykazują różnice w kompozycji proteomu błony zewnętrznej, które warunkują przetrwanie w środowisku surowicy [6]. Niniejsza rozprawa doktorska jest kontynuacją powyższych badań i ma na celu określenie roli długości części O-swoistej LPS bakterii z rodzaju *Salmonella* w procesach patogenezy.

## 5. WSTĘP

### 5.1 Charakterystyka rodzaju *Salmonella*

Bakterie z rodzaju *Salmonella* są Gram-ujemnymi, fakultatywnie beztlenowymi pałeczkami należącymi do rodziny *Enterobacteriaceae*. Średnica komórki bakteryjnej waha się od około 0,7  $\mu\text{m}$  do 1,5  $\mu\text{m}$ , natomiast długość od 2  $\mu\text{m}$  do 5  $\mu\text{m}$ . Większość szczepów *Salmonella* porusza się dzięki peritrichalnemu urzęsieniu. Bakterie z rodzaju *Salmonella* posiadają bardzo szeroki zakres gospodarzy i są względnie wewnątrzkomórkowymi patogenami o ogólnoświatowym znaczeniu epidemiologicznym. Bakterie *Salmonella* występują powszechnie w środowisku naturalnym, można je wyizolować między innymi z gleby, wody oraz powierzchni roślin [8].

W ostatnich latach nomenklatura rodzaju *Salmonella* była przedmiotem wielu dyskusji i kontrowersji. Obecnie większość centrów referencyjnych na świecie, w tym amerykańskie Centrum Kontroli i Prewencji Chorób (ang. Centers for Disease Control and Prevention, CDC) przyjmuje system nazewnictwa bakterii rekomendowany przez Światową Organizację Zdrowia (ang. World Health Organisation, WHO). System ten klasyfikuje bakterie z rodzaju *Salmonella*, na podstawie różnic w analizie sekwencji 16s rRNA, na dwa gatunki: *Salmonella enterica* (*S. enterica*) oraz *Salmonella bongori* (*S. bongori*) [9,10]. Gatunek *S. enterica* jest dalej dzielony na sześć podgatunków w oparciu o charakterystykę biochemiczną oraz pokrewieństwo filogenetyczne (tabela 1). Dodatkowo, na podstawie analiz detereminant antygenowych (antygen somatyczny O, rzęskowy H, otoczkowy K), bakterie z rodzaju *Salmonella* dzieli się na serowary. Według opracowanego w 2010 roku przez WHO schematu Kauffmann-White-Le Minor wyróżniamy 2610 serowarów *Salmonella* [11]. Jednak liczba ta najprawdopodobniej jest znacznie wyższa, ponieważ wciąż odkrywane są nowe serowary.



Tabela 1. Podział systematyczny rodzaju *Salmonella*.

Rodzaj	Gatunek	Podgatunek (ang. subspecies)
<i>Salmonella</i>	<i>S. enterica</i>	I subsp. <i>enterica</i>
		II subsp. <i>salamae</i>
		III subsp. <i>arizonae</i>
		IIIa subsp. <i>diarizonae</i>
		IV subsp. <i>houtenae</i>
		V subsp. <i>indica</i>
	<i>S. bongori</i>	

## 5.2 Chorobotwórczość bakterii z rodzaju *Salmonella*

Bakterie z rodzaju *Salmonella* należą do najczęściej izolowanych patogenów, przenoszących się poprzez żywność. Główna droga transmisji bakterii *Salmonella* to droga fekalno-oralna. Do zakażenia może dojść po spożyciu skażonej wody lub żywności. Do głównych produktów spożywczych, w których wykrywa się bakterie *Salmonella* należą: mięso drobiu, trzody chlewnej i bydła, jaja oraz produkty mleczne. Bakterie *Salmonella* charakteryzują się dużą odpornością na wysychanie i mogą występować również w suszonych owocach lub suszonych produktach zwierzęcych. Do innych źródeł, w których wykrywa się bakterie *Salmonella* zalicza się świeże owoce i warzywa. Do zakażenia dochodzi w wyniku nieprawidłowego przygotowania potraw, bez przestrzegania podstawowych zasad higieny [9,12]. Infekcja bakteriami *Salmonella* może rozwinąć się również w wyniku bezpośredniego kontaktu z kałem zakażonych zwierząt. Bakterie te cechuje bowiem bardzo szeroki zakres gospodarzy do którego oprócz ludzi, można zaliczyć: świnie, koty, psy, gady, płazy, ptaki i owady [8]. Zakażenie bakteriami *Salmonella* może prowadzić do różnych objawów klinicznych. U ludzi możemy wyróżnić: dur brzuszny, dur rzekomy oraz salmonellozy. W oparciu o wywoływane objawy kliniczne szczepy *Salmonella* można podzielić na durowe (ang. Typhoidal *Salmonella* strains, TSS) i niedurowe szczepy *Salmonella* (ang. Non-typhoidal *Salmonella* strains, NTS).

### 5.2.1 Tyfoidalne szczepy *Salmonella*

Do czynników etiologicznych wywołujących dur brzuszny zaliczamy szczepy *Salmonella* Typhi (*S. Typhi*), natomiast dur rzekomy wywołwany jest przez bakterie *Salmonella* Paratyphi (*S. Paratyphi*) z grupy A, B i C. Bakterie *S. Typhi* i *S. Paratyphi* wywołują infekcje

wyłącznie u ludzi, do zakażenia dochodzi w wyniku spożycia żywności lub wody skażonej odpadami zarażonych osób. Objawy oraz przebieg choroby są podobne dla obu jednostek chorobowych. Okres inkubacji choroby wynosi 7 dni lub dłużej, z objawami prodromalnymi takimi jak ból głowy i brzucha oraz biegunka [13]. Podczas choroby występuje specyficzna, powoli narastająca gorączka, charakteryzująca się w pierwszym tygodniu temperaturą ciała w zakresie od 37,5°C do 38,2°C, narastającą do 41,5°C w drugim tygodniu choroby [14]. Oprócz gorączki u chorych mogą wystąpić powiększenie wątroby i śledziona oraz bóle mięśni. W niektórych przypadkach występuje dodatkowo rumieniowa plamisto-grudkowa wysypka zlokalizowana na skórze klatki piersiowej i nadbrzusza [15]. W większości przypadków śmierć chorego następuje w wyniku perforacji jelit i zapalenia otrzewnej lub w wyniku ciężkiej encefalopatii [16].

### 5.2.2 Nietyfoidalne szczepy *Salmonella*

Do nietyfoidalnych szczepów *Salmonella* zaliczamy szczepy inne niż *S. Typhi* i *S. Paratyphi*. NTS są czynnikiem etiologicznym salmonelloz, które mogą przebiegać pod różnymi postaciami klinicznymi. Najbardziej rozpowszechnioną postacią infekcji jest postać żołądkowo-jelitowa. W porównaniu do infekcji wywołanych przez TSS, okres inkubacji choroby wywołanej przez NTS jest znacząco krótszy i wynosi około 24 godziny. Zakażeniu towarzyszą takie objawy jak gwałtowna biegunka, wymioty, nudności, skurcze brzucha i bóle mięśni. Dodatkowo może występować gorączka, która jednak nie przekracza 39°C. Objawy choroby są zwykle samoograniczające i infekcja ustępuje w ciągu kilku dni od zakażenia. Należy jednak zaznaczyć, że pacjenci z obniżoną odpornością, osoby starsze lub dzieci do 5 roku życia są bardziej podatni na infekcje NTS i u nich mogą rozwijać się cięższe objawy choroby [17,18]. Choć w większości przypadków NTS wywołują u ludzi zapalenie żołądka i jelita, infekcje NTS mogą przybrać również postać bakteriemii lub postać pozajelitową (narządową). Głównym objawem manifestującym obecność bakterii we krwi jest wysoka gorączka. W skrajnych przypadkach bakteremia może prowadzić do wstrząsu septycznego z wysoką śmiertelnością. Bakteremia rozwija się u około 5% pacjentów zakażonych NTS. W niektórych przypadkach może dojść do powikłań pozajelitowych, w przebiegu których bakterie po dostaniu się do narządów mogą spowodować zapalenie dróg żółciowych, płuc, wsierdzia lub opon mózgowych [19,20].

### 5.2.3 Epidemiologia szczepów *Salmonella*

Infekcje wywołane bakteriami *Salmonella* stanowią poważny problem dla zdrowia publicznego. Zakażenia nietyfoidalnymi szczepami *Salmonella* są jednymi z najbardziej rozpowszechnionych na świecie. Corocznie notuje się około 94 miliony przypadków salmonelloz, z czego około 155 tysięcy kończy się zgonem [18]. Jednak śmiertelność z powodu salmonelloz ogranicza się głównie do krajów rozwijających się. Należy zaznaczyć, że liczba zakażeń jest prawdopodobnie niedoszacowana, ponieważ większość przypadków salmonellozy nie jest zgłaszana ze względu na krótki przebieg choroby oraz brak hospitalizacji [21]. Bakterie *Salmonella* stanowią obok bakterii *Campylobacter* główną przyczynę zatruc pokarmowych w Unii Europejskiej (ang. European Union, UE). W 2017 roku w krajach UE odnotowano 91 622 przypadków zakażeń wywołanych bakteriami *Salmonella*, z czego 10,6% przypadków odnotowano w Polsce. W UE do pięciu najczęściej izolowanych od ludzi szczepów należą: *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, monofazowa *S. Typhimurium* 1.4.[5].12:i:-, *S. Infantis* oraz *S. Newport*. *S. Enteritidis* jest również najczęściej izolowanym w praktyce klinicznej serowarem w Polsce [22–24]. W ciągu ostatnich 5 lat liczba notowanych zakażeń NTS w Polsce utrzymuje się średnio na poziomie około 9 tysięcy przypadków (tabela 2). Z kolei poziom hospitalizacji utrzymuje się średnio na poziomie 70% [24,25].

Tabela 2. Salmonellozy w Polsce w latach 2015-2019.

Rok	Liczba przypadków		
	zatrucia pokarmowe	inne zakażenia pozajelitowe	posocznica
2015	8 420	100	132
2016	9 701	131	195
2017	9 710	118	172
2018	9 651	127	177
2019	8 919	121	193

W przeciwieństwie do nietyfoidalnych szczepów *Salmonella*, szczepy tyfoidalne powodują infekcje o dużej śmiertelności i występują głównie w krajach słabo rozwiniętych [9,26]. Według WHO rocznie notuje się 22 miliony przypadków infekcji wywołanych przez tyfoidalne szczepy *Salmonella*, z czego około 200 tysięcy kończy się zgonem [27].

Pomimo stosowanej antybiotykoterapii śmiertelność wywołana dudem może sięgać nawet 7%. Dur brzuszny jest szeroko rozpowszechniony na obszarach o gorącym klimacie i niskim poziomie sanitarno-higienicznym. Bakterie *S. Typhi* są izolowane z obszarów Afryki Saharyjskiej, Indonezji, Ameryki Łacińskiej oraz Azji Południowej i Południowowschodniej [28]. W Polsce w 2019 roku odnotowano 3 przypadki duru brzuszego oraz 2 przypadki duru rzekomego. Należy jednak zaznaczyć, że przypadki duru w większości europejskich krajów, w tym w Polsce, związane są z turystyką, a choroba jest importowana przez podróżujących wracających z terenów endemicznych [23,25].

#### 5.2.4 Lekooporność szczepów *Salmonella*

Szacuje się, że patogeny odporne na działanie antybiotyków są przyczyną około 2 milionów zachorowań i 23 tysięcy zgonów rocznie w Stanach Zjednoczonych [29]. Narastająca oporność na antybiotyki stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego na całym świecie. Większość zakażeń NTS ma łagodny i samoograniczający się przebieg, jednak w niektórych przypadkach infekcja może być poważniejsza i wymagać antybiotykoterapii. W przypadku ostrych zakażeń bakteriami *Salmonella* zaleca się podawanie antybiotyków o szerokim spektrum działania. Cefalosporyny III generacji są zalecane dla dzieci, natomiast do leczenia infekcji osób dorosłych zaleca się podawanie fluorochinolonów. Dane epidemiologiczne wskazują na wzrost ogólnej oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe wśród szczepów *Salmonella*. Z raportu CDC na temat oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe bakterii odzwierzęcych wynika, że w 2018 roku przebadano 23% klinicznych szczepów *Salmonella* w kierunku oporności na jeden lub więcej antybiotyków. Wykazano, że przebadane szczepy charakteryzowały się największą opornością na sulfonamidy/sulfametoksazol (30,5%), tetracyklinę (28,8%), ampicylinę (25,9%) oraz ciprofloksacynę (12,5%) [30]. Oporność na cefotaksym oraz ceftazydym została odnotowana u odpowiednio 1,5% i 1,2% przebadanych szczepów. Spośród wszystkich przebadanych szczepów 28,5% sklasyfikowano jako wielolekooporne (ang. multidrug-resistance, MDR). Wielolekooporność była najbardziej rozpowszechniona wśród monofazowej *S. Typhimurium* (80,5%), podczas gdy wśród *S. Enteritidis* tylko 3,5% przebadanych szczepów charakteryzowało się fenotypem MDR [30].

### 5.3 Mechanizm patogenezy zakażeń bakteriami *Salmonella*

Nietyfoidalne i tyfoidalne szczepy *Salmonella* posiadają częściowo pokrywający się zestaw czynników wirulencji, który umożliwia bakterii inwazję oraz przetrwanie w organizmie gospodarza. Około 90% genomu bakterii *S. Typhi* oraz *S. Typhimurium* jest identyczna. Większość genów kodujących najważniejsze czynniki wirulencji zlokalizowana jest w konserwatywnych odcinkach DNA tzw. wyspach patogenności (ang. *Salmonella* pathogenicity island, SPI) i plazmidzie wirulencji pSLT [31]. Nie wszystkie serotypy charakteryzują się obecnością wszystkich poznanych 23 SPI. Wyspy patogenności SPI-1 - SPI-5 są wspólne dla wszystkich serowarów *S. enteritica* i wykazano ich udział w procesie patogenezy szczepów *S. Typhimurium*. Do głównych czynników wirulencji bakterii *Salmonella* możemy zaliczyć między innymi: adhezyny, system sekrecji typu trzeciego, fimbrie, białka błony zewnętrznej (ang. outer membrane proteins, OMP) oraz LPS [32]. Do zakażenia NTS dochodzi najczęściej na drodze fekalno-oralnej. Zanim jednak bakterie dotrą do docelowych komórek gospodarza w jelicie cienkim, muszą przetrwać w niskim pH żołądka. Mechanizm tolerancji na kwas, umożliwiający bakteriom przetrwanie w żołądku gospodarza polega na utrzymywaniu wyższego pH wewnątrzkomórkowego w stosunku do pH środowiska [33]. Po przedostaniu się przez warstwę śluzu obecną w jelitach dochodzi do kontaktu bakterii *Salmonella* z nabłonkiem. Uważa się, że adhezja do tkanek żywiciela jest jednym z kluczowych wydarzeń podczas patogenezy. Wykazano, że bakterie *Salmonella* są zdolne do kolonizacji zdrowego gospodarza, jednak prawdopodobieństwo kolonizacji wzrasta w okresach immunosupresji lub stresu fizjologicznego [34]. Przyleganie komórek bakteryjnych do komórek gospodarza uwarunkowane jest m.in. przez fimbrie i adhezyny. Bakterie *Salmonella* wydają się preferencyjnie przylegać i wnikać do komórek M kępek Peyera, ale możliwa jest również bezpośrednia inwazja enterocytów oraz bezpośrednie pobieranie bakterii przez komórki dendrytyczne z błony śluzowej. Pomimo zidentyfikowanych 13 *loci* dla fimbrii, w proces adhezji bakterii *Salmonella* do komórek epitelialnych gospodarza zaangażowane są tylko fimbrie typu I, fimbire curli, fimbrie Lpf, fimbrie Std i fimbrie Pef [33]. Wśród adhezyn zaangażowanych w proces adhezji bakterii *S. Typhimurium* do komórek gospodarza warto wymienić białko MisL - odpowiedzialne za wiązanie fibronektyny [35] oraz białka SiiE i BapA. Białko SiiE jest wydzielane przez system sekrecji typu I (ang. type one secretion system, T1SS) i pośredniczy w adhezji zależnej od kontaktu z komórkami nabłonkowymi [36]. Główną rolą białka BapA jest udział w tworzeniu biofilmu, wykazano również, że szczep pozbawiony adhezyny BapA charakteryzował się

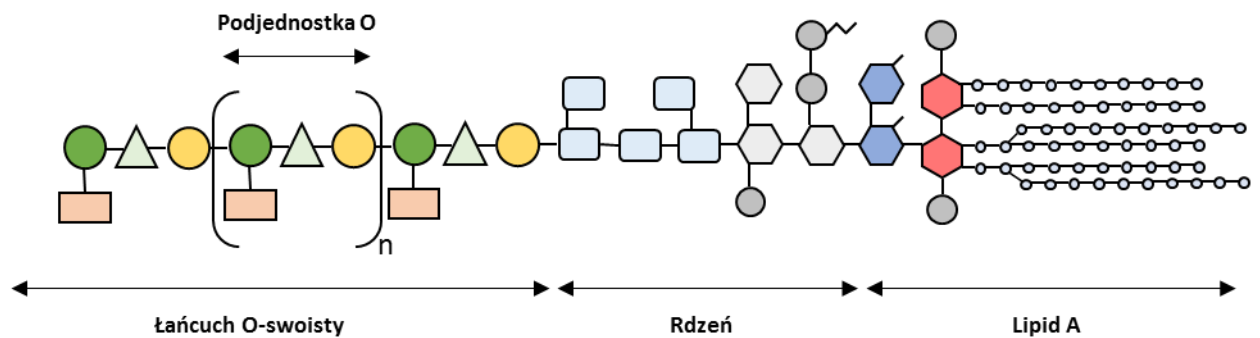
zmniejszoną zdolnością do kolonizacji nabłonka jelitowego [37]. Dodatkowo proces adhezji wzmocniony jest przez ruchliwość i chemotaksję komórki bakteryjnej. Wykazano, że szczepy pozbawione zdolności do chemotaksji oraz pozbawione funkcjonalnych fimbrii charakteryzowały się zmniejszoną zdolnością adhezji do komórek nabłonka we wczesnej fazie zakażenia [38]. Po rozpoznaniu i przyłączeniu do komórek M kępek Peyera bakterie *Salmonella* rozpoczynają proces inwazji, polegający na aktywacji białek efektorowych i przebudowie cytoszkieletu. W proces inwazji zaangażowane są głównie białka bakteryjne, kodowane przez SPI-1 oraz białka kodujące system sekrecji typu III (ang. type three secretion system, T3SS). Zainicjowanie przebudowy cytoszkieletu oraz wywołanie odpowiedzi prozapalnej u gospodarza przypisuje się białkom efektorowym SopE oraz SigD, które pełnią funkcję aktywatorów GTPaz. Białko SopE jest odpowiedzialne za aktywację białek gospodarza Cdc42 i Rac-1, z kolei białko SigD aktywuje GTPazę RhoG. W wyniku aktywacji kaskady sygnałowej dochodzi do reorganizacji cytoszkieletu aktynowego, przeprogramowania ekspresji genów gospodarza poprzez czynnik transkrypcyjny NF- $\kappa$ B, ekspresji cytokin prozapalnych (IL-8, TNF- $\alpha$ ), co w konsekwencji prowadzi do zapalenia błony śluzowej [26, 32]. W wyniku reorganizacji cytoszkieletu dochodzi do pochłonięcia komórek bakteryjnych przez komórki gospodarza. Białko SipA zwiększa akumulację i stabilizuje filamenty aktynowe, hamując ich depolimeryzację na wczesnych etapach infekcji [40]. Wywołana nadreaktywność szklaków zapalnych może wpływać na obniżenie zdolności do przetrwania bakterii *Salmonella* w organizmie gospodarza. W związku z powyższym bakterie *Salmonella* regulują poziom reakcji zapalnej poprzez wydzielanie antagonistycznych, przeciwzapalnych efektorów. Białko efektorowe SptP, hamuje aktywację białek Cdc42 i Rac-1, hamując przebudowę cytoszkieletu oraz odpowiedź indukowaną przez białka SopE oraz SigD [41]. Z kolei białko SpvC zmniejsza ekspresję cytokin prozapalnych [42]. Efektem procesu inwazji i reorganizacji cytoszkieletu jest powstanie wakuoli zawierających bakterie *Salmonella* (ang. *Salmonella*-containing-vacuole, SCV) [43]. W SCV następuje replikacja komórek bakteryjnych przy jednoczesnej rekrutacji fagocytów z przestrzeni podśluzówkowej do światła jelita. Białka efektorowe SigD oraz SsaB chronią SCV przed degradacją na drodze fuzji z lizosomami. Dojrzałe SCV po przejściu przez nabłonek zostają pochłonięte przez fagocyty i dochodzi do przemieszczenia się bakterii przez krwiobiegi do wątroby i śledziony [44].

#### 5.4 Lipopolisacharyd bakterii z rodzaju *Salmonella*

LPS stanowi integralny składnik błony zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych (pokrywa około 70% powierzchni). LPS ma podstawowe znaczenie dla funkcjonowania drobnoustroju i stanowi jeden z najważniejszych czynników wirulencji bakterii Gram-ujemnych [45,46]. W budowie LPS możemy wyróżnić trzy regiony: lipid A, rdzeń oraz łańcuch O-swoisty (O-antygen) zbudowany z powtarzających się jednostek polisacharydowych, tzw. podjednostek O-swoistych (rycina 1). Wśród bakterii można wyróżnić tzw. szczepy gładkie (ang. smooth strain, S), które wytwarzają kompletny LPS, składający się z wszystkich trzech regionów oraz szczepy półszorstkie (ang. semi-rough strain, SR), które różnią się od szczepów S obecnością tylko jednej podjednostki w części O-swoistej LPS. Można również wyróżnić tzw. szczepy szorstkie (ang. rough strain, R), które syntetyzują tzw. lipooligosacharyd (ang. lipooligosaccharide, LOS), który jest pozbawiony części O-swoistej.

Proces biosyntezy LPS jest podzielony na kilka niezależnych od siebie etapów a synteza poszczególnych składników zachodzi w różnych miejscach w komórce bakteryjnej. Wykazano podobieństwo dla genów i białek biorących udział w procesie biosyntezy LPS, opisanych dla *Escherichia coli* (*E. coli*), dla innych bakterii Gram-ujemnych [47–49]. Za kotwiczenie cząsteczki LPS w błonie zewnętrznej odpowiada lipid A. Najbardziej konserwatywną częścią lipidu A jest część cukrowa, najczęściej zbudowana z dwóch cząsteczek glukozaminy połączonych wiązaniem  $\beta(1\rightarrow6)$  glikozydowym, podstawionych nierozgałęzionymi, nasyconymi kwasami tłuszczowymi (2-hydroksykwas, 3-hydroksykwas), które nadają cząsteczce charakter amfifilowy [45]. Z uwagi na swoją unikatową budowę lipid A determinuje aktywność biologiczną LPS i stanowi centrum toksyczności cząsteczki. Dodatkowe modyfikacje mogą wpływać na heterogenność struktury lipidu A u różnych gatunków bakterii [51–53]. Lipid A bakterii z rodzaju *Salmonella* zbudowany jest z dwóch reszt glukozamin  $\rightarrow6$ - $\beta$ -D-GlcpN4P-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-GlcpN-(1-P, podstawionych 12-14-węglowymi 3-hydroksykwasami tłuszczowymi [54,55]. Liczba łańcuchów acylowych oraz liczba podstawianych do cząsteczek glukozaminy hydrofilowych podstawników jest regulowana przez dwa globalne systemy regulacyjne PhoP/PhoQ oraz PmrA/PmrB [51,56]. Lipid A połączony jest z rdzeniem oligosacharydowym kwasolabilnym wiązaniem ketozydowym, utworzonym pomiędzy resztą glukozaminy a dystalną resztą kwasu 2-keto-3-deoksy-*D*-manno-oktulozonowego (Kdo). Rdzeń LPS można podzielić na region wewnętrzny, w skład którego wchodzi heptozy oraz region zewnętrzny, w obrębie którego występują głównie heksozy. Łańcuch O-swoisty stanowi najbardziej eksponowaną

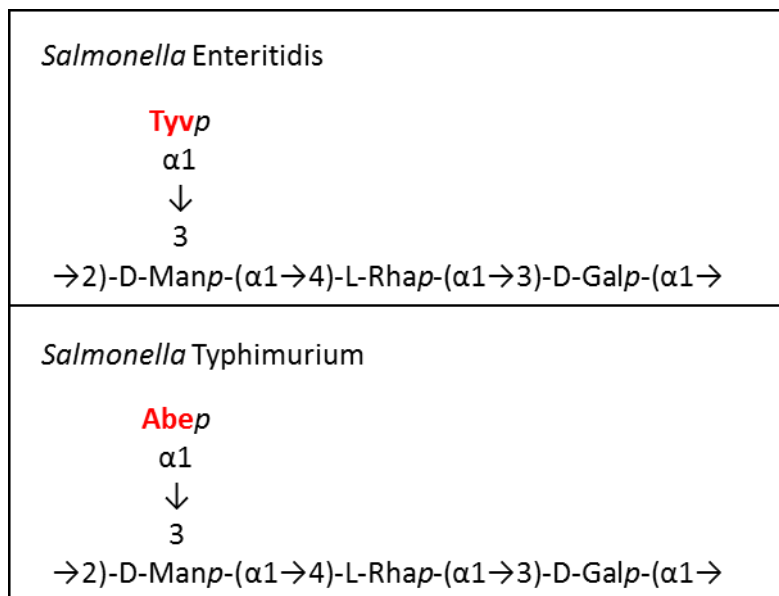
do środowiska część LPS. Najczęściej jest zbudowany z kilkudziesięciu powtarzających się podjednostek polisacharydowych różnych reszt cukrowych. Tą część LPS charakteryzuje duży stopień zmienności, związany z charakterem chemicznym podjednostek węglowodanowych wchodzących w jego skład. Antygeny O charakteryzują się ogromną różnorodnością, mogą różnić się od siebie składem i sekwencją ułożenia cukrów, typem wiązań między nimi, rozgałęzieniami bocznymi lub zawartością niecukrowych podstawników [45,57,58]. Dotychczas scharakteryzowano ponad 50 antygenów O dla bakterii *S. enterica* [50,58]. Strukturę antygeny O dwóch najczęściej izolowanych w Polsce szczepów *Salmonella* przedstawiono na rycinie 2.



Legenda	
Tyweloza	Heksoza
Mannoza	Heptoza
Ramnoza	Kdo
Galaktoza	Glukozamina
Reszty fosforanowe	Kwas tłuszczowy

Rycina 1. Ogólna budowa lipopolisacharydu.





Rycina 2. Struktura podjednostki antygeny O szczepów *S. Enteritidis* oraz *S. Typhimurium*. Tyv-tyweloza, Abe-abekwoza, Gal-galaktoza, Rha-ramnoza, Man-mannoza.

#### 5.4.1 Kontrola długości cząsteczki lipopolisacharydu

Wykazano, że w preparatach LPS wyizolowanych z tego samego szczepu bakterii występują populacje cząsteczek o wysoce zróżnicowanej masie cząsteczkowej, związanej z różną liczbą podjednostek polisacharydu O-swoistego [59–61]. W przypadku szczepów *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium* możemy wyróżnić frakcję cząsteczek LPS o małej masie cząsteczkowej (ang. low molecular weight O-antigen LPS, LMW-OAg LPS) – posiadającą antygen O zbudowany z mniej niż 15 powtarzających się podjednostek, frakcję LPS z długim łańcuchem O swoistym (ang. long O antigen LPS, L-OAg LPS) zbudowanym z 16-35 powtarzających się podjednostek oraz frakcję LPS z bardzo długim łańcuchem O swoistym (ang. very long O antigen LPS, VL-OAg LPS) zbudowanym z ponad 100 powtarzających się podjednostek. Taki rozkład długości cząsteczek LPS spowodowany jest obecnością genów odpowiedzialnych za kontrolę długości antygeny O. Genom zaangażowanym w proces kontroli długości przypisywano różne nazwy m.in. *rol* (ang. regulator of O-antigen length) oraz *cll* (ang. chain length determinant) [62,63]. Obecnie dla genu odpowiedzialnego za regulację długości L-OAg LPS stosuje się nazwę *wzz*, natomiast dla genu odpowiedzialnego za syntezę VL-OAg LPS *wzz<sub>fepE</sub>* (lub *fepE*) [64,65]. Wykazano, że wśród bakterii *Enterobacteriaceae* LPS często występuje w trzech zróżnicowanych frakcjach

długościowych, jednak VL-OAg LPS ze względu na trudności w detekcji często nie zostaje rozpoznany [65-70].

Regulacja długości łańcucha O-swoistego jest wewnętrznie określona przez sam regulator (WzzB, WzzFepE) niezależnie od ogromnych różnic w strukturze chemicznej poszczególnych substratów, z których budowany jest antygen O u różnych gatunków bakterii. Białka regulujące długość antygeny O należą do nadrodziny białek bakteryjnych, znanych jako kopolimery wielocukrów (ang. polysaccharide co-polimers, PCP) [71–73]. PCP odpowiedzialne za procesowanie antygeny O zbudowane są z dwóch transmembranowych helis oraz jednej domeny peryplazmatycznej. Wykazano, że białko WzzB z *S. Typhimurium* oraz białko FepE z *E. coli* są montowane w oligomery o różnym składzie i przyjmują podobne trójwymiarowe struktury, mimo niewielkiego stopnia identyczności w sekwencji. Być może oba białka wykorzystują wspólny molekularny mechanizm do kontrolowania długości łańcucha polisacharydowego [73]. Polimeraza Wzy jest białkiem odpowiedzialnym za przenoszenie złożonych podjednostek O do rosnącego łańcucha antygeny O. Carter i wsp., badając mechanizm regulacji długości części O-swoistej LPS nie wykazali interakcji pomiędzy regulatorem długości WzzB a polimerazą Wzy [74]. Z kolei Woodward i wsp. wykazali, że długość dojrzałego antygeny zależy wyłącznie od obecności polimerazy Wzy i regulatora długości Wzz, ale również nie zaobserwowali wyraźnej interakcji pomiędzy badanymi białkami [75]. Inny model regulacji długości łańcuchów O-swoistych zakłada, że białka Wzz regulują długość powstającego antygeny O poprzez utrzymywanie wzrastającego łańcucha O-swoistego w konformacji umożliwiającej dalszą polimeryzację, zapobiegając przedwczesnemu uwolnieniu rosnącego polisacharydu. W momencie, kiedy antygen O osiągnie liczbę powtarzających się podjednostek, które nie mogą już być dłużej związane przez białka Wzz, dochodzi do zmiany konformacji i białka regulujące długość dysocjują. [76]. Nie jest jasny mechanizm funkcjonowania systemu kontroli odpowiedzialnego za powstanie cząsteczek LPS o określonej długości. Dwie hipotezy dotyczące regulacji procesu syntezy cząsteczki lipopolisacharydu obejmują z jednej strony koncepcję „zegara molekularnego” (ang. molecular clock), regulującego polimeryzację poprzez czas trwania reakcji [63] oraz „molekularnej linijki” (ang. molecular ruler), gdzie proces powstawania nowego łańcucha zatrzymuje się wraz z osiągnięciem jego zadanej długości [73]. King i wsp. wykazali jednak, że na długość powstającego łańcucha O-swoistego mogą wpływać również enzymy zaangażowane w biosyntezę O-antygeny (WbdA, WbdD) [77]. Z kolei McConnell i Wright wykazali, że długość i rozkład antygeny O *Salmonella* Anatum są zależne od temperatury wzrostu. Podczas gdy komórki *S. Anatum* syntetyzują LPS

gładki w 37°C, w niższej temperaturze (20-25°C) dochodzi również do syntezy półszorstkiego LPS [78]. Delgado i wsp. wykazali, że u *S. Typhimurium* ekspresja genu *wzz* jest indukowana w medium hodowlanym zawierającym jony  $Mg^{2+}$  oraz  $Fe^{3+}$  [79]. Bravo i wsp. wykazali, że u *S. Typhimurium* i *S. Enteritidis* produkcja części O-swoistej lipopolisacharydu jest zależna od fazy wzrostu [7]. Pawlak i wsp. wykazali, że przedłużona ekspozycja szczepów *Salmonella* O48 na surowicę ludzką wpływa na długość powstającego antygeny O [5]. Silva-Valenzuela i wsp. wykazali, że u *S. Enteritidis* rozkład długości łańcuchów O-swoistych jest zależny od dostępności tlenu [80]. Pomimo, że istnieją pewne przesłanki na temat mechanizmów regulacji długości łańcuchów O-swoistych, niewiele jest informacji na temat proporcji łańcuchów LPS o różnej długości na powierzchni komórki bakteryjnej.

#### 5.4.2 Techniki pomiaru długości cząsteczki lipopolisacharydu

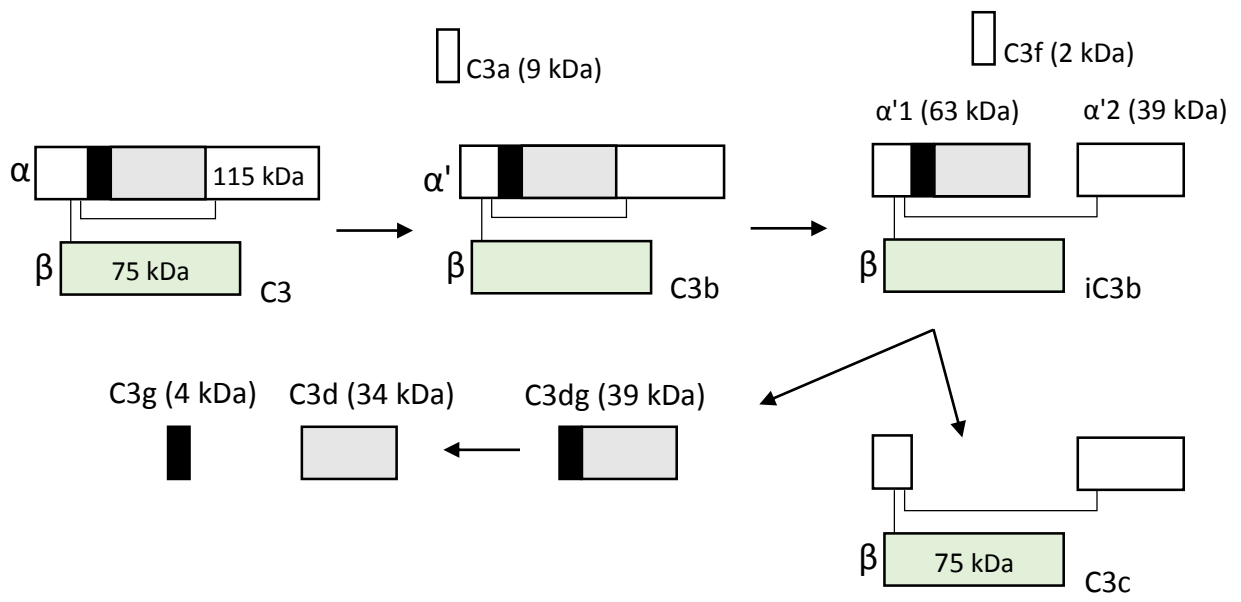
LPS charakteryzuje się dużą zmiennością strukturalną oraz zmienną liczbą powtarzających się podjednostek O-swoistych. Cząsteczki LPS mają tendencję do tworzenia agregatów o różnych rozmiarach. Dodatkowo, metody powszechnie stosowane do izolacji LPS, preferencyjnie izolują LPS o określonej długości/hydrofobowości. Dlatego też dokładny pomiar długości cząsteczki LPS jest trudny. SDS-PAGE (ang. sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) i barwienie za pomocą metalicznego srebra stanowi jedną z najpopularniejszych metod do pomiaru długości LPS [61,82-85,86]. Techniki elektroforetyczne są stosowane również w połączeniu z autoradiografią [77]. Do pomiaru długości LPS stosowano również elektroforezę dwuwymiarową oraz wstępny rozdział LPS w chromatografii kolumnowej lub elektroforezie preparatywnej [87, 88]. Ze względu na brak dostępnych markerów masy cząsteczkowej, dokładna ocena masy cząsteczkowej rozdzielonego LPS z wykorzystaniem SDS-PAGE jest utrudniona. Do analizy rozkładu wielkości cząsteczek LPS stosowano także rozdział cząsteczek w polu elektrycznym z użyciem mikroukładów elektroforetycznych [89,90]. Jako metody pomiaru długości cząsteczki LPS stosowano również znakowanie izotopami promieniotwórczymi w połączeniu z radiografią i densytometrią [59,64,81]. Analiza proporcji pomiędzy składnikiem występującym w części O-swoistej LPS (w stałej ilości) a składnikiem występującym w części rdzeniowej stanowi metodę pomiaru średniej długości polisacharydu O-swoistego w całej populacji cząsteczek LPS. Do pomiaru proporcji wykorzystuje się technikę spektrometrii mas (ang. mass spectrometry, MS) (proporcje między NeuAc i Kdo w LPS szczepów *Salmonella* O48) lub testy kolorymetryczne (proporcje między kolitozą i Kdo w LPS *E. coli* O111)

[1,5,59]). Do innych metod wykorzystywanych do pomiaru długości cząsteczki LPS, analizy strukturalnej, obrazowania LPS na powierzchni komórki można zaliczyć m.in. spektroskopię osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni, spektroskopię elektronowego rezonansu spinowego, mikroskopię sił atomowych, mikroskopię elektronową [81,91-94]. Metody analizy strukturalnej lipopolisacharydów i ich fragmentów z zastosowaniem spektrometrii mas wykorzystują różne typy jonizacji np.: bombardowanie szybkimi atomami, elektrorozpylanie, desorpcję za pomocą plazmy, pirolizy, lasera bądź lasera z udziałem matrycy [95–98]. Zastosowanie technik MS pozwala uzyskiwać widma cząsteczek LPS o stosunkowo wysokich masach cząsteczkowych od 6000 - 14000 Da [99–101]. Ze względu jednak na heterogenność cząsteczki lipopolisacharydu oraz jego amfifilowy charakter techniki te mają raczej zastosowanie do analizy całych cząsteczek lipooligosacharydów lub LPS typu R, czasem z zastosowaniem dodatkowych technik wstępnego rozdziału w celu zmniejszenia heterogenności próbki [98,102–104]. W przypadku lipopolisacharydów typu gładkiego, dopiero po de-O-acetylacji uzyskiwano widma cząsteczek o masach rzędu 10000-14000 Da, a dla izolowanego polisacharydu O-swoistego do 16000 Da [99,104].

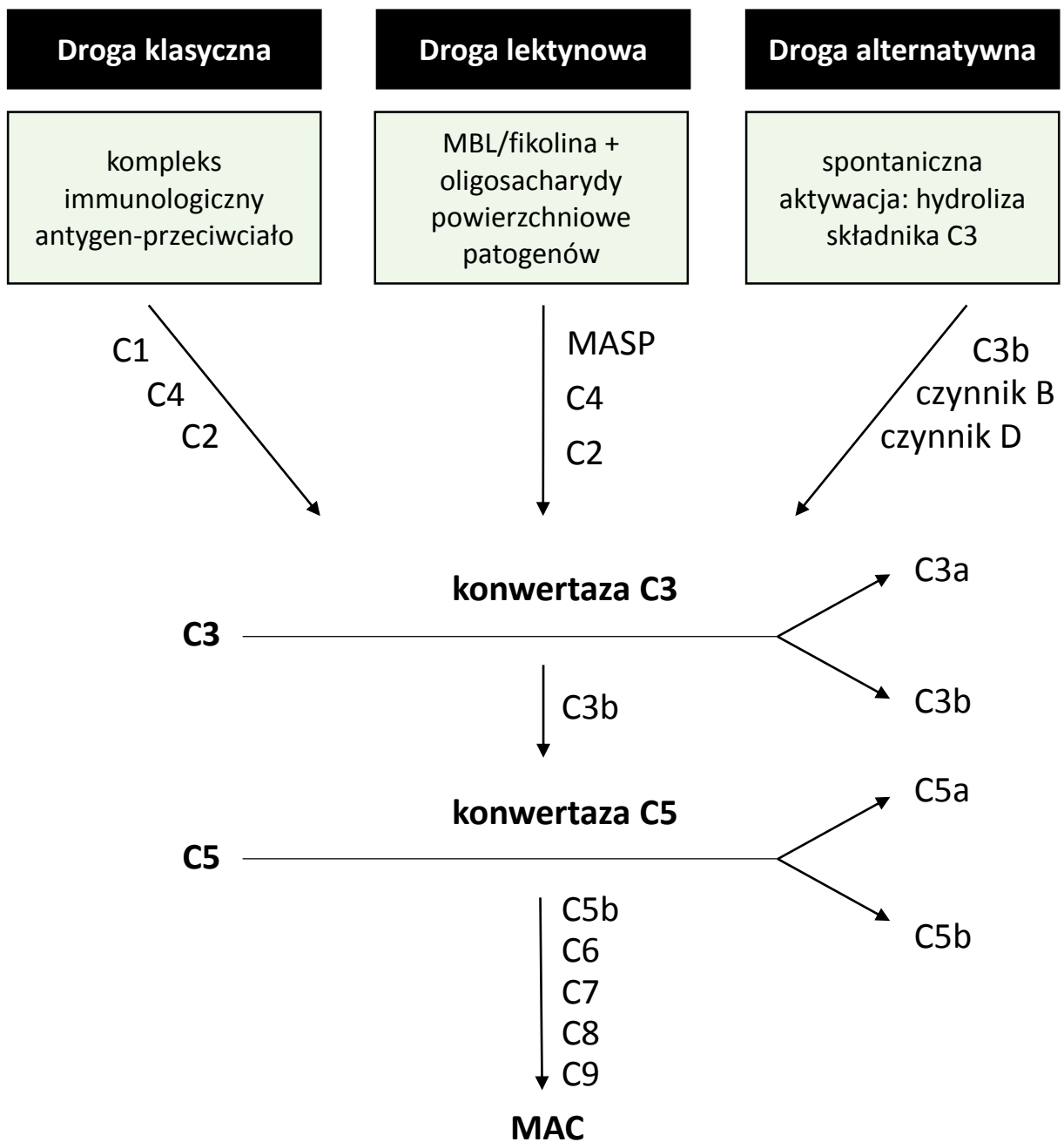
## 5.5 Interakcja lipopolisacharydu bakterii *Salmonella* z układem immunologicznym gospodarza

### 5.5.1 Układ dopełniacza

Układ odpornościowy stanowi systemem obronny gospodarza przed patogenami, w obrębie którego możemy wyróżnić dwie funkcjonalne części: odporność nieswoistą (wrodzoną) oraz swoistą (nabytą). Mechanizmy odporności wrodzonej stanowią pierwszą, natychmiastową lecz nieswoistą linię obrony gospodarza przed drobnoustrojami, podczas gdy mechanizmy odpowiedzi nabytej są swoiste i odpowiadają za wytworzenie pamięci immunologicznej. Jeden z ważniejszych mechanizmów odporności wrodzonej stanowi układ dopełniacza, który składa się ze ściśle regulowanej sieci białek. Układ dopełniacza łączy nieswoistą i swoistą odpowiedź immunologiczną. Podstawowe funkcje układu dopełniacza to: nasilenie reakcji zapalnych, przyciąganie fagocytów przez chemotaksję, usuwanie kompleksów immunologicznych, aktywacja komórek i bezpośrednie zabijanie mikroorganizmów, ponieważ zaktywowana kaskada białek dopełniacza prowadzi do wytworzenia kompleksu atakującego błonę (ang. Membrane Attack Complex, MAC), którego działanie polega na wytworzeniu porów w błonie bakterii, czego skutkiem jest liza komórki bakteryjnej [105–108]. Jednak nadmierna aktywacja układu dopełniacza może prowadzić do rozwoju niekontrolowanego procesu zapalnego i nieodwracalnego uszkodzenia tkanek i narządów. Aktywacja układu dopełniacza składa się z szeregu enzymatycznych i nieenzymatycznych reakcji kaskadowych. Biorąc pod uwagę czynnik wyzwalający kaskadę aktywacji, początkowe etapy można podzielić na trzy ścieżki: klasyczną, lektynową i alternatywną [108,109]. Droga klasyczna jest aktywowana przez kompleksy immunologiczne utworzone po rozpoznaniu obcych antygenów (kompleksy immunologiczne IgG lub IgM). Droga lektynowa jest aktywowana po związaniu reszt cukrowych (mannoza, fukoza, N-acetyloglukozamina) obecnych w polisacharydach powierzchniowych drobnoustrojów przez lektynę wiążącą mannozę (ang. mannose binding lectin, MBL) lub fikolinę. Droga alternatywna w przeciwieństwie do dwóch pozostałych, jest inicjowana przez spontaniczną aktywację - hydrolizę składnika C3. Wszystkie ścieżki aktywacji zbiegają się w punkcie, w którym konwertaza C3 (C4bC2b dla szlaku klasycznego i lektynowego lub C3bBb dla szlaku alternatywnego) rozbija składnik C3 na C3a i C3b (rycina 3). C3b wiąże konwertazę C3, tworząc konwertazę C5, co powoduje rozszczepienie C5 do C5a i C5b. W następnym kroku C5b rekrutuje C6, C7, C8 i wiele cząsteczek C9 w celu utworzenia MAC, co bezpośrednio prowadzi do lizy komórek i śmierci patogenu (rycina 4) [108,110,111].



Rycina 3. Metabolizm składnika C3 układu dopełniacza.



Rycina 4. Schemat aktywacji układu dopełniacza.

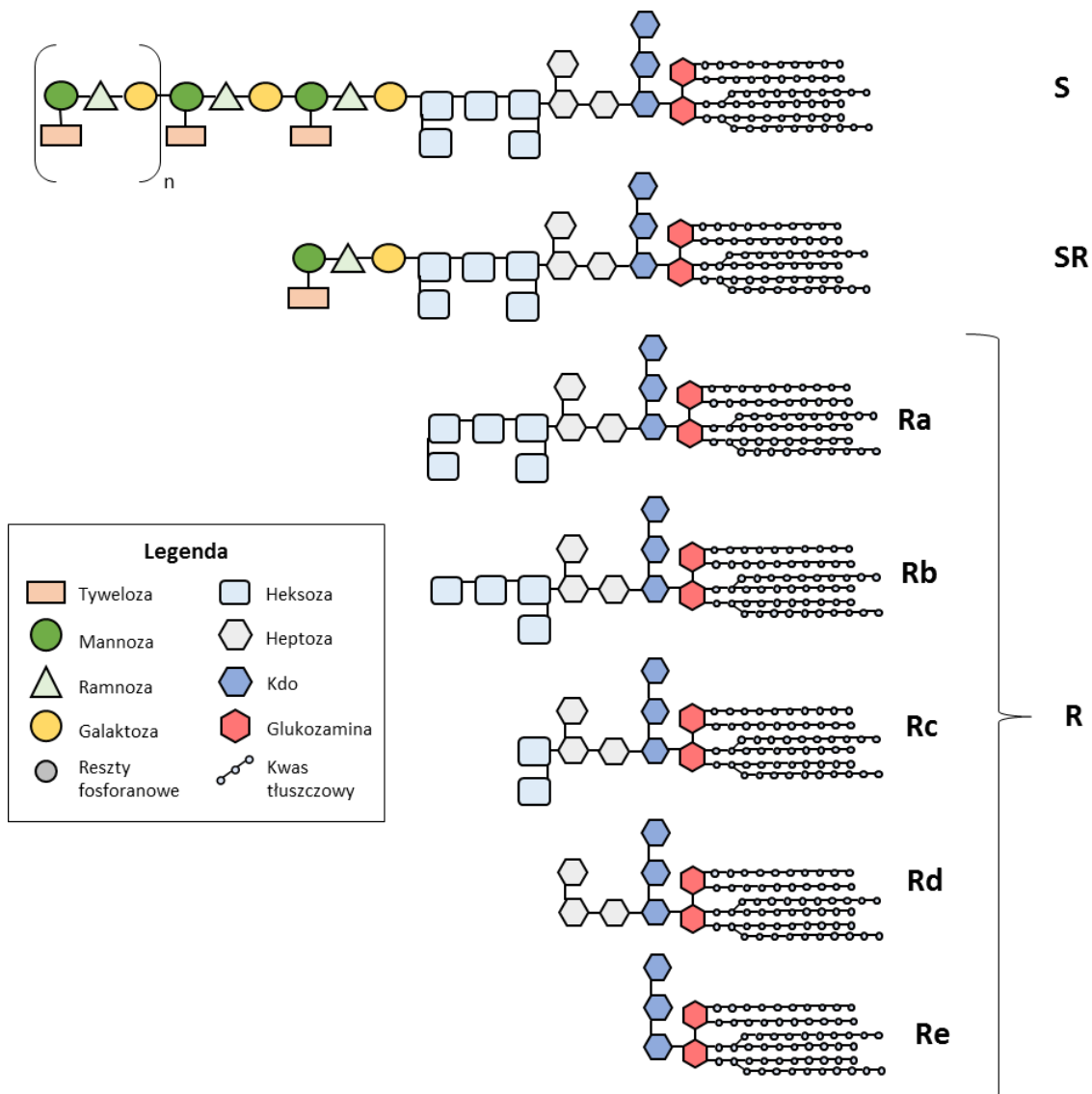
## 5.5.2 Obrona bakterii *Salmonella* przed działaniem układu dopełniacza poprzez modyfikację cząsteczki lipopolisacharydu

### 5.5.2.1 Wpływ różnych typów lipopolisacharydu: R, SR, S

Drobnoustroje atakując organizm gospodarza napotykać wiele mechanizmów obronnych ze strony układu immunologicznego, których celem jest zapobiegnięcie kolonizacji, proliferacji oraz rozprzestrzeniania się bakterii w organizmie. Układ dopełniacza szybko identyfikuje i „znakuje” bakterie w konsekwencji doprowadzając do ich usunięcia z ustroju. Interakcja pomiędzy bakteriami a składnikami układu odpornościowego stwarza selekcyjną presję dla bakterii do opracowywania nowych mechanizmów umożliwiających „ucieczkę” przed układem immunologicznym. Wszystkie patogeny w toku ewolucji wykształciły wiele mechanizmów obronnych. Jednym z głównych mechanizmów ochronnych przed litycznym działaniem surowicy ludzkiej jest zdolność modulacji syntezy i struktury cząsteczki lipopolisacharydu. Pierwsze badania dotyczące udziału cząsteczek lipopolisacharydu o różnej długości w aktywacji układu dopełniacza koncentrowały się na bakterii *Salmonella* Minnesota (*S. Minnesota*). Bakteria ta stanowiła interesujący model badawczy ze względu na dostępność różnych chemotypów bakterii, charakteryzujących się różną długością części rdzeniowej LPS (rycina 5). Bjornson i wsp. wykazali, że szczep gładki *S. Minnesota* SF1114 w większym stopniu aktywuje białko C3 w normalnej surowicy ludzkiej oraz surowicy z aktywną drogą alternatywną, w porównaniu do szorstkich chemotypów: Rb (*S. Minnesota* SF1127) oraz Re (*S. Minnesota* SF1167). Autorzy, wykazali również, że szczep gładki oraz chemotyp Rb aktywowały lisę ludzkich erytrocytów w przeciwieństwie do chemotypu Re, który był nieaktywny w testowanym układzie. Brak zdolności chemotypu Re do aktywacji układu dopełniacza wskazał, że cząsteczka lipidu A nie jest odpowiedzialna za aktywację alternatywnej drogi układu dopełniacza. Autorzy wykazali, że droga alternatywna została zaktywowana tylko w przypadku chemotypu gładkiego oraz, w mniejszym stopniu, przez chemotyp Rb, co sugeruje, że za aktywację odpowiedzialna była polisacharydowa część cząsteczki LPS. Natomiast aktywacja składnika C3 w normalnej surowicy ludzkiej przez chemotyp Re może świadczyć o aktywacji układu dopełniacza za pomocą drogi klasycznej [112]. Joiner i wsp. wykazali, że mechanizm oporności na działanie surowicy ludzkiej gładkiego szczepu *S. Minnesota* S218 jest związany z nietrwałym wiązaniem składników dopełniacza do powierzchni komórki bakteryjnej, a nie jak zakładano z blokadą aktywacji kaskady układu dopełniacza. Zarówno gładki szczep *S. Minnesota* S218 jak i szorstki szczep Re595 efektywnie zużywały składniki dopełniacza, deponując jego końcowe komponenty



na swojej powierzchni, jednak w przypadku szczepu gładkiego kompleks C5b-9 był uwalniany z powierzchni komórki nie powodując uszkodzenia błony zewnętrznej i lizy komórki bakteryjnej [113]. Joiner i wsp. w późniejszej pracy wykazali, że u szczepu opornego na działanie surowicy ludzkiej kompleks C5b-9 tworzy się na powierzchni komórki bakteryjnej ale nie wbudowuje się w hydrofobowe regiony błony zewnętrznej. Autorzy wykazali, że zaktywowane składniki dopełniacza były deponowane na części polisacharydowej LPS, która w sposób fizyczny oddzielała kompleks od hydrofobowej części błony komórkowej, uniemożliwiając lizę komórki [114]. Nevoła i wsp. wykazali, że zdolność kolonizacji jelita grubego myszy jest bezpośrednio związana z długością cząsteczki LPS i zmniejsza się wraz ze skracaniem jej długości [115]. Późniejsze badania Grossmana i wsp. powiązały obecność L-OAg LPS z opornością na bakteriobójcze działanie surowicy ludzkiej [116].



Rycina 5. Chemotypy lipopolisacharydu bakterii z rodzaju *Salmonella*.

### 5.5.2.2 Modulacja długości cząsteczki lipopolisacharydu przez bakterię

Grossman i wsp. wykazali, że przeżywalność bakterii *Salmonella* Montevideo (*S. Montevideo*) w surowicy jest związana ze liczbą podjednostek O-swoistych w LPS. Autorzy wykazali, że LPS zawierający więcej niż 14 powtarzających się podjednostek chronił bakterie przed litycznym działaniem układu dopełniacza [116]. Na powierzchni komórki bakteryjnej konieczna jest więc odpowiednia gęstość L-OAg LPS, która zapewni komórce ochronę przed działaniem układu dopełniacza przez przestrzenne utrudnianie depozycji kompleksu MAC na powierzchni błony zewnętrznej [116]. Joiner i wsp. wykazali, że składnik C3 układu dopełniacza preferencyjnie wiąże cząsteczki LPS *S. Montevideo* składające się z ponad 60 powtarzających się podjednostek O-swoistych [117]. Z kolei Tomas i wsp. wykazali, że dodatek do naturalnej surowicy ludzkiej wysokocząsteczkowego LPS, wyizolowanego od szczepu opornego na działanie surowicy ludzkiej (*S. Typhimurium* Su453), wpływa na wzrost przeżywalności o ponad 50% szczepu uprzednio wrażliwego na działanie surowicy (*S. Typhimurium* SA2380). Dodatkowo autorzy wykazali, że dodatek wysokocząsteczkowego LPS do surowicy może zmniejszyć odsetek hemolizy w mieszaninie z uczulonymi erytrocytami owczymi [118].

### 5.5.2.3 Modyfikacja struktury podjednostki części O-swoistej lipopolisacharydu

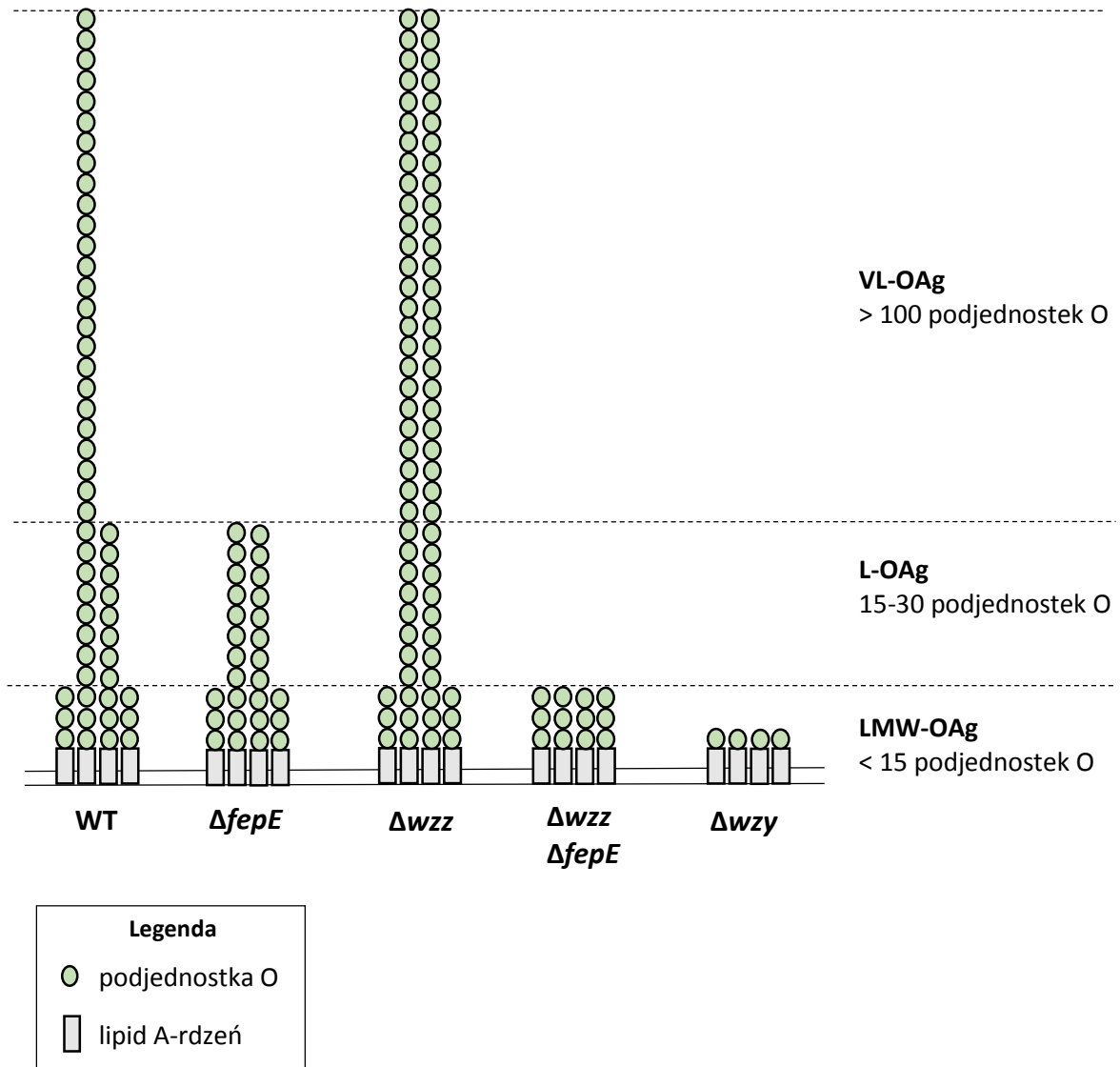
Wpływ części O-swoistej cząsteczki LPS na aktywację drogi alternatywnej układu dopełniacza został opisany w kilku pracach. Liang-Takasaki i wsp. jako pierwsi wykazali, że szczepy *Salmonella* różniące się składem cukrowym w części O-swoistej są w różnym stopniu pochłaniane przez makrofagi oraz w różnym stopniu aktywują drogę alternatywną układu dopełniacza [119]. W późniejszych badaniach Grossman i Leive potwierdzili jednoznacznie udział cząsteczek LPS w zjawisku aktywacji drogi alternatywnej układu dopełniacza. Grupa wykazała, że na aktywację składnika C3 drogi alternatywnej wpływ mają drobne zmiany w strukturze chemicznej części O-swoistej LPS. Aktywacja składnika C3 zależy więc od typu antygeny O. Dodatkowo autorzy wykazali, że aktywacja składnika C3 nie zależy od długości łańcucha w zakresie od 3 do 40 podjednostek w części O-swoistej [120]. W późniejszej pracy Grossman i wsp. wykazali, że za różnice w aktywacji składnika C3 drogi alternatywnej układu dopełniacza pomiędzy testowanymi szczepami *S. Typhimurium* oraz *S. Enteritidis* odpowiadają najprawdopodobniej różnice w orientacji grup OH w pozycji C2 oraz C4 w resztach abekwozy oraz tywelozy w powtarzających się podjednostkach części O-swoistej LPS [121].

#### 5.5.2.4 Badania nad wpływem długości części O-swoistej lipopolisacharydu z wykorzystaniem mutantów długościowych

Murray i wsp., porównując szczepy *S. Typhimurium* z wyłączonym genem *wzzST* lub *wzzJepE*, nie wykazali istotnej statystycznie różnicy w ich wrażliwości na działanie układu dopełniacza. Dopiero wyłączenie dwóch genów *wzz* wpłynęło na zmianę wrażliwości badanego szczepu na działanie surowicy (rycina 6) [65]. Z kolei Bugła-Płoskońska i wsp., wykazali brak korelacji pomiędzy długością części O-swoistej LPS a poziomem przeżywalności szczepów *Salmonella* O48 w surowicy [1]. Wykazano również wpływ VL-OAg na przeżywalność bakterii *S. Typhimurium* w żółci [122]. Hölzer i wsp., badając wpływ długości LPS na inwazję i wewnątrzkomórkową replikację *S. Typhimurium* udowodnili, że długość antygeny O jest kluczowa dla funkcjonowania T3SS oraz dla procesu inwazji bakterii. Szczepy niezdolne do syntezy VL-OAg LPS oraz L i VL-OAg LPS wykazywały zwiększoną translokację białka efektorowego SPI1-T3SS, przy czym zmiany w długości części O-swoistej LPS nie miały wpływu na SPI2-T3SS [123]. W przeciwieństwie do wcześniejszych obserwacji zespołu Murray [124], Hölzer i wsp. nie potwierdzili wpływu długości LPS na pochłanianie bakterii przez makrofagi [123]. Murray i wsp. porównując panel szczepów *S. Typhimurium* C5 o skróconej długości łańcucha O-swoistego, wykazali, że pojedyncze mutacje w genach *wzzST* oraz *wzzJepE* nie wpłynęły na wzrost wrażliwości testowanych bakterii na bakteriobójcze działanie surowicy w porównaniu do szczepu dzikiego. Dopiero podwójna mutacja, umożliwiająca wyłączenie zarówno bardzo długich jak i długich łańcuchów O-swoistych wpłynęła na znaczny wzrost wrażliwości badanego szczepu na działanie układu dopełniacza. Szczep SR *S. Typhimurium* C5 z jedną podjednostką cukrową w części O-swoistej był oporny na lityczne działanie surowicy. Badacze wskazali również istotność długości antygeny O podczas infekcji w modelu mysim. Szczep *S. Typhimurium* C5  $\Delta wzzST \Delta wzzJepE$  wykazywał mniejsze zdolności do infekcji niż szczep dziki [65]. W późniejszej pracy Murray i wsp. wykazali, że LPS wyizolowany ze szczepów *S. Typhimurium* C5 oraz  $\Delta wzzST$  po hodowli w inaktywowanej termicznie surowicy charakteryzowały się zwiększeniem frakcji bardzo długich łańcuchów O-swoistych. Wykazano, że ten zmodyfikowany fenotyp był bezpośrednio związany ze wzrostem oporności na surowicę [125]. Autorzy uważają, że długość antygeny O u *S. Typhimurium* odgrywa również główną rolę w procesie pochłaniania przez komórki makrofagów. Wykazano, że tendencja pochłaniania bakterii przez makrofagi wzrasta wraz ze skracaniem części O-swoistej LPS. Dodatkowo autorzy potwierdzili, że długość antygeny O jest związana

z opornością na bakteriobójcze działanie surowicy, wskazując, że minimalna długość chroniąca bakterie przed litycznym działaniem dopełniacza wynosi od 5 do 15 podjednostek cukrowych w części O-swoistej LPS. Co ciekawe, autorzy wykazali, że antygen O składający się z 16 do 35 podjednostek aktywuje dopełniacz w większym stopniu niż inne długości, jednak zdolność do aktywacji układu dopełniacza nie koreluje z opornością na jego działanie [124]. Futoma-Kołoch i wsp. badając wpływ obecności kwasu sjałowego w strukturze LPS na przeżywalność szczepów *Salmonella* O48 w surowicy wykazali, że obecność w LPS NeuAc nie chroni bakterii przed litycznym działaniem surowicy. Dodatkowo Futoma-Kołoch i wsp. wykazali, że szczep *S. Isaszeg*, charakteryzujący się wśród testowanych szczepów najmniejszą zawartością kwasu sjałowego (NeuAc/Kdo <1), wiązał najwięcej składnika C3. Szczepy *S. Ngozi* oraz *S. arizonae*, zawierające więcej kwasu sjałowego (wartość NeuAc/Kdo odpowiednio: 239 oraz 200), charakteryzowały się zmniejszoną zdolnością do aktywacji składnika C3. Autorzy wykazali również, że białko C3 układu dopełniacza preferencyjnie wiąże się do białek błony zewnętrznej o masie cząsteczkowej w zakresie 35-48 kDa [2]. Bravo i wsp. wykazali, że faza wzrostu szczepów *S. Typhimurium* i *S. Enteritidis* ma wpływ na syntezę części O-swoistej LPS. Autorzy wykazali, że szczepy te wytwarzają większą ilość niskocząsteczkowego LPS oraz długich łańcuchów O-swoistych w stacjonarnej fazie wzrostu, w porównaniu do fazy logarytmicznej, natomiast synteza VL-OAg LPS utrzymuje się na jednakowym poziomie podczas wzrostu bakterii. Dodatkowo autorzy zbadali wpływ fazy wzrostu na produkcję antygeny O u mutantów delecyjnych *wzz<sub>ST</sub>* oraz *wzz<sub>fepe</sub>*. Wykazano, że szczep *S. Typhimurium* LT2 *wzz<sub>ST</sub>* w fazie stacjonarnej produkuje większe ilości LMW-OAg LPS w porównaniu do fazy logarytmicznej, natomiast szczep *S. Typhimurium* LT2 *wzz<sub>fepe</sub>* charakteryzuje się większą produkcją L-OAg LPS oraz LMW-OAg LPS w fazie stacjonarnej w porównaniu do fazy logarytmicznej. Podobnym rozkładem długości w tych samych warunkach charakteryzował się szczep *S. Enteritidis* PT4 *wzz<sub>ST</sub>* oraz *wzz<sub>fepe</sub>* [7]. Bravo i wsp. sprawdzili również czy regulacja długości LPS zależna od fazy wzrostu wpływa na oporność na działanie surowicy ludzkiej. Zespół wykazał, że szczep *S. Typhimurium* LT2 i jego mutant  $\Delta$ *wzz<sub>ST</sub>* był oporny na działanie 20% surowicy ludzkiej niezależnie od fazy wzrostu. Natomiast szczep *S. Typhimurium* LT2  $\Delta$ *wzz<sub>fepe</sub>* był w 100% wrażliwy na działanie 20% surowicy ludzkiej w logarytmicznej fazie wzrostu, w stacjonarnej fazie wzrostu wykazywał natomiast przeżywalność na poziomie 30% [7]. Hoare i wsp. wykazali, że szczep *S. Typhi* TY2 i jego mutanty o skróconej długości łańcucha O-swoistego różnią się wrażliwością na działanie 10% surowicy ludzkiej. Mutant  $\Delta$ *wzz<sub>ST</sub>* charakteryzował się o 50% mniejszą przeżywalnością w surowicy w porównaniu do szczepu dzikiego. Z kolei mutanty pozbawione części

O-swoistej LPS charakteryzowały się przeżywalnością w surowicy od 0 do 3,5% w porównaniu do szczepu dzikiego [126]. Bravo i wsp. wykazali z kolei, że szczep *S. Typhi* jest bardziej wrażliwy na lityczne działanie surowicy ludzkiej w porównaniu do testowanych nietyfoidalnych szczepów *Salmonella*.



Rycina 6. Schemat mutantów długościowych części O-swoistej LPS.

### 5.5.3 Obrona mikroorganizmów przed układem dopełniacza poprzez wytwarzanie otoczki polisacharydowej

Otoczki bakterii *Salmonella* stanowią obok cząsteczek lipopolisacharydu drugi polisacharydowy czynnik wirulencji. Otoczki umożliwiają bakterii uniknięcie rozpoznania przez układ immunologiczny gospodarza oraz ułatwiają rozprzestrzenianie się bakterii w organizmie. Do najlepiej scharakteryzowanych otoczek polisacharydowych zalicza się antygen – Vi. Antygen ten jest najczęściej opisywany dla bakterii *S. Typhi*, ale identyfikuje się go również dla bakterii *S. Dublin* oraz *S. Paratyphi C* [127]. Antygen Vi jest liniowym polimerem zbudowanym z cząsteczek kwasu N-acetylogalaktozaminouronowego [128]. Uznaje się, że antygen Vi charakteryzuje się przeciwzapalnymi właściwościami, co stanowi przyczynę dłuższego czasu inkubacji duru brzuszego w porównaniu z infekcją wywołaną przez szczepy NTS. Wykazano wpływ obecności antygeny otoczkowego Vi na oporność na bakteriobójcze działanie surowicy ludzkiej. Looney i Steigbigel wykazali, że szczep otoczkowy *S. Typhi* Quail charakteryzował się większą opornością na działanie surowicy w porównaniu ze szczepem bezotoczkowym *S. Typhi* 0901 [129]. Hashimoto i wsp. wykazali, że szczep *S. Typhi* nie posiadający antygeny Vi, charakteryzował się 100% śmiertelnością po 15 minutach inkubacji w 90% surowicy, podczas gdy szczep otoczkowy charakteryzował się 50% przeżywalnością [130]. Z kolei Bravo i wsp. testując dwa szczepy *S. Typhi* różniące się obecnością otoczki nie wykazali wpływu antygeny Vi na przeżywalność badanych szczepów w surowicy ludzkiej [7]. Rozpoznanie i wiązanie wolnych grup hydroksylowych w cząsteczkach lipopolisacharydu przez białka C3 stanowi inicjację drogi alternatywnej układu dopełniacza. Looney i Steigbigel wykazali, że szczepy otoczkowe *S. Typhi* charakteryzują się mniejszym wiązaniem składników dopełniacza w porównaniu do szczepów bezotoczkowych [129]. W późniejszych badaniach również Wilson i wsp. wykazali, że ekspresja antygeny Vi zmniejsza wiązanie składnika C3 układu dopełniacza do powierzchni komórki bakteryjnej [131]. W ostatnich latach coraz więcej uwagi poświęca się również otoczkom polisacharydowym z grupy IV, charakteryzujących się wysokim stopniem podobieństwa w budowie do antygeny O cząsteczki LPS [132–135]. Wykazano, że w przypadku bakterii *Salmonella* otoczki antygeny-O mają znaczenie w procesach adhezji oraz w utrzymywaniu się bakterii w środowisku [136,137]. Marshall i Gunn, wykazali, że utrata otoczki antygeny-O powoduje zwiększenie wrażliwości na działanie surowicy ludzkiej u *S. Typhimurium* [133].

## 6. CEL PRACY

Pierwszym celem rozprawy doktorskiej było określenie roli długości części O-swoistej lipopolisacharydu w mechanizmach unikania odpowiedzi immunologicznej gospodarza przez bakterie z rodzaju *Salmonella*.

Powyższy cel pracy zrealizowano poprzez:

- określenie wpływu surowicy ludzkiej na kształtowanie długości lipopolisacharydu bakterii *Salmonella* O48
- skonstruowanie modelu badawczego składającego się z mutantów *S. Enteritidis* o zróżnicowanej długości części O-swoistej lipopolisacharydu
- opracowanie metody pomiaru średniej długości części O-swoistej lipopolisacharydu dla bakterii *S. Enteritidis* o różnych typach lipopolisacharydu
- ocenę wpływu długości części O-swoistej lipopolisacharydu na patogenność bakterii *S. Enteritidis* w testach *in vitro* poprzez określenie oddziaływania ze składnikami układu dopełniacza oraz stopnia pochłaniania przez komórki ssacze
- ocenę wpływu długości części O-swoistej lipopolisacharydu na wirulencję bakterii *S. Enteritidis* w testach *in vivo* poprzez określenie poziomu modelowej patogenności z wykorzystaniem larw *Galleria mellonella*

Drugim celem rozprawy doktorskiej było określenie roli długości części O-swoistej lipopolisacharydu w kształtowaniu proteomu błony zewnętrznej bakterii z rodzaju *Salmonella*.

Powyższy cel pracy zrealizowano poprzez:

- charakterystykę proteomu błony zewnętrznej bakterii *S. Enteritidis* o zróżnicowanej długości części O-swoistej lipopolisacharydu
- charakterystykę proteomu błony zewnętrznej bakterii *Salmonella* O48 poddanych presji surowicy ludzkiej

## 7. MATERIAŁY I METODY

### 7.1 Szczepy bakteryjne i warunki hodowli

Do wszystkich eksperymentów wykorzystano szczepy *Salmonella* pochodzące z Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (ang. Polish Collection of Microorganisms, PCM) Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda, PAN we Wrocławiu.

Do pasażowania w surowicy ludzkiej wykorzystano szczep: *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* (*S. diarizonae*) PCM 2511, należący do grupy serologicznej O48, której charakterystyczną cechą jest obecność NeuAc w cząsteczce LPS. Do konstrukcji mutantów o różnej długości części O-swoistej LPS wykorzystano najpierw szczep *S. diarizonae* PCM 2511, jednak pomimo licznych prób, szczep był niepodatny na zabiegi inżynierii genetycznej. W związku z powyższym do konstrukcji mutantów o różnej długości części O-swoistej LPS wykorzystano szczep kliniczny *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Enteritidis (*S. Enteritidis*) PCM 2817, który charakteryzował się we wcześniejszych badaniach opornością na działanie 75% surowicy ludzkiej [6]. Do konstrukcji mutantów białkowych wykorzystano szczep laboratoryjny *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Typhimurium (*S. Typhimurium*) PCM 2255 (LT2). Szczep ten jest powszechnie wykorzystywany w inżynierii genetycznej bakterii z rodzaju *Salmonella* ze względu na trudności przy manipulowaniu genomem serowarów mniej scharakteryzowanych. Do przeprowadzenia rekombinacji systemem  $\lambda$  Red wykorzystano zestaw niepatogennych szczepów *E. coli* z kolekcji Coli Genetic Stock Center z Uniwersytetu w Yale. Charakterystyka genotypowa wykorzystanych szczepów została przedstawiona w tabeli 3.

Hodowle bakteryjne prowadzono w temperaturze: 30°C, 37°C lub 42°C na stałym lub w płynnym podłożu LB przez 18-24 godziny z wytrząsaniem (160-180 rpm) lub do osiągnięcia odpowiedniej wartości gęstości optycznej OD<sub>600</sub>. Stosowano podłoża z dodatkiem lub bez odpowiednich antybiotyków (kanamycyna (12,5 µg/ml lub 50 µg/ml), ampicylina (100 µg/ml) (A&A Biotechnology). Do pomiarów wartości gęstości optycznej wykorzystywano densytometr WPA Biowave CO8000, bakterie hodowano w inkubatorach: 6000 Heraeus, IF75 Memmert, BD260 Binder. Do pracy w warunkach sterylnych wykorzystywano palnik gazowy lub laminar Bioair safeflow 1.2, MSC-Advantage Thermo Scientific. Bakterie wirowano w wirówkach: Biofuge Stratos Heraeus, Fresco 21 Heraeus, Multifuge X3R Heraeus, MiniSpin Plus Eppendorf, MPW-350R.



Tabela 3. Charakterystyka genotypowa szczepów pochodzących z Coli Genetic Stock Center, wykorzystanych do konstrukcji mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817 o różnej długości części O-swoistej LPS.

Nazwa szczepu	Genotyp
BW25113/pKD46	F-, $\Delta(\text{araD-araB})567$ , $\Delta\text{lacZ4787}>::\text{rrnB-3}$ , $\lambda^-$ , <i>rph-1</i> , $\Delta(\text{rhaD rhaB})568$ , <i>hsdR514</i> , pKD46
BT340/pCP20	F-, $\Delta(\text{argF-lac})169$ , $\phi 80\text{dlacZ58(M15)}$ , <i>glnX44(AS)</i> , $\lambda^-$ , <i>rfbC1</i> , <i>gyrA96(NalR)</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>spoT1</i> , <i>thiE1</i> , <i>hsdR17</i> , pCP20
BW25141/pKD4	F-, $\Delta(\text{araD-araB})567$ , $\Delta\text{lacZ4787}>::\text{rrnB-3}$ , $\Delta(\text{phoB-phoR})580$ , $\lambda^-$ , <i>galU95</i> , $\Delta\text{uidA3}>::\text{pir}^+$ , <i>recA1</i> , <i>endA9(del-ins)::FRT</i> , <i>rph-1</i> , $\Delta(\text{rhaD-rhaB})568$ , <i>hsdR514</i> , pKD4

## 7.2 Podłoża mikrobiologiczne, bufony i odczynniki ogólne

Do przygotowywania odczynników używano wagi: PM2500 Delta Range Mettler Toledo, autoklawu: Tuttnauer, 2540ml oraz pH-metru MP225 Mettler Toledo.

### Woda ultraczysta MiliQ®

Oporność w 25°C: 18,2 MΩ x cm

Całkowity węgiel organiczny TOC: poniżej 5 ppb

### Podłoże płynne LB (ang. lysogeny broth) (Biocorp Polska Sp. Z o.o.) (pH 7 ± 0,2)

- Trypton 10 g/l
- Ekstrakt drożdżowy 10 g/l
- NaCl 5 g/l

Przygotowane podłoże autoklawowano zgodnie z zaleceniami producenta w 121°C przez 15 minut i przechowywano w temperaturze 4°C do czasu użycia.

### Podłoże stałe LB agar (Miller's LB agar) (Sigma-Aldrich) (pH 7 ± 0,2)

- Trypton 10 g/l
- Ekstrakt drożdżowy 5 g/l
- NaCl 10 g/l
- Agar 15 g/l

Przygotowane podłoże autoklawowano zgodnie z zaleceniami producenta w 121°C przez 15 minut, a następnie rozlano na jałowe szalki Petriego (Bionovo) i przechowywano w temperaturze 4°C do czasu użycia.

**Pożywka SOC (ang. super optimal catabolite repression) (pH 7 ± 0,2)**

- Trypton (Biocorp Polska Sp. Z o.o.) 20 g/l
- Ekstrakt drożdżowy (Biocorp Polska Sp. Z o.o.) 5 g/l
- NaCl (POCH) 0,50 g/l
- KCl (Sigma-Aldrich) 0,0186 g/l
- MgSO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich) 2,467 g/l
- Glukoza (Sigma-Aldrich) 3,603 g/l

W litrze wody MiliQ rozpuszczono wszystkie składniki poza MgSO<sub>4</sub> i glukozą, całość autoklawowano w 121°C przez 30 minut, kolejno do mieszaniny dodano MgSO<sub>4</sub> i glukozę, wyjałowione w tych samych warunkach. Gotowe podłoże podzielono na porcje po 2 ml i przechowywano w temperaturze -20°C do czasu użycia.

**Bufor TBE (ang. tris-borate-EDTA) (pH 8 ± 0,2) – roztwór 10x stężony**

- Tris (Sigma-Aldrich) 108 g/l
- Kwas borowy (Sigma-Aldrich) 55 g/l
- EDTA (Bio-shop) 0,04 g/l

**Buforowana fosforanem sól fizjologiczna (ang. phosphate buffered saline, PBS) (pH 7,4 ± 0,2)**

- NaCl (POCH) 8 g/l
- KCl (Sigma-Aldrich) 0,2g/l
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich) 1,44g/l
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich) 0,24g/l

**Buforowana fosforanem sól fizjologiczna z dodatkiem 0,1% Tween 20 (PBS-T)  
(pH 7,4 ± 0,2)**

- PBS 500 ml
- Tween 20 (Sigma-Aldrich) 500 ul

**Bufor TB (pH 7,5 ± 0,2)**

- BSA (w/v) (Sigma-Aldrich) 1%
- Tris (Sigma-Aldrich) 10mM
- NaCl (POCH) 150mM

**Bufor TB-T (pH 7,5 ± 0,2)**

- Bufor TB 500 ml
- Tween 20 (Sigma-Aldrich) 0,05%

**Bufor TB-T z dodatkiem MgEGTA**

- Bufor TBT
- MgCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich) 5mM
- EGTA (Sigma-Aldrich) 10mM

**Bufor weronalowy (ang. veronal buffered saline, VBS) (pH 7,4 ± 0,2) – roztwór  
5x stężony**

- 0,2M Barbitol sodu (Sigma-Aldrich) 4,12 g
- 0,2M HCl (POCH) 65 ml
- Woda MiliQ 135 ml

### 7.3 Surowica ludzka

Próbki krwi do pozyskania surowicy otrzymano z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa (RCKiK) im. prof. T. Dorobisza we Wrocławiu. Próbki zostały pobrane zgodnie z obowiązującymi zasadami ujętymi w Ustawie o publicznej służbie krwi z 20 maja 2016 roku oraz w Dyrektywie 2002/98/EC Parlamentu i Rady Europejskiej z dnia 27 stycznia 2003 roku przez pracowników Centrum. Próbki krwi pobrano do probówek jednorazowego użytku z aktywatorem wykrzepiania i z żelem rozdzielającym. Po zebraniu krwi próbki przechowywano w temperaturze 4°C przez 1 godzinę, aby umożliwić rozdział surowicy od pozostałych składników krwi. Następnie próbki wirowano (10 minut, 2500 × g, 4°C), uzyskaną surowicę rozdzielono po 500 µl do probówek typu Eppendorf. Do części badań wykorzystano surowicę pochodzącą z kolekcji laboratoryjnej zespołu Prof. Seppo Meri z Department of Bacteriology and Immunology, Translational Immunology Research Program z Uniwersytetu w Helsinkach.

#### 7.3.1 Określenie poziomu przeciwciał anti-*Salmonella* w próbkach surowicy

Z RCKiK otrzymano 130 indywidualnych próbek surowicy ludzkiej. W celu sprawdzenia poziomu przeciwciał anti-*Salmonella* klasy IgG w pozyskanych próbkach surowicy, wykonano test immunoenzymatyczny (ang. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA). W celu zmniejszenia liczby próbek do przebadania, indywidualne próbki surowicy do testu ELISA pogrupowano po 5 sztuk, tworząc 26 grup oznaczonych literami alfabetu od A do Y. Płytkę Nunc MaxiSorp (Thermo Scientific) opłaszczono roztworem liofilizatu komórek bakteryjnych *S. Enteritidis* PCM 2817 (200 µl/dołek, 5 mg liofilizatu/20 ml PBS). Następnie płytkę wirowano (20 minut, 600 × g, 4°C), zdjęto delikatnie roztwór oraz dodano 0,1% roztwór glutaraldehydu (250 µl/dołek) (Sigma-Aldrich). Płytkę inkubowano 30 minut w temperaturze pokojowej, po czym zdjęto delikatnie roztwór z dołków i dodano 0,1% roztworu BSA w PBS z dodatkiem glicyny (końcowe stężenie 0,1M, 250 µl/dołek) i inkubowano 2 godziny w temperaturze pokojowej. Po inkubacji płytkę przepłukano trzykrotnie (300 µl/dołek) buforem PBS-T, a następnie zablokowano poprzez dodanie 0,25% roztworu BSA (250 µl/dołek) (Sigma-Aldrich). Płytkę inkubowano w 4°C przez noc, a następnie przepłukano trzykrotnie (300 µl/dołek) buforem PBS-T. Do dołków dodano rozcieńczone w PBS badane surowice (150 µl/dołek) i inkubowano 2 godziny w temperaturze pokojowej. Rozcieńczenia surowic zostały dobrane na podstawie przeprowadzonych badań wstępnych. Następnie płytkę przepłukano trzykrotnie buforem PBS-T (300 µl/dołek) i dodano

przeciwciała anty-ludzkie IgG skoniugowane z alkaliczną fosfatazą (150  $\mu$ l/dołek, rozcieńczenie 1:10 000 w PBS) (Sigma-Aldrich) i inkubowano 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Płytkę przepłukano trzykrotnie buforem PBS-T (300  $\mu$ l/dołek). Reakcję barwną wywoływano przez 30 minut z użyciem substratu dla fosfatazy – AP Yellow (Alkaline Phosphatase Yellow Liquid Substrate System, Sigma-Aldrich, 100  $\mu$ l/dołek) poprzez inkubację w ciemności. Reakcję kolorymetryczną zatrzymano poprzez dodanie 3M roztworu NaOH (Sigma-Aldrich) (50  $\mu$ l/dołek). Zmierzono absorbancję przy długości fali 405 nm (BioTek Power Wave XS). W celu określenia poziomu przeciwciał anty-*Salmonella* w badanych próbkach i utworzenia puli surowic do dalszych badań wyliczono wartość „odcienia” dla badanych prób na podstawie wzoru: logarytm ze średniej + 2  $\times$  wartość odchylenia standardowego [138]. Po określeniu poziomu przeciwciał anty-*Salmonella* pulę surowic do badań przechowywano w temperaturze  $-70^{\circ}\text{C}$ . Do testów wymaganą objętość surowicy rozmrażano bezpośrednio przed użyciem, przy czym każdą próbkę używano tylko raz. **Normalna surowica ludzka z czynnym układem dopełniacza wykorzystana do badań w dalszej części pracy oznaczona jest jako NSL.**

### 7.3.2 Blokowanie alternatywnej drogi układu dopełniacza

Drogę alternatywną układu dopełniacza zablokowano poprzez inaktywację czynnika B. W tym celu porcje surowicy przeznaczone do eksperymentu inkubowano w łaźni wodnej (AJL electronic MLL.147) w  $50^{\circ}\text{C}$  przez 20 minut [139]. **Surowica z zablokowaną drogą alternatywną układu dopełniacza w dalszej części pracy oznaczona jest jako NSL/KL, ze względu na aktywną ścieżkę klasyczną i lektynową układu dopełniacza.**

### 7.3.3 Blokowanie klasycznej i lektynowej drogi układu dopełniacza

Drogę klasyczną i lektynową układu dopełniacza zablokowano poprzez chelatowanie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  w surowicy, ponieważ białko C1q oraz MBL są białkami zależnymi od wapnia. Z kolei uzupełnienie środowiska w jony  $\text{Mg}^{2+}$  umożliwia aktywację ścieżki alternatywnej, ponieważ czynnik B układu dopełniacza w obecności jonów  $\text{Mg}^{2+}$  wiąże się z formą C3 tworząc pobudzoną formę C3 [140]. Do 500  $\mu$ l surowicy przeznaczonej do eksperymentu dodano 25  $\mu$ l 200mM  $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ , 25  $\mu$ l 200mM EGTA oraz 50  $\mu$ l 0,9% NaCl, a następnie surowicę inkubowano 2 minuty w temperaturze otoczenia. **Surowica z zablokowaną drogą klasyczną i lektynową układu dopełniacza w dalszej części pracy oznaczona jest jako NSL/A, ze względu na aktywną ścieżkę alternatywną układu dopełniacza.**

## 7.4 Ocena wpływu surowicy ludzkiej na kształtowanie długości lipopolisacharydu

### 7.4.1 Pasażowanie bakterii *Salmonella* w surowicy ludzkiej

W celu określenia jak długoterminowa inkubacja w środowisku surowicy ludzkiej wpływa na długość lipopolisacharydu bakterie *S. diarizonae* PCM 2511 poddano pasażom w NSL [5]. Wybór powyższego szczepu do eksperymentu podyktowany był m.in. dostępnością metody, która pozwala na pomiar średniej długości części O-swoistej LPS [1]. Poniższy eksperyment miał na celu otrzymanie szczepu charakteryzującego się innym typem LPS w porównaniu do szczepu dzikiego. Podczas eksperymentu bakterie hodowano 18 godzin z wytrząsaniem w 37°C w 50 ml podłoża LB. Następnie przenoszono taką objętość hodowli bakteryjnej (we wczesnej fazie wykładniczej) do 5 ml jałowego podłoża LB, aby otrzymać gęstość optyczną OD<sub>600</sub> równą 0,1. 1 ml hodowli biobankowano w glicerolu, a pozostałą część hodowli wirowano (20 minut, 3 500 × g, 4°C). Osad przenoszono do zważonej probówki typu Eppendorf i zamrażano w -20°C jako materiał do izolacji LPS oraz pomiaru jego średniej długości. Pozostałą część bakterii hodowano do osiągnięcia wartości gęstości optycznej OD<sub>600</sub> równej 0,3 oraz wirowano (20 minut, 3 500 × g, 4°C). Osad zawieszano w 3 ml PBS, a następnie rozcieńczano w tym samym roztworze soli w celu uzyskania wartości średniej liczby jednostek tworzących kolonie na mililitr (ang. colony forming unit, CFU/ml) równej 10<sup>7</sup>. Do testu 500 µl zawiesiny komórek bakteryjnych mieszano z 500 µl NSL. Mieszaninę inkubowano z wytrząsaniem w temperaturze 37°C przez 0, 60 i 180 minut (odpowiednio: T<sub>0</sub>, T<sub>60</sub> i T<sub>180</sub>). Wybrane rozcieńczenia wysiewano w dwóch powtórzeniach na płytki z LB agarem i inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 godziny w celu obliczenia średniej liczby komórek bakteryjnych w danym czasie inkubacji w surowicy. Po czasie T<sub>180</sub> hodowlę z NSL wirowano (20 minut, 3 500 × g, 4°C), osad zawieszano w 500 µl PBS i przenoszono do 50 ml świeżej pożywki LB i ponownie hodowano przez 18 godzin z wytrząsaniem w 37°C. Całą procedurę powtarzano 9 dni. Przeżywalność obliczano jako liczbę komórek bakteryjnych (CFU/ml) w czasie T<sub>180</sub> w stosunku do liczby w czasie T<sub>0</sub> (ustalonym jako 100%) wyrażoną w procentach. Eksperyment wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach.

### 7.4.2 Pomiar średniej długości lipopolisacharydu po kontakcie z surowicą ludzką

Do pasażowania w 50% NSL wykorzystano szczep z grupy serologicznej O48, który cechuje się obecnością NeuAc w części O-swoistej LPS. Analiza poziomu NeuAc i porównanie go do ilości Kdo, którego liczba jest stała w cząsteczce LPS (3 cząsteczki Kdo u bakterii *Salmonella* O48) pozwala na określenie średniej długości części O-swoistej LPS [1,141]. Zabezpieczone

podczas pasażu osady bakteryjne przepłukiwano trzykrotnie buforem PBS. W tym celu do osadu dodawano 500  $\mu$ l buforu PBS, wytrząsano, a następnie próbki wirowano (10 minut, 3 500  $\times$  g, 4°C). W kolejnym kroku 100  $\mu$ l osadu bakteryjnego liofilizowano z dodatkiem 20  $\mu$ l standardu wewnętrznego - perseitolu (1 mg/ml) (Koch-Light Laboratories Ltd.).

Do zliofilizowanych próbek dodawano 1 ml metanolowego roztworu HCl otrzymanego poprzez zmieszanie 10 ml metanolu (POCH) z 1,2 ml chlorku acetylu (Sigma-Aldrich). Próbki inkubowano 1 godzinę w 80°C (AccuBlok Labnet). Po inkubacji próbówki ostudzono i odparowano pod strumieniem N<sub>2</sub> (Air Products). Do wysuszonych próbek dodano 100  $\mu$ l bezwodnika octowego (POCH) i 20  $\mu$ l pirydyny (Merck) i inkubowano próbki przez 30 minut w 80°C. Po inkubacji próbówki ponownie studzono i odparowano pod strumieniem N<sub>2</sub> (Air Products). Następnie próbki przepłukano dwukrotnie metanolem (POCH). Do wysuszonych próbek dodano 100  $\mu$ l octanu etylu (Sigma-Aldrich) i poddano analizie. Analizę przeprowadzono wykorzystując chromatografię gazowo-cieczową sprzężoną ze spektrometrią mas (ang. gas-liquid chromatography mass spectrometry, GLC-MS). Do analizy użyto chromatografu FOCUS wyposażonego w kolumnę Zebron ZB-5HT 30 m  $\times$  0,25 mm  $\times$  0,25  $\mu$ m w/5m Guardian (Phenomenex), sprzężonego z detektorem masowym typu pułapki jonowej ITQ 700 (Thermo Scientific). Próbkę rozdzielano w zakresie temperaturowym 150-270°C przez 16 minut. Wykrywanym fragmentem pochodnej kwasu sjałowego (acetylowanego estru metylowego metyloglikozydu NeuAc) był jon pierwotny m/z=446 lub wtórny m/z=386, natomiast wykrywanym fragmentem pochodnej Kdo (acetylowanego estru metylowego metyloglikozydu Kdo) był jon pierwotny m/z=375 lub wtórny m/z=195. Otrzymane wyniki analizowano w programie Xcalibur (Thermo Scientific). Ilość NeuAc mierzono procentowo w stosunku do cząsteczek Kdo.

#### 7.4.3 Izolacja lipopolisacharydu z bakterii *Salmonella* po kontakcie z surowicą ludzką

Z zabezpieczonych próbek wyizolowano lipopolisacharyd zgodnie z metodą Yi i Hackett [142]. W tym celu zamrożoną masę bakteryjną (zabezpieczoną po pasażach) zliofilizowano. Następnie do 10 mg suchej masy bakteryjnej dodano 200  $\mu$ l odczynnika Tri-reagent (Sigma-Aldrich) i intensywnie wytrząsano przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Do próbek dodano 200  $\mu$ l chloroformu (POCH) i intensywnie wytrząsano przez kolejne 10 minut w temperaturze pokojowej. Następnie próbki wirowano (10 minut, 12 000  $\times$  g) i fazę wodną przenoszono do nowych próbek typu Eppendorf. Do pozostałej fazy organicznej dodano 100  $\mu$ l wody ultraczystej, intensywnie wytrząsano przez 10 minut i ponownie zwirowano

(10 minut,  $12\ 000 \times g$ ). Fazę wodną ponownie odciągnięto. Ekstrakcję powtórzono trzykrotnie. Zebraną fazę wodną zliofilizowano, a następnie LPS oczyszczono. W tym celu do próbek dodano 500  $\mu$ l zimnego roztworu 0,375 M  $MgCl_2$  w 95% etanolu (POCH) i wytrząsano przez 10 minut. Następnie próbki wirowano (10 minut,  $12\ 000 \times g$ ), a osad zawieszono w 50  $\mu$ l wody MiliQ.

#### 7.4.3.1 Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym wyizolowanych lipopolisacharydów

Rozdział LPS prowadzono za pomocą SDS-PAGE [143]. W tym celu 5  $\mu$ l wyizolowanego LPS (1 mg/ml) mieszano z 10  $\mu$ l buforu redukującego Laemmliego, gotowano przez 5 minut i наносzono do studzienek. Rozdział elektroforetyczny prowadzono przy użyciu Mini-PROTEAN® Tetra Cell System (Bio-Rad) przy 120 V przez około 90 minut. Uzyskane żełe barwiono z wykorzystaniem metody srebrowej [83,144]. W tym celu żełe umieszczano w szklanym pojemniku i pozostawiano na 60 minut w roztworze utrwalającym. Następnie roztwór usuwano i żełe inkubowano 7 minut w roztworze uczulającym. Po inkubacji żełe przemyto czterokrotnie po 5 minut wodą MiliQ (100 ml), a następnie inkubowano przez 10 minut w roztworze barwiącym. Po inkubacji żełe ponownie czterokrotnie przemywano wodą MiliQ i inkubowano w roztworze wywołującym do pojawienia się obrazu.

##### 7.4.3.1.1 Bufory i odczynniki użyte do elektroforezy lipopolisacharydów

###### **Bufor do żelu dolnego - rozdzielającego (pH $8,8 \pm 0,2$ )**

- Tris (Sigma-Aldrich) 18,2 g
- SDS (Sigma-Aldrich) 0,4 g
- Woda MiliQ 100 ml

###### **Bufor do żelu górnego - zagęszczającego (pH $6,8 \pm 0,2$ )**

- Tris (Sigma-Aldrich) 6,6 g
- SDS (Sigma-Aldrich) 0,4 g
- Woda MiliQ 100 ml

###### **30% roztwór akrylamidu**

- Akrylamid (Sigma-Aldrich) 30 g
- Bisakrylamid (Sigma-Aldrich) 0,6 g
- Woda MiliQ 100 ml



### **10% roztwór nadsiarczanu amonu (ang. ammonium persulfate, APS)**

- APS (Sigma-Aldrich) 0,1 g
- Woda MiliQ 1 ml

### **10% roztwór SDS**

- SDS (Sigma-Aldrich) 10 g
- Woda MiliQ 100 ml

### **Bufor do elektroforezy – roztwór 10 × stężony**

- Tris (Sigma-Aldrich) 15,15 g
- Glicyna (Sigma-Aldrich) 72 g
- Woda MiliQ 500 ml

Przed rozpoczęciem eksperymentu do 100 ml buforu dodawano 10 ml 10% SDS oraz 890 ml wody MiliQ.

### **Żel dolny do elektroforezy LPS - rozdzielający 15% (pH 8,8 ± 0,2) - skład podany w przeliczeniu na 2 żele**

- Woda MiliQ 1,645 ml
- Bufor do żelu dolnego 3,3 ml
- 30% roztwór akrylamidu 5 ml
- APS 100 µl
- TEMED (Sigma-Aldrich) 10 µl

### **Żel górny do elektroforezy LPS - zagęszczający 5% (pH 6,8 ± 0,2) - skład podany w przeliczeniu na 2 żele**

- Woda MiliQ 0,775 ml
- Bufor do żelu dolnego 3,3 ml
- 30% roztwór akrylamidu 1,2 ml
- APS 50 µl
- TEMED (Sigma-Aldrich) 5 µl

#### 7.4.3.1.2 Bufory i odczynniki użyte do barwienia lipopolisacharydów

Skład roztworów podany w przeliczeniu na 2 żele

##### **Roztwór utrwalający:**

- Alkohol etylowy 96% (POCH) 80 ml
- Kwas octowy 99,5-99,9% (POCH) 10 ml
- Woda MiliQ 110 ml

##### **Roztwór uczulający:**

- Kwas nadjodowy (Sigma-Aldrich) 1,4 g
- Woda MiliQ 200 ml

##### **Roztwór barwiący:**

A:

- 25% Amoniak (POCH) 4 ml
- 0,1 M Wodorotlenek sodu (Sigma-Aldrich) 56 ml

B:

- Azotan srebra (Sigma-Aldrich) 1 g
- Woda MiliQ 5 ml

Do roztworu A dodano na mieszadło magnetycznym kroplami roztwór B i uzupełniono 110 ml wody MiliQ.

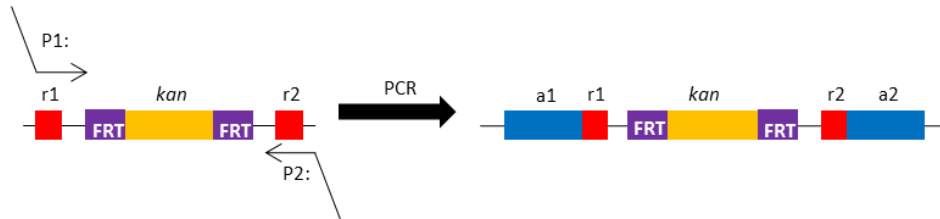
##### **Roztwór wywołujący:**

- Kwas cytrynowy (Sigma-Aldrich) 0,02 g
- 37% Formaldehyd (Sigma-Aldrich) 0,2 ml
- Woda MiliQ 200 ml

## 7.5 Konstrukcja bakteryjnych mutantów chromosomalnych o różnej długości części O-swoistej lipopolisacharydu

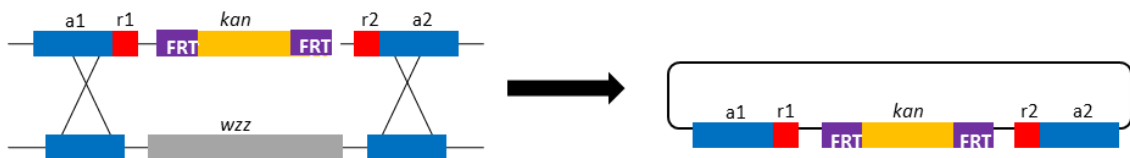
Pomimo licznych prób, nie udało się skonstruować mutantów chromosomalnych o różnej długości części O-swoistej LPS szczepu *S. diarizonae* PCM 2511. W związku z tym w niniejszej pracy doktorskiej do konstrukcji mutantów o skróconej długości łańcucha O-swoistego LPS wykorzystano szczep *S. Enteritidis* PCM 2817 oraz system hiper-rekombinacji  $\lambda$  Red (rycina 7). System ten został zapożyczony z bakteriofaga  $\lambda$  i umożliwia rekombinację chromosomu bakteryjnego z liniowym fragmentem DNA. System rekombinacji faga  $\lambda$  składa się z trzech genów: *exo*, *bet* i *gam*. Gen *exo* koduje egzonukleazę 5'→3' zależną od dwuniciowego DNA, gen *bet* koduje białko wiążące powstałe jednoniciowe DNA. Natomiast gen *gam* koduje białko, zapobiegające strawieniu liniowego fragmentu DNA przez obecne w komórce endonukleazy bakteryjne [145]. System hiper-rekombinacji  $\lambda$  Red jest obecnie powszechnie stosowany do insercji lub delecji określonych genów u mikroorganizmów [146–149]. W celu usunięcia genu docelowego, komórkę bakteryjną z wprowadzonym wcześniej plazmidem kodującym system  $\lambda$  Red (plazmid pKD46, tabela 3) poddaje się transformacji z utworzonym w reakcji PCR (ang. polymerase chain reaction, PCR) fragmentem liniowego DNA. Wprowadzany do komórki bakteryjnej produkt PCR składa się z homologicznej sekwencji do genu docelowego w chromosomie bakteryjnym, markera selekcyjnego oraz dwóch sekwencji FRT (ang. flippase recognition target) flankujących wprowadzany fragment. Markerem selekcyjnym jest gen oporności na kanamycynę (plazmid pKD4, tabela 3). System  $\lambda$  Red w wyniku aktywacji wbudowuje wprowadzaną sekwencję w określone miejsce w chromosomie bakteryjnym. Następnie odbywa się selekcja komórek pozytywnych na podłożu z wybranym markerem selekcyjnym oraz w oparciu o sprawdzającą reakcję PCR. Obecność we wprowadzanym do komórki liniowym fragmencie DNA sekwencji FRT umożliwia późniejsze usunięcie wprowadzonego markera selekcyjnego poprzez ekspresję rekombinazy specyficznej do FRT (flipaza FRT-FLP, plazmid pCP20, tabela 3). Po usunięciu markera selekcyjnego na chromosomie bakteryjnym pozostaje sekwencja zbudowana z około 85 nukleotydów, tzw. blizna [146].

1. Amplifikacja genu oporności na antybiotyk z dwudomenowymi starterami, zawierającymi homologiczne sekwencje flankujące do genu docelowego.



a1, a2 – sekwencje homologiczne do genu docelowego (*fepE*, *wzz*, *wzy*)  
 r1, r2 – sekwencje flankująca gen oporności (*kan*)

2. Wbudowanie produktu PCR z użyciem systemu hiper-rekombinacji  $\lambda$  Red i zastąpienie genu docelowego genem oporności na antybiotyk.



3. Usunięcie genu oporności na antybiotyk z wykorzystaniem plazmidu pomocniczego.



Rycina 7. Schemat działania systemu  $\lambda$  Red.

### 7.5.1 Izolacja plazmidowego DNA

Matrycowe DNA plazmidowe zostało wyizolowane ze szczepów *E. coli* BW25113, BT340 oraz BW25141 zawierających odpowiednio plazmidy: pKD46 (system  $\lambda$  Red), pCP20 (flipaza FRT-FLP) oraz pKD4 (marker selekcyjny, kanamycyna) (tabela 3). Plazmidowe DNA wyizolowano z płynnych hodowli (LB, 5ml) po 18-24 godzinnej inkubacji z wytrząsaniem (160-180 rpm) w 30°C (pKD46, pCP20) lub 37°C (pKD4) za pomocą komercyjnego zestawu GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. Stężenie oraz czystość uzyskanego DNA plazmidowego sprawdzono za pomocą spektrofotometru DeNovix DS-11 poprzez pomiar absorbancji przy 260/280 nm.

### 7.5.2 Przygotowanie komórek elektrokompetentnych *S. Enteritidis* PCM 2817 do transformacji plazmidem pKD46, kodującym system $\lambda$ Red

Komórki elektrokompetentne *S. Enteritidis* PCM 2817 przygotowano według protokołu Czerniak i Hensel [150] z drobnymi modyfikacjami. Założono 18-24 godzinną hodowlę szczepu *S. Enteritidis* PCM 2817 w 5 ml płynnego podłoża LB z wytrząsaniem (160-180 rpm) w 37°C. Następnie przeniesiono 500  $\mu$ l nocnej hodowli do 50 ml świeżego podłoża LB i inkubowano do osiągnięcia wartości OD<sub>600</sub> równej 0,6. Po osiągnięciu odpowiedniej wartości gęstości optycznej, hodowlę schłodzono na lodzie i przelano do dwóch 50 ml schłodzonych probówek typu Falcon i zwirowano (10 minut, 4 500  $\times$  g, 4°C). Osad delikatnie zawieszono za pomocą pipety w 1 ml lodowatej wody MiliQ, następnie dodano kolejne 24 ml wody i całość delikatnie wymieszano. Zawiesinę inkubowano na lodzie przez 10 minut, a następnie zwirowano (10 minut, 4 500  $\times$  g, 4°C). Osad ponownie delikatnie zawieszono za pomocą pipety w 1 ml lodowatej wody MiliQ, następnie dodano kolejne 11 ml wody i całość delikatnie wymieszano. Zawiesinę inkubowano na lodzie przez 5 minut oraz zwirowano (10 minut, 4 500  $\times$  g, 4°C), następnie osad delikatnie zawieszono w 1 ml lodowatego 10% glicerolu (Sigma-Aldrich) i przeniesiono do schłodzonych probówek typu Eppendorf. Próbkę inkubowano na lodzie przez 5 minut i zwirowano (10 minut, 4 500  $\times$  g, 4°C). Osad delikatnie zawieszono w 250  $\mu$ l 10% glicerolu w wodzie (Sigma-Aldrich) i całość podzielono na porcje po 100  $\mu$ l do schłodzonych probówek typu Eppendorf. Przygotowane komórki przechowywano w temperaturze -80°C do czasu użycia.

### 7.5.3 Transformacja komórek elektrokompetentnych *S. Enteritidis* PCM 2817 plazmidem pKD46, kodującym system $\lambda$ Red

W celu transformacji 50  $\mu$ l komórek elektrokompetentnych *S. Enteritidis* PCM 2817 połączono na lodzie z 50 ng wyizolowanego DNA plazmidowego pKD46. Następnie mieszaninę przeniesiono do schłodzonej kuwety elektroporacyjnej 1 mm (Cell Projects) oraz wstawiono ją do rynienki elektroporatora (Gene Pulser II Bio-Rad). Warunki elektroporacji ustawiono na 200  $\Omega$ , 1,25 kV i 25  $\mu$ F. Po transformacji do kuwety dodano 1 ml ciepłej pożywki SOC, całość wymieszano i przeniesiono do jałowej probówki typu Eppendorf. Probówkę inkubowano w 30°C z wytrząsaniem (160-180 rpm) przez 1 godzinę. Następnie bakterie zwirowano (2 minuty, 4 500  $\times$  g) i zlano supernatant. Osad bakteryjny zawieszono w 100  $\mu$ l podłoża SOC i wysiano na płytki z LB agarem z dodatkiem ampicyliny (100  $\mu$ g/ml). Płytki inkubowano przez 18-24 godziny w 30 °C.

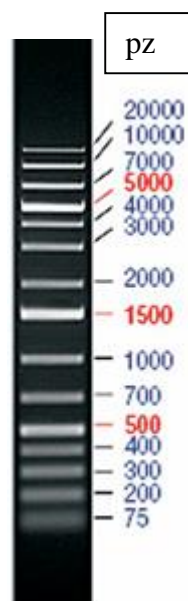
### 7.5.4 Selekcja pozytywnych kolonii *S. Enteritidis* PCM 2817 z wprowadzonym plazmidem pKD46

W celu potwierdzenia pobrania przez bakterie *S. Enteritidis* PCM 2817 plazmidu pKD46 wykonano reakcję PCR. Matrycę do reakcji stanowiły kolonie bakteryjne wyrosłe na podłożu LB agar z dodatkiem ampicyliny. Wybrane kolonie pobrano z szalki Petriego i zawieszono w 20  $\mu$ l jałowej wody MiliQ. Następnie próbki inkubowano przez 3 minuty w 95°C w łaźni wodnej (AJL electronic, MLL.147), zwirowano (60 sekund, 12 000  $\times$  g) i pobrano 1  $\mu$ l supernatantu do reakcji PCR. Skład i warunki reakcji przedstawiono w tabeli 4. W reakcji PCR zostały wykorzystane startery wykrywające kasetę termowrażliwości wprowadzonego plazmidu pKD46. Reakcję PCR przeprowadzono na termocyklerze T100 firmy Bio-Rad.

Tabela 4. Skład i warunki reakcji PCR potwierdzającej czy zaszła transformacja plazmidem pKD46.

<b>Skład:</b>		<b>Objętość [μl]</b>	
Bufor Run (A&A Biotechnology)		2	
10 mM dNTP mix (A&A Biotechnology)		2,5	
Starter repA101tsSTART: tgccttcaaaactggtgagct		1	
Starter repA101tsSTOP: agcaaccagagagctgatgac		1	
Woda MiliQ		11,5	
Polimeraza Run 1U (A&A Biotechnology)		1	
Zawiesina komórek testowanej kolonii bakteryjnej		1	
<b>Etap cyklu</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Czas</b>	<b>Liczba cykli</b>
Wstępna denaturacja	94°C	5 min	1
Denaturacja	94°C	30 s	30
Hybrydyzacja	62°C	30 s	
Wydłużanie	72°C	45 s	
Wydłużanie końcowe	72°C	5 min	1

Produkty PCR zostały rozdzielone w 1% żelu agarozowym. Agarozę (Abo) rozpuszczono w buforze TBE oraz dodano 3 μl barwnika Midori Green Advance (NIPPON Genetics), a następnie wylano do rynienki z grzebieniem (Mini-Sub Cell GT Bio-Rad). Po polimeryzacji na żel nanoszono zamplifikowane produkty reakcji PCR z barwnikiem obciążającym DNA Gel Loading Dye (Thermo Scientific). Jako markera masy używano marker 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific), (rycina 8), nanoszonego po 5 μl na dołek. Rozdział elektroforetyczny przeprowadzano przy stałym napięciu wynoszącym 120 V przez 30 minut, rozdział wizualizowano w świetle UV (PXi Syngene).



Rycina 8. Marker masy 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific).

## 7.5.5 Przygotowanie liniowych fragmentów DNA do transformacji szczepu *S. Enteritidis* PCM 2817 pKD46

### 7.5.5.1 Izolacja genomowego DNA

Matrycowe DNA genomowe zostało wyizolowane z czystej hodowli szczepu *S. Enteritidis* PCM 2817 za pomocą komercyjnego zestawu Genomic Mini (A&A Biotechnology) zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. Hodowlę założono w 5 ml podłoża LB i inkubowano 18-24 godziny z wytrząsaniem (160-180 rpm) w 37°C. Stężenie oraz czystość uzyskanego DNA sprawdzono za pomocą spektrofotometru DeNovix DS-11 poprzez porównanie absorbancji przy 260/280 nm.

### 7.5.5.2 Startery

Startery użyte do reakcji PCR do przygotowania kaset antybiotykooporności oraz startery sprawdzające poprawne zajście procesu rekombinacji przedstawiono w tabeli 5 [7].



Tabela 5. Startery użyte do konstrukcji mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817 o skróconej długości części O-swoistej LPS.

Nazwa startera	Sekwencja startera (5'→3')
wzzSTART	ctccagcttcatccttttttagttagggtatctatgacGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG*
wzzSTOP	gtcgtagccgaccaccatccggcaaagaagcttacaaggCATATGAATATCCTCCTTAG
wzzSTARTspr	tgcgacaacgatacactgct
wzzSTOPspr	cactgaggcgaagccatta
fepESTART	agtcatgaaatcgattgttttagccttataGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
fepESTOP	aatacgccgccgcaggccatcataaccgccaATGAATATCCTCCTTAGTTC
fepESTARTspr	gcgggaaaaagaggcgaatg
fepESTOPspr	gcgatctcaaccgcgaaaaa
wzySTART	atacattgtattatgcttattattataTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
wzySTOP	atatatatgtttcataccgtttcacattgatATGGGAATTAGCCATGGTCC
wzySTARTspr	ttcacatccattctcgttcg
wzySTOPspr	gaaacccactttccaaagca

\* małymi literami oznaczono sekwencję startera komplementarną do miejsca w chromosomie bakteryjnym; wielkimi literami oznaczono sekwencję startera komplementarną do kasety kanamycynowej

### 7.5.5.3 Łańcuchowa reakcja polimerazy

Liniowe fragmenty DNA zostały utworzone w reakcji PCR z wykorzystaniem starterów dwudomenowych, składających się z fragmentu homologicznego do genu docelowego w genomie bakteryjnym (gen *wzz*, *fepE* lub *wzy*) oraz z fragmentu selekcyjnej kasety oporności na antybiotyki (kasety kanamycynowej KmR, plazmid pKD4). Fragment startera homologiczny do genu docelowego w genomie bakteryjnym składa się z 40-50 nukleotydów, natomiast fragment markera selekcyjnego – z około 20 nukleotydów (tabela 5). Skład oraz zastosowane warunki reakcji PCR przedstawiono w tabeli 6. Jakość uzyskanych liniowych fragmentów DNA sprawdzono poprzez rozdział w 1% żelu agarozowym (punkt 7.5.4).

Tabela 6. Skład i warunki reakcji PCR użytej do przygotowania liniowych fragmentów DNA do konstrukcji mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817 o skróconej długości części O-swoistej LPS.

<b>Skład:</b>		<b>Objętość [μl]</b>	
Bufor Dream Taq (Thermo Scientific)		5	
10 mM dNTP mix (A&A Biotechnology)		5	
Starter wzzSTART/fepESTART/wzySTART		1	
Starter wzzSTOP/fepESTOP/wzySTOP		1	
Woda MiliQ		37	
Polimeraza Dream Taq 1,25 U (Thermo Scientific)		0,5	
DNA plazmidowe pKD4		0,5	
<b>Etap cyklu</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Czas</b>	<b>Liczba cykli</b>
Wstępna denaturacja	95°C	2 min	1
Denaturacja	95°C	30 s	34
Hybrydyzacja	58°C	45 s	
Wydłużanie	72°C	90 s	
Wydłużanie końcowe	72°C	10 min	1

#### 7.5.5.4 Oczyszczanie liniowych fragmentów DNA

Po sprawdzeniu jakości uzyskanych liniowych fragmentów DNA, pozostałą część produktów PCR również poddano elektroforezie w 1% żelu agarozowym (7.5.4), bez wizualizacji gotowego rozdziału w świetle UV. Prążki zgodne z wielkością produktu PCR wycięto jałowym skalpelem i oczyszczono z żelu przy pomocy zestawu GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific). Oczyszczone produkty PCR poddano trawieniu restrykcyjnemu enzymem DpnI (Thermo Scientific), w celu uniknięcia klonów fałszywie pozytywnych. Następnie wstępnie oczyszczone i strawione produkty PCR zliofilizowano oraz poddano oczyszczaniu n-butanolem (POCH). W tym celu produkty PCR zawieszono w 50 μl wody MiliQ oraz 500 μl n-butanolu (POCH) i zwirowano (15 minut, 10 000 × g). Osady ponownie zliofilizowano i zawieszono w 20 μl wody MiliQ. Oczyszczone kasety liniowych fragmentów DNA przechowywano do użycia w -20°C.

#### 7.5.6 Przygotowanie komórek elektrokompetentnych *S. Enteritidis* PCM 2817 pKD46 do transformacji liniowymi fragmentami DNA

Komórki elektrokompetentne szczepu *S. Enteritidis* PCM 2817 pKD46 zostały przygotowane zgodnie z procedurą z punktu 7.5.2 z drobnymi modyfikacjami: hodowla szczepu *S. Enteritidis* PCM 2817 pKD46 była prowadzona w podłożu LB z dodatkiem ampicyliny (100 µg/ml) w 30°C, jako induktora systemu  $\lambda$  Red użyto L-arabinozy (10mM) (Sigma-Aldrich).

#### 7.5.7 Transformacja komórek *S. Enteritidis* PCM 2817 pKD46 liniowym fragmentem DNA

Transformacja komórek *S. Enteritidis* PCM 2817 pKD46 została przeprowadzona zgodnie z procedurą z punktu 7.5.3 z drobnymi modyfikacjami: 50 µl komórek elektrokompetentnych *S. Enteritidis* PCM 2817 pKD46 połączono na lodzie z 500 ng liniowego fragmentu DNA (dla genu *wzz*, *fepE* lub *wzy*). Po elektroporacji próbki inkubowano w 37°C oraz wysiewano na płytki LB agar z dodatkiem kanamycyny (12,5 µg/ml). Płytki inkubowano przez 18-24 godzin w 37°C.

W celu konstrukcji mutantu bakteryjnego z wyłączonymi genami *wzz* oraz *fepE* skonstruowano najpierw pojedynczego mutantu z delecją genu *wzz*, usunięto wprowadzoną kasetę oporności na antybiotyki i ponownie przeprowadzono transformację plazmidem pKD46 oraz drugim liniowym fragmentem DNA dla genu *fepE*.

#### 7.5.8 Selekcja pozytywnych kolonii *S. Enteritidis* PCM 2817 pKD46 z wbudowanym liniowym fragmentem DNA

W celu potwierdzenia poprawnego zajścia rekombinacji szczepu *S. Enteritidis* PCM 2817 pKD46 z liniowym fragmentem DNA wykonano reakcję PCR i elektroforezę w 1% żelu agarozowym zgodnie z procedurą zawartą w punkcie 7.5.4. Startery do reakcji PCR przestawiono w tabeli 5. Kolonie z potwierdzoną insercją liniowego fragmentu DNA przesiano na podłoże LB agar i hodowano przez 18-24 godzin w 42°C w celu utraty plazmidu pKD46. Następnie wybrane kolonie przesiano równolegle na płytki z pożywką LB Agar oraz LB Agar z ampicyliną (100 µg/ml) w celu potwierdzenia utraty plazmidu pKD46. Z wytypowanych kolonii pozytywnych przygotowano preparat glicerynowy, który przechowywano w -80°C w celu zabezpieczenia hodowli.

#### 7.5.9 Delecja kanamycynowej kasety antybiotykooporności z wykorzystaniem rekombinazy FLP

W celu usunięcia wprowadzonej kasety antybiotykooporności mutanty *S. Enteritidis* PCM 2817 z wprowadzonym liniowym fragmentem DNA transformowano plazmidem pCP20 zgodnie z procedurą z punktu 7.5.3 z drobnymi modyfikacjami: 50  $\mu$ l komórek elektrokompetentnych *S. Enteritidis* PCM 2817 z wprowadzonym liniowym fragmentem DNA połączono na lodzie z 50 ng plazmidu pCP20. Po elektroporacji próbki inkubowano w 30°C oraz wysiewano na płytki LB agar z dodatkiem ampicyliny (100  $\mu$ g/ml). Płytki inkubowano przez 18-24 godzin w 30°C.

Po nocnej hodowli z płytki wybrano pojedynczą kolonię i zaszczerpiono nią 5 ml pożywki LB. Hodowlę inkubowano przez 18-24 h w 42 °C w celu indukcji ekspresji rekombinazy FLP i usunięcia plazmidu pCP20. Następnie z hodowli nocnej wykonano szereg rozcieńczeń w postępie logarytmicznym i wysiano 50  $\mu$ l bakterii na płytki z LB agarem. Bakterie hodowano w 30°C przez 24 godziny. Z wyrosłych na płytkach kolonii wykonano selekcję poprzez posiew na podłoża: LB agar, LB agar z kanamycyną (50  $\mu$ g/ml) oraz LB agar z ampicyliną (100  $\mu$ g/ml). Płytki z LB agarem i LB agarem z dodatkiem kanamycyny inkubowano w 37°C, a płytki z LB agarem z dodatkiem ampicyliny w 30°C przez 18-24 h. Kolonie, które wyrosły wyłącznie na podłożu LB agar, charakteryzują się brakiem kasety kanamycynowej i plazmidu pCP20. Pobrano reprezentatywne kolonie i założono nocą hodowlę w 5 ml LB i inkubowano w 37°C (160-180 rpm). Kolejnego dnia wykonano preparat glicerynowy i przechowywano w -80°C w celu zabezpieczenia mutantów bakteryjnych.

#### 7.5.10 Sekwencjonowanie

W celu zweryfikowania poprawności zajścia mutacji uzyskane mutanty *S. Enteritidis* PCM 2817 o skróconej długości części O-swoistej LPS zsekwencjonowano w Laboratorium Genomiki i Bioinformatyki Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda, PAN we Wrocławiu. Biblioteka do wysokoprzepustowego sekwencjonowania została przygotowana z wykorzystaniem zestawu NEXTERA FLEX (Illumina) zgodnie z protokołem producenta. Reakcja sekwencjonowania była prowadzona na sekwenatorze MiSEQ z użyciem zestawu MiSEQ Reagent Kit V3 (Illumina). W pierwszej kolejności nastąpiła ocena jakości odczytów z wykorzystaniem oprogramowania FASTQC (Illumina). Do złożenia sekwencji genomu bakteryjnego oraz przyrównania go do sekwencji referencyjnej użyto oprogramowania CLC Genomic Workbench v. 12 (Qiagen).

## 7.6 Metody pomiaru średniej długości lipopolisacharydu

W związku z utworzeniem kolekcji mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817 o skróconej długości części O-swoistej LPS opracowano metodę pomiaru jej średniej długości. Podjednostka O-antygeny *S. Enteritidis* zawiera cztery reszty cukrowe: ramnozę (Rha), mannozę (Man), galaktozę (Gal) oraz tywelozę (3,6-dideoxy-D-arabino-heksoza, Tyv) (rycina 2). Zaprezentowana metoda pomiaru długości opiera się na założeniu, że pomiar proporcji ilościowej składników części O-swoistej (Rha i Tyv) do cukrów występujących w części rdzeniowej (Kdo i heptozy – D-glicero-D-manno-heptozy (Hep)) pozwoli na pomiar średniej długości części O-swoistej LPS. Dodatkowo w opracowanej metodzie mierzono zawartość kwasu N-acetylmuraminowego (ang. N-acetylmuramic acid, MuAc) w komórkach w celu określenia czy zachodzą zmiany w ilości peptydoglikanu ściany komórkowej badanych szczepów bakteryjnych pod wpływem skrócenia części O-swoistej LPS.

### 7.6.1 Izolacja i oczyszczanie lipopolisacharydów

LPS wyizolowano z otrzymanych mutantów bakteryjnych metodą ekstrakcji fenolowo-wodnej [151]. W tym celu 8 g liofilizatu suchej masy bakteryjnej zawieszono w 25 ml wody MiliQ. Następnie dodano 25 ml 90% roztworu fenolu (Sigma-Aldrich), uzyskując mieszaninę bakterii w 45% fenolu. Zawiesinę ogrzewano do temperatury 65°C (AJL electronic MLL.147), intensywnie mieszając przez 15 minut. Następnie mieszaninę schładzano w lodzie do 4°C i wirowano (30 minut, 3 000 × g, 4°C). Frakcję wodną zbierano do osobnego naczynia, a pozostałość uzupełniano kolejną porcją wody MiliQ do początkowej objętości i ponownie ekstrahowano jak wyżej. Połączone frakcje wodne dializowano w workach ZelluTrans T3 o granicy przepuszczania cząsteczek 14 kDa (Roth) do 10 litrów wody MiliQ, do zaniku zapachu fenolu (3-4 dni). Następnie fazy wodne wirowano (30 minut, 3 000 × g, 4°C), supernatant przesączono przez filtr (Whatman) i zliofilizowano. Otrzymany preparat trzykrotnie ultrawirovano na wirówce Sorwall w×+ (Thermo Scientific) (6 godzin, 105 000 × g, 4°C) w celu oczyszczenia uzyskanego preparatu z białek i kwasów nukleinowych. Supernatant po każdym ultrawirowaniu zlewano, a osad zawierający agregaty LPS zawieszano w wodzie MiliQ za pomocą sondy ultradźwiękowej Bandelin Sonoplus GM 2070 (moc 70 W, 9 cykli, 10 sekund/cykl). Oczyszczony i zawieszony w wodzie MiliQ LPS liofilizowano i przechowywano w temperaturze pokojowej do użytku lub zawieszano ponownie w wodzie MiliQ w stężeniu 1 mg/ml.

### 7.6.2 Derywatywacja próbek lipopolisacharydu i masy bakteryjnej do analizy cukrowej

W celu potwierdzenia składu cukrowego LPS przeprowadzono analizę cukrową. W tym celu próbkę masy bakteryjnej (10 mg) hydrolizowano w 1 ml 1% kwasu octowego (POCH) w wodzie w 100°C przez 30 minut, następnie całość wirowano (15 minut, 12 000 × g). Do nadsącza dodawano HCl (Chempur) do końcowego stężenia 1M i przeprowadzono hydrolizę w 80°C przez 2 godziny. Po hydrolizie, próbkę zobojętniano NaOH do lekko zasadowego pH. Po osuszeniu pod strumieniem N<sub>2</sub> (Air Products) i dwukrotnym przepłukaniu metanolem (Chempur) całość zredukowano 1M roztworem NaBH<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich) w wodzie w 4°C przez 24 godziny. Po redukcji pozostałość NaBH<sub>4</sub> rozłożono za pomocą 20 µl stężonego kwasu octowego (POCH), następnie próbkę suszono pod strumieniem N<sub>2</sub> (Air Products), dwukrotnie płukano metanolem (Chempur) i poddawano acetylacji. W tym celu dodano 50 µl pirydyny (Merck) i 250 µl bezwodnika octowego (POCH), próbkę ogrzewano w 100°C przez 30 minut, następnie suszono pod strumieniem N<sub>2</sub> (Air Products), dwukrotnie płukano metanolem (Chempur) i ekstrahowano w układzie chloroform (POCH):woda. Fazę chloroformową zebrano, osuszono w strumieniu N<sub>2</sub> (Air Products) i rozpuszczono w 100 µl octanu etylu (Sigma-Aldrich) do analizy GLC-MS.

### 7.6.3 Otrzymywanie acetylowanych metyloglikozydów oraz acetylowanych estrów metylowych metyloglikozydów z próbek lipopolisacharydu i masy bakteryjnej

Próbkę masy bakteryjnej (10 mg) hydrolizowano w 4M HCl w metanolu w 80°C przez 17 godzin. Następnie supernatant odparowano pod strumieniem N<sub>2</sub> (Air Products) i dwukrotnie przepłukano metanolem (Chempur). Próbkę poddano acetylacji: po dodaniu 20 µl pirydyny (Merck) i 100 µl bezwodnika octowego (POCH) próbkę ogrzewano w 100°C przez 30 minut, następnie suszono pod strumieniem N<sub>2</sub> (Air Products), dwukrotnie płukano metanolem (Chempur) i ekstrahowano w układzie chloroform (POCH):woda. Fazę chloroformową zebrano, osuszono w strumieniu N<sub>2</sub> (Air Products) i rozpuszczono w 100 µl octanu etylu (Sigma-Aldrich) do analizy GLC-MS.

Próbkę LPS (1 mg) hydrolizowano w 0,75M HCl w metanolu w 80°C przez 1 godzinę, a następnie zobojętniano NaOH w metanolu do lekko zasadowego pH. Następnie próbkę odwirowywano (5 minut, 12 000 × g), a supernatant odparowano pod strumieniem N<sub>2</sub> (Air Products) i dwukrotnie przepłukano metanolem (Chempur). Acetylację oraz ekstrakcję w układzie chloroform (POCH):woda przeprowadzono analogicznie jak dla masy bakteryjnej. Otrzymane acetylowane metyloglikozydy Tyv, Rha oraz Hep oraz acetylowane estry

metylowe metyloglikozydów Kdo i MuAc analizowano techniką GLC-MS. Eksperyment wykonano w czterech niezależnych powtórzeniach. Dane poddano analizie statystycznej z użyciem oprogramowania GraphPad Prism 9.0.

#### 7.6.4 Analiza GLC-MS

Analizę otrzymanych pochodnych monosacharydów: acetylowanych metyloglikozydów i acetylowanych estrów metylowych metyloglikozydów, prowadzono na chromatografie gazowym FOCUS wyposażonym w kolumnę Zebron ZB-5HT 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm, 5m Guardian (Phenomenex) sprzężonym z detektorem masowym typu pułapki jonowej ITQ 700 (Thermo-Scientific). Identyfikację pochodnych cukrów prowadzono na podstawie czasu retencji i widma masowego. Analizowano zawartość pochodnych: Tyv (acetylowany metyloglikozyd tywelozy), Rha (acetylowany metyloglikozyd ramnozy), Hep (acetylowany metyloglikozyd heptozy), MuAc (acetylowany ester metylowy metyloglikozydu kwasu muraminowego) oraz Kdo (acetylowany ester metylowy metyloglikozydu Kdo). W reakcji metanolizy typowe jest powstawanie do czterech pochodnych metyloglikozydowych dla monosacharydów o sześciu i więcej atomach węgla (anomery  $\alpha$  i  $\beta$  formy piranozowej i furanozowej), dla Tyv i Rha otrzymywano po cztery pochodne każdego z monosacharydów, dla Kdo otrzymywano dwie pochodne, a w przypadku Hep i MuAc po jednej pochodnej. Otrzymane wyniki analizowano w programie Xcalibur (Thermo Scientific). Szczyty odpowiadające poszczególnym pochodnym cukrowym identyfikowano na podstawie ich widma masowego i czasu retencji; sumowano wyniki dla poszczególnych form każdego z cukrów; ilość Rha i Tyv, jako składników polisacharydu O-swoistego porównywano do ilości Kdo oraz Hep, jako składników rdzenia LPS. Otrzymane proporcje pomiędzy składnikami O-antygeny oraz rdzenia, odpowiadające średniej długości cząsteczek lipopolisacharydu danego mutantu były porównywane pomiędzy poszczególnymi mutantami *S. Enteritidis* PCM 2817.

## 7.7 Ocena modelowej patogenności *in vitro* – wpływ długości lipopolisacharydu na interakcje z układem dopełniacza

### 7.7.1 Określenie poziomu przeżywalności badanych mutantów w surowicy ludzkiej

W celu określenia przeżywalności badanych mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817 o skróconej długości części O-swoistej LPS w surowicy ludzkiej przeprowadzono test jej bakteriobójczego działania według metody opisaną w pracy Dudek i wsp. [6]. W teście określono przeżywalność badanych szczepów w trzech typach surowicy: NSL, NSL/KL oraz NSL/A. Badane mutanty *S. Enteritidis* hodowano 18 godzin z wytrząsaniem w 37°C w 3 ml podłoża LB. Następnie 500 µl hodowli bakteryjnej we wczesnej fazie wykładniczej przenoszono do 5 ml jałowego podłoża LB. Hodowlę inkubowano w 37°C do osiągnięcia gęstości optycznej OD<sub>600</sub> równej 0,3 oraz wirowano (20 minut, 3 500 × g, 4°C). Osad zawieszano w 3 ml PBS, a następnie rozcieńczano w tym samym roztworze soli w celu uzyskania CFU/ml 10<sup>7</sup>. Do przeprowadzenia testu porcję 250 µl zawiesiny komórek bakteryjnych mieszano z 250 µl odpowiedniej surowicy. Mieszaniny te inkubowano z wytrząsaniem w temperaturze 37°C przez 0, 30, 60 i 120 minut (odpowiednio: T<sub>0</sub>, T<sub>30</sub>, T<sub>60</sub> i T<sub>120</sub>). Wybrane rozcieńczenia wysiewano w dwóch powtórzeniach na płytki z LB agarem i inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 godziny w celu obliczenia średniej liczby komórek bakteryjnych w danym czasie inkubacji w surowicy. Przeżywalność obliczano, jako liczbę komórek bakteryjnych (CFU/ml) w czasie T<sub>30</sub>, T<sub>60</sub> i T<sub>120</sub> w stosunku do liczby w czasie T<sub>0</sub> (ustalonym jako 100%) wyrażoną w procentach. Jako kontrolę zastosowano inaktywowaną termicznie surowicę (ITS). W celu inaktywacji białek układu dopełniacza próbki surowicy inkubowano w temperaturze 56°C przez 30 minut. **Surowica kontrolna w dalszej części pracy jest oznaczona jako ITS.** Każde doświadczenie wykonano minimum w trzech powtórzeniach.

### 7.7.2 Określenie poziomu aktywacji układu dopełniacza przez badane szczepy bakteryjne

Oznaczanie ilościowe odkładania czynnika C5b-9 przydatne jest do oceny zdolności komórek i przeciwciał do aktywacji układu dopełniacza. Stosując przeciwciało, które identyfikuje antygen dla kompleksu C5b-9, można określić ilość kompleksów C5b-9 na komórkach za pomocą cytometrii przepływowej [152]. Badane mutanty *S. Enteritidis* PCM 2817 hodowano 18-24 godzin z wytrząsaniem (160-180 rpm) w 37°C w 5 ml podłoża LB. Następnie 500 µl hodowli bakteryjnej we wczesnej fazie wykładniczej przenoszono do 5 ml jałowego podłoża LB. Hodowlę inkubowano w 37°C do osiągnięcia gęstości optycznej OD<sub>600</sub> równej 0,3.



Bakterie zwirowano (5 minut,  $10\ 000 \times g$ ,  $4^{\circ}C$ ) i przepłukano trzykrotnie buforem PBS.  $4 \times 10^8$  (CFU/ml) komórek bakteryjnych zawieszono w 200  $\mu$ l PBS i dodano 200  $\mu$ l NSL. Bakterie inkubowano z NSL 30 minut w  $37^{\circ}C$  z wytrząsaniem (700-900 rpm). Kontrolę stanowił szczep dziki inkubowany z NSL z dodatkiem 50mM EDTA. Po inkubacji bakterie zwirowano (5 minut,  $10\ 000 \times g$ ,  $4^{\circ}C$ ) i przepłukano trzykrotnie buforem PBS. Osad bakteryjny zawieszono w 100  $\mu$ l roztworu PBS z mysimi przeciwciałami anti-ludzkie C5b-9 (5  $\mu$ g/ml, Dako) i inkubowano 45 minut z wytrząsaniem (700-900 rpm) w temperaturze otoczenia. Po inkubacji bakterie zwirowano (5 minut,  $10\ 000 \times g$ ,  $4^{\circ}C$ ) i przepłukano trzykrotnie buforem PBS. Osad bakteryjny zawieszono w 200  $\mu$ l roztworu PBS z kozimi przeciwciałami anti-mysie IgG skoniugowanymi z fluorochromem Alexa 488 (rozcieńczenie 1:1000, Abcam) i inkubowano 45 minut z wytrząsaniem (700-900 rpm) w temperaturze otoczenia. Po inkubacji bakterie zwirowano (5 minut,  $10\ 000 \times g$ ,  $4^{\circ}C$ ) i przepłukano trzykrotnie buforem PBS. Następnie bakterie utrwalono 1% roztworem formaldehydu (Thermo Scientific) poprzez 15 minutową inkubację w temperaturze otoczenia i zanalizowano za pomocą cytometru przepływowego CyAn ADP Beckman Coulter (Beckman). Eksperyment wykonano w czterech niezależnych powtórzeniach. Dane poddano analizie statystycznej z użyciem oprogramowania GraphPad Prism 9.0.

### 7.7.3 Określenie poziomu aktywacji układu dopełniacza przez izolowane typy lipopolisacharydu

Analizę poziomu aktywacji drogi alternatywnej układu dopełniacza przez poszczególne typy LPS przeprowadzono z wykorzystaniem testu ELISA. Zastosowany test ELISA jest odpowiednikiem komercyjnego testu Wieslab COMPL300, odczytywanym wynikiem reakcji jest ilość zdeponowanego kompleksu C5b-9 na powierzchni LPS. Płytkę Nunc MaxiSorp (Thermo Scientific) opłaszczono izolowanymi typami LPS zawieszonymi w buforze PBS z dodatkiem 10mM  $MgCl_2$  (100  $\mu$ l/dołek). Płytkę inkubowano przez noc w temperaturze otoczenia. Następnie płytkę przepłukano trzykrotnie buforem PBS-T (300  $\mu$ l/dołek). Do dołeków dodano rozcieńczone w TB-T  $MgEGTA$  NSL (100  $\mu$ l/dołek) i inkubowano 1 godzinę w  $37^{\circ}C$ . Rozcieńczenia surowic zostały dobrane na podstawie przeprowadzonych badań wstępnych. Po inkubacji płytkę przepłukano trzykrotnie buforem PBS-T (300  $\mu$ l/dołek). Następnie dodano mysie biotynylowane przeciwciała anti-ludzkie C5b-9 (klon aE11) (Dako) zawieszony w buforze TB (100  $\mu$ l/dołek, rozcieńczenie 1:1000) i inkubowano 1 godzinę w  $37^{\circ}C$ . Płytkę przepłukano trzykrotnie buforem PBS-T (300  $\mu$ l/dołek) i dodano

streptawidynę skoniugowaną z peroksydazą chrzanową (Thermo Scientific) zawieszoną w buforze TB (100  $\mu$ l/dolek, rozcieńczenie 1:2000) i inkubowano 1 godzinę w 37°C. Reakcję barwną wywoływano przez 20 minut z użyciem komercyjnego odczynnika TMB (BioPanda Diagnostics) (100  $\mu$ l/dolek) poprzez inkubację w ciemności. Reakcję kolorymetryczną zatrzymano poprzez dodanie 0,5M roztworu H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (POCH) (30  $\mu$ l/dolek). Absorbancję zmierzono przy długości fali 450 nm (BioTek Power Wave XS). Eksperyment wykonano w czterech niezależnych powtórzeniach. Dane poddano analizie statystycznej z użyciem oprogramowania GraphPad Prism 9.0.

#### 7.7.4 Analiza wiązania składnika C3 układu dopełniacza przez badane szczepy bakteryjne

Analizę wiązania składnika C3 do całych komórek bakteryjnych przeprowadzono z wykorzystaniem cytometru przepływowego CyAn ADP Beckman Coulter. Badane mutanty *S. Enteritidis* PCM 2817 hodowano 18-24 godzin z wytrząsaniem (160-180 rpm) w 37°C w 5 ml podłoża LB. Następnie 500  $\mu$ l hodowli bakteryjnej we wczesnej fazie wykładniczej przenoszono do 5 ml jałowego podłoża LB. Hodowlę inkubowano w 37°C do osiągnięcia gęstości optycznej OD<sub>600</sub> równej 0,3. Bakterie zwirowano (5 minut, 10 000  $\times$  g, 4°C) i przepłukano trzykrotnie buforem PBS. 4 $\times$ 10<sup>8</sup> komórek bakteryjnych zawieszono w 200  $\mu$ l PBS i dodano 200  $\mu$ l NSL/A. Bakterie inkubowano z NSL/A 30 minut w 37°C z wytrząsaniem (700-900 rpm). Kontrolę stanowiła inkubacja badanych szczepów z ITS. Po inkubacji bakterie zwirowano (5 minut, 10 000  $\times$  g, 4°C) i przepłukano trzykrotnie buforem PBS. Osad bakteryjny zawieszono w 100  $\mu$ l roztworu PBS z króliczymi przeciwciałami anti-ludzkie C3d (2  $\mu$ g/ml, Dako) i inkubowano 45 minut z wytrząsaniem (700-900 rpm) w temperaturze otoczenia. Po inkubacji bakterie zwirowano (5 minut, 10 000  $\times$  g, 4°C) i przepłukano trzykrotnie buforem PBS. Osad bakteryjny zawieszono w 200  $\mu$ l roztworu PBS z kozimi przeciwciałami anti-królicze IgG skoniugowanymi z fluorochromem Alexa 488 (rozcieńczenie 1:10000, Abcam) i inkubowano 45 minut z wytrząsaniem (700-900 rpm) w temperaturze otoczenia. Po inkubacji bakterie zwirowano (5 minut, 10 000  $\times$  g, 4°C) i przepłukano trzykrotnie buforem PBS. Następnie bakterie utrwalono 1% roztworem formaldehydu (Thermo Scientific) poprzez 15 minutową inkubację w temperaturze otoczenia i zanalizowano za pomocą cytometru przepływowego. Eksperyment wykonano w czterech niezależnych powtórzeniach. Dane poddano analizie statystycznej z użyciem oprogramowania GraphPad Prism 9.0.

### 7.7.5 Analiza wiązania składnika C3 układu dopełniacza przez izolowane typy lipopolisacharydu

Analizę wiązania składnika C3 do izolowanych typów LPS przeprowadzono z wykorzystaniem testu ELISA. Płytkę Nunc MaxiSorp (Thermo Scientific) opłaszczono izolowanymi frakcjami LPS zawieszonymi w buforze PBS z dodatkiem 10mM MgCl<sub>2</sub> (100 µl/dołek). Płytkę inkubowano przez noc w temperaturze otoczenia. Następnie płytkę przepłukano trzykrotnie buforem PBS-T (300 µl/dołek). Do dołeków dodano rozcieńczone w TB-T MgEGTA NSL (100 µl/dołek) i inkubowano 1 godzinę w 37°C. Rozcieńczenia surowic zostały dobrane na podstawie przeprowadzonych badań wstępnych. Następnie płytkę przepłukano trzykrotnie buforem PBS-T (300 µl/dołek). Następnie dodano przeciwciała królicze anti-ludzkie C3c lub C3d zawieszony w buforze TB (100 µl/dołek, rozcieńczenie 1:1000) i inkubowano 1 godzinę w 37°C. Płytkę przepłukano trzykrotnie buforem PBS-T (300 µl/dołek) i dodano kozie przeciwciała anti-królicze IgG skoniugowane z peroksydazą chrzanową zawieszony w buforze TB (100 µl/dołek, rozcieńczenie 1:2000) i inkubowano 1 godzinę w 37°C. Reakcję barwną wywoływano przez 20 minut z użyciem komercyjnego odczynnika TMB (BioPanda Diagnostics) (100 µl/dołek) poprzez inkubację w ciemności. Reakcję kolorymetryczną zatrzymano poprzez dodanie 0,5M roztworu H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (POCH) (30 µl/dołek). Zmierzono absorbancję przy długości fali 450 nm (BioTek Power Wave XS). Eksperyment wykonano w czterech niezależnych powtórzeniach. Dane poddano analizie statystycznej z użyciem oprogramowania GraphPad Prism 9.0.

### 7.7.6 Analiza rozkładu składnika C3 układu dopełniacza w surowicy pod wpływem badanych szczepów bakteryjnych

#### 7.7.6.1 Przygotowanie materiału do badań

Wpływ długości LPS na rozkład składnika C3 układu dopełniacza w surowicy określono za pomocą techniki Western blot. Badane mutanty *S. Enteritidis* PCM 2817 hodowano 18-24 godzin z wytrząsaniem (180 rpm) w 37°C w 5 ml podłoża LB. Następnie 500 µl hodowli bakteryjnej we wczesnej fazie wykładniczej przenoszono do 5 ml jałowego podłoża LB. Hodowlę inkubowano w 37°C do osiągnięcia gęstości optycznej OD<sub>600</sub> równej 0,3. Bakterie zwirowano (5 minut, 10 000 × g, 4°C) i przepłukano trzykrotnie buforem PBS. 2 × 10<sup>8</sup> (CFU/ml) komórek bakteryjnych zawieszono w 200 µl PBS i dodano 200 µl NSL/A. Bakterie inkubowano 10 minut w 37°C z wytrząsaniem (700-900 rpm).

Następnie bakterie zwirowano (5 minut, 10 000 x g, 4°C) i oddzielono supernatant od osadu. Kontrolę eksperymenty stanowiła 50% NSL/A z buforem PBS.

#### 7.7.6.2 Rozdział białek w żelu poliakrylamidowym

Supernatant połączono z buforem do prób oraz buforem redukującym Bolt™ (Novex, Invitrogen) i gotowano przez 10 minut. Rozdziału elektroforetycznego dokonano z wykorzystaniem gotowych żeli WedgeWell™ 10% Tris-Glycine Mini Gels (Invitrogen) w aparacie Mini Gel Tank w buforze Bolt™ MES (Invitrogen) przy 165V przez 45 minut.

#### 7.7.6.3 Transfer białek z żelu na membranę nitrocelulozową oraz detekcja

Rozdzielone w żelu poliakrylamidowym białka zostały zanalizowane techniką Western blot z użyciem systemu iBlot 2™ zgodnie z instrukcją producenta (Invitrogen). Transfer został przeprowadzony przy napięciu 20 V przez 7 minut. Po transferze membranę nitrocelulozową umieszczono w szklanym naczyniu i inkubowano przez 1 godzinę z wytrząsaniem w temperaturze pokojowej w 5% roztworze mleka w PBS-T. Następnie dodano przeciwciała I-rzędowe w rozcieńczeniu 1:10000 (królicze anty-ludzkie C3c) i inkubowano membranę przez noc z wytrząsaniem w 4°C. Po inkubacji membranę przepłukano trzykrotnie po 15 minut buforem PBS-T, a następnie dodano przeciwciała II-rzędowe (anty-królicze IgG skoniugowane z peroksydazą chrzanową) w rozcieńczeniu 1:10000 zawieszony w roztworze 5% mleka w PBS-T. Membranę z przeciwciałami II-rzędowymi inkubowano przez 1 godzinę z wytrząsaniem w temperaturze pokojowej. Następnie ponownie membranę przepłukano trzykrotnie po 15 minut buforem PBS-T. W kolejnym kroku membranę inkubowano 1 minutę w 10 ml buforu do wizualizacji, a następnie wywołano obraz z wykorzystaniem filmu Super-RX films (Fujifilm Corporation). Eksperyment wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach.

#### **Bufor do wizualizacji – skład na 2 membrany nitrocelulozowe**

- Woda MiliQ 17,8 ml
- Tris-HCl (Sigma-Aldrich) pH 8.5 2 ml
- 250mM luminol (Sigma-Aldrich) 100 µl
- 90mM Kwas p-kumarowy (Sigma-Aldrich) 44 µl
- 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck) 6 µl

7.7.7 Analiza wiązania składnika C9 układu dopełniacza przez badane szczepy bakteryjne  
Analizę wiązania składnika C9 przez badane szczepy bakteryjne przeprowadzono techniką Western blot w osadzie, analogicznie do punktu 7.7.6, używając kozich przeciwciał anty ludzkich C9 (Dako). Eksperyment wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach.

7.7.8 Określenie wpływu długości lipopolisacharydu na proteolityczną aktywność białka PgtE względem składnika C3 układu dopełniacza

W celu określenia wpływu długości części O-swoistej LPS na proteolityczną aktywność białka PgtE względem C3b układu dopełniacza mutanty *S. Enteritidis* PCM 2817 hodowano w 10 ml podłoża indukującego ekspresję białka PgtE [153] w 37°C z wytrząsaniem (160-180 rpm) do otrzymania wartości OD<sub>600</sub> równej 0,3. Następnie  $2,5 \times 10^8$  (CFU/ml) bakterii odplukano z podłoża i zawieszono w 60 µl buforu VBS. Tak przygotowane bakterie inkubowano 4 godziny w 37°C z wytrząsaniem (700-900 rpm) z 1,1 mg/ml białka C3b (Merck). Po inkubacji bakterie zwirowano (15 minut 13 000 × g, 4°C) a supernatanty analogicznie do punktu 7.7.6.2 poddano rozdzielaniu SDS-PAGE oraz analizie Western blot z przeciwciałami królicze anty-ludzkie C3c i C3d (Dako). Eksperyment wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach.

#### **Podłoże indukujące ekspresję białka PgtE (Podłoże N)**

##### **Bufor N (pH 7,4 ± 0,2)**

- 5mM KCl (Sigma-Aldrich)
- 7,5mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck)
- 0,5mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich)
- 1mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich)

Do 100 ml buforu N dodano 0,2% glukozy (Sigma-Aldrich), 10 mg hydrolizatu kazeiny (Difco), 2 µg/ml tiaminy (Sigma-Aldrich) i 0,8µM MgCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich).

## 7.8 Ocena modelowej patogenności *in vitro* – wpływ długości lipopolisacharydu na pochłanianie bakterii przez komórki ssacze

### 7.8.1 Charakterystyka linii komórkowych

#### Linia komórkowa JAWSII (ATCC® CRL-11904™)

Niedojrzałe komórki dendrytyczne pierwotnie wyizolowane ze szpiku myszy C57BL/6.

Warunki hodowli: alpha-MEM (Gibco) z dodatkiem rybonukleozydów, deoksyrybonukleozydów, 4 mM L-glutaminy (Sigma-Aldrich), 1 mM pirogronianu sodu (MP Biomedicals), 5 ng/ml GM-CSF (Thermo Fisher Scientific) i 20% surowicy bydlęcej (Thermo Fisher Scientific). Komórki przesiewano w stosunku 1:2, z częstotliwością raz na siedem dni. Hodowle prowadzono w 37°C z 5% CO<sub>2</sub>.

#### Linia komórkowa RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™)

Makrofagi wyizolowane z myszy BALB/c, transformowane wirusem mysiej białaczki Abelsona.

Warunki hodowli: RPMI 1640 (Gibco) z dodatkiem 2mM pirogronianu sodu (MP Biomedicals), 10mM HEPES (Sigma-Aldrich), 0,1mM 2-merkaptoetanol (Gibco) i 10% surowicy bydlęcej (Thermo Fisher Scientific). Komórki przesiewano w stosunku 1:3, z częstotliwością raz na 2-3 dni. Hodowle prowadzono w 37°C z 5% CO<sub>2</sub>.

#### Linia komórkowa Caco-2 (ATCC® HTB-37™)

Komórki pochodzące z ludzkiego gruczołaka okrężnicy, wykazujące podobieństwo do enterocytów.

Warunki hodowli: DMEM high glucose (Gibco) z dodatkiem 1% non-essential amino acids (Sigma-Aldrich), 1mM HEPES (Sigma-Aldrich) i 10% surowicy bydlęcej (Thermo Fisher Scientific). Komórki przesiewano w stosunku 1:4, z częstotliwością raz na 3-4 dni. Hodowle prowadzono w 37°C z 5% CO<sub>2</sub>.

### 7.8.2 Barwienie komórek bakteryjnych

Badane mutanty *S. Enteritidis* PCM 2817 hodowano 18-24 godzin z wytrząsaniem (180 rpm) w 37°C w 5 ml podłoża LB. Następnie bakterie we wczesnej fazie wykładniczej hodowli przenoszono do 10 ml jałowego podłoża LB. Hodowlę inkubowano w 37°C do osiągnięcia gęstości optycznej OD<sub>600</sub> równej 0,3.  $1 \times 10^8$  (CFU/ml) bakterii zwirowano (5 minut,  $2\ 500 \times g$ , 4°C) i przepłukano trzykrotnie buforem PBS. Do bakterii dodano 100µl

5 $\mu$ M barwnika DNA SYTO 9 (Thermo Fisher Scientific) w PBS. Bakterie inkubowano 15 minut w 37°C w ciemności. Następnie bakterie odwirowano (5 minut, 2 500  $\times$  g, 4°C) i przepłukano trzykrotnie buforem PBS.

### 7.8.3 Przygotowanie linii komórkowych

Komórki linii JAWSII, RAW 264.7 oraz Caco-2 wysiewano w stężeniu 0,2  $\times$  10<sup>6</sup> komórek na dołek na płytce 24-dołkowej (Thermo Fisher Scientific) w 350  $\mu$ l odpowiedniego medium. Po adhezji komórek do dna płytki (po około 6 godzinach w przypadku linii Caco-2 oraz po nocnej inkubacji w przypadku linii JAWSII oraz Raw 264.7) dodawano wybarwionych bakterii w stężeniu 5  $\times$  10<sup>6</sup> komórek na dołek oraz 150  $\mu$ l świeżego medium hodowlanego. Płytki z linią komórkową RAW 264.7 oraz JAWSII inkubowano 3,5 godziny, natomiast płytkę z linią komórkową Caco-2 12 godzin w 37°C z 5% CO<sub>2</sub>. Po inkubacji komórki RAW 264.7 oraz Caco-2 zostały przepłukane buforem PBS, z nad komórek JAWSII zebrano supernatant. Następnie wszystkie komórki zostały zebrane z naczynia hodowlanego z użyciem 0,25% trypsyny w PBS, odwirowane (5 minut, 2 500  $\times$  g, 4°C) oraz zawieszone w PBS i zanalizowane za pomocą cytometru przepływowego FACSCalibur BD Biosciences. Eksperyment wykonano w czterech niezależnych powtórzeniach. Dane poddano analizie statystycznej z użyciem oprogramowania GraphPad Prism 9.0.

## 7.9 Ocena modelowej patogenności *in vivo* z wykorzystaniem modelu larw barciaka większego *Galleria mellonella*

Do określenia modelowej patogenności *in vivo* badanych mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817 zastosowano larwy barciaka większego (łac. *Galleria mellonella*). Larwy *G. mellonella* charakteryzują się złożonym systemem nieswoistej odpowiedzi immunologicznej i cechuje je duża homologia do pierwotnego układu odpornościowego kręgowców [154–156]. Brak przeciwskażeń etycznych, prosta hodowla i niewielkie koszty z nią związane czynią larwy barciaka większego dogodnym organizmem modelowym do badania zjadliwości różnych drobnoustrojów [157–159].

### 7.9.1 Selekcja larw

Do oceny modelowej patogenności *in vivo* wykorzystano tylko larwy w ostatnim stadium larwalnym, które charakteryzowały się długością ciała od 15 do 25 mm, masą ciała około 330 mg ( $\pm$  30 mg), dużą ruchliwością oraz kremową barwą bez ciemnych przebarwień, które mogłyby świadczyć o potencjalnej infekcji.

### 7.9.2 Przygotowanie inokulum bakteryjnego

Mutanty *S. Enteritidis* PCM 2817 hodowano 18 godzin w 37°C w 10 ml podłoża LB z wytrząsaniem (160-180 rpm). Następnie hodowle wirowano (10 minut, 3000  $\times$  g, 4°C). Do osadu dodano 10 ml jałowego PBS i ponownie zwirowano (10 minut, 3000  $\times$  g, 4°C). Płukanie buforem PBS powtarzano trzykrotnie. Następnie masę bakteryjną zawieszono w 10 ml jałowego buforu PBS i rozcieńczono w celu uzyskania inokulum bakteryjnego o wartości OD<sub>600</sub> równej: 0,1; 0,01 oraz 0,001. Do ustalania wartości gęstości optycznej użyto kuwet UVette (Eppendorf) oraz spektrofotometru Eppendorf BioPhotometer.

### 7.9.3 Test przeżywalności larw po iniekcji zawiesiną badanego szczepu bakteryjnego

Wartość CFU/ml przygotowanych zawiesin bakteryjnych określono zgodnie z metodą Miles i Misra [160]. W tym celu wykonano szereg rozcieńczeń w postępie logarytmicznym dla każdego szczepu bakteryjnego, i dla każdej wartości gęstości optycznej OD<sub>600</sub> (0,1; 0,01; 0,001). Następnie naniesiono po 10  $\mu$ l każdego rozcieńczenia zawiesiny bakteryjnej o określonej wartości OD<sub>600</sub> na płytkę z LB agarem w trzech powtórzeniach. Po naniesieniu wszystkich rozcieńczeń zawiesin każdą płytkę pozostawiono do góry wieczkiem, by krople zawiesin uległy adsorpcji do podłoża. Następnie płytki inkubowano



przez 18-20 godzin w 37°C. Po inkubacji zliczano liczbę kolonii dla poszczególnych rozcieńczeń zawiesin każdego szczepu bakteryjnego o odpowiedniej wartości OD<sub>600</sub>. Następnie obliczano średnią wartość CFU/ml każdej zawiesiny o poszczególnej gęstości optycznej: OD<sub>600 (1)</sub>=0,1; OD<sub>600 (2)</sub>=0,01; OD<sub>600 (3)</sub>=0,001.

Test przeżywalności został przeprowadzony dla grupy eksperymentalnej 15 larw, dla każdej przygotowanej wcześniej zawiesiny bakteryjnej (OD<sub>600 (1)</sub> = 0,1; OD<sub>600 (2)</sub> = 0,01, OD<sub>600 (3)</sub> = 0,001). Każdorazowo iniekcję przeprowadzano poprzez wstrzykiwanie do hemocelu larwy 10 µl odpowiednio przygotowanej zawiesiny bakteryjnej. Larwy nastrzykiwano strzykawką typu Hamilton serii 1700 o ostrzu 1705N, grubości 22 s i końcówce typu 2 (12°) (Hamilton Bonaduz). Po iniekcji, larwy przechowywano w szalkach Petriego (Bionovo) w 37°C. Kontrolę w eksperymencie stanowiła grupa 15 larw, nastrzykiwanych buforem PBS. Po iniekcji obserwowano przeżywalności larw w czasie 120 godzin, odczytując wyniki co 24 godziny. Układ immunologiczny owada jako odpowiedź na obecność patogenów w hemocelu uruchamia reakcję melanizacji. Stopień zmiany barwy z kremowej na brązową jest odzwierciedleniem stopnia rozwoju infekcji. Podczas odczytu wyników larwy były uznawane za martwe, gdy po dotykaniu pęsetą nie wykazywały ruchów, miały utracony turgor i widoczna była melanizacja (kolor ciemnobrązowy, brunatny, szary). Na podstawie zliczania żywych larw dokonywano analizy statystycznej z wyznaczeniem krzywej przeżywalności. Eksperyment wykonano w czterech niezależnych powtórzeniach. Dane poddano analizie statystycznej z użyciem oprogramowania GraphPad Prism 9.0.

## 7.10 Wpływ rozkładu długości cząsteczek lipopolisacharydu na kształtowanie proteomu błony zewnętrznej

W celu określenia czy rozkład długość cząsteczek lipopolisacharydu wpływa na zmiany w proteomie błony zewnętrznej, z badanych mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817 wyizolowano OMP oraz zidentyfikowano je przy użyciu MS. Spektrometria mas cechuje się bardzo dużą czułością pomiarów, jednak przy niskich stężeniach próbki wciąż mogą występować problemy z poprawną identyfikacją białka oraz jego ilościowym oznaczeniem. W związku z czym wyizolowane z badanych szczepów białka po trawieniu trypsyną wyznakowano dodatkowo znacznikami izobarycznymi TMT<sup>TM</sup> (ang. tandem mass tag, TMT) (Thermo Scientific), umożliwiając względną ocenę ilościową białek w badanych próbkach.

### 7.10.1 Izolacja białek błony zewnętrznej

OMP wyizolowano według metody Thein i wsp. wykorzystując sole chaotropowe i prasę Frencha [161]. Badane mutanty *S. Enteritidis* PCM 2817 hodowano 18-24 godzin z wytrząsaniem (180 rpm) w 37°C w 20 ml podłoża LB. Następnie bakterie we wczesnej fazie wykładniczej przenoszono do 200 ml jałowego podłoża LB i inkubowano w 37°C do osiągnięcia gęstości optycznej OD<sub>600</sub> równej 0,8. Hodowlę zwirowano (15 minut, 3000 × g, 4°C) a osad zawieszono w 12 ml 0,1M buforu Tris-HCl (pH 7,3) z dodatkiem 14 mg DNA-zy (Sigma-Aldrich). Następnie użyto prasy Frencha (American Instrument Company) do dezintegracji komórek (dwa cykle przy 10<sup>8</sup>Pa). Zawiesinę bakteryjną zwirowano (15 minut, 3000 × g, 4°C) i rozdzielono resztki komórek od supernatantu. Następnie supernatant połączono z 48 ml lodowatego 0,1M buforu Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 11) i inkubowano 1 godzinę na mieszadle magnetycznym (ES21, Wigo) w 4°C. Po inkubacji supernatant ultrawirovano w wirówce Sorwall wX+ (Thermo Scientific) (1 godzina, 120 000 × g, 4°C). Osad zawierający OMP zawieszono w 2 ml 0,1M buforu Tris-HCl (pH 7,3) i ponownie zwirowano (20 minut, 85 000 × g, 4°C). Następnie osad trzykrotnie zawieszono w 500 µl wody MiliQ i zwirowano (20 minut, 85 000 × g, 4°C). Po ostatnim wirowaniu białka zawieszono w 500 µl wody MiliQ i przechowywano w -20°C do użycia. Dla każdego badanego szczepu *S. Enteritidis* przeprowadzono trzy niezależne hodowle i izolacje białek OMPs. Stężenie wyizolowanych białek określono za pomocą komercyjnego zestawu Pierce<sup>TM</sup> Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit (Thermo Scientific) zgodnie z procedurą producenta.

### 7.10.2 Redukcja, alkilacja oraz trawienie białek błony zewnętrznej

Próbkę do analizy spektrometrycznej przygotowano w oparciu o metodę FASP (ang. filter-aided sample preparation) [162], stosując filtr wirówkowy z membraną z odcięciem masy cząsteczkowej przy 3kDa (VWR), oraz w oparciu o instrukcję TMT Mass Tagging Kits and Reagents (Thermo Scientific) [163]. Do przygotowania buforów użyto odczynników o klasie czystości chemicznej LC-MS.

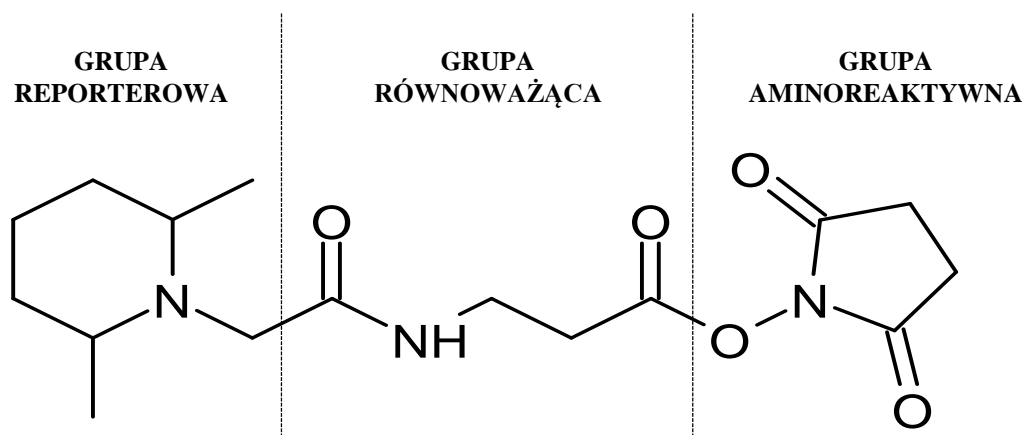
Filtr kondycjonowano przepłukując złożę 500  $\mu$ l wody MiliQ oraz 100  $\mu$ l 100mM buforu TEAB (ang. triethyl ammonium bicarbonate) (Thermo Scientific) wirując filtr każdorazowo po nałożeniu roztworu (15 minut, 10 000  $\times$  g, 4°C). W kolejnym kroku na filtr naniesiono 80  $\mu$ g wyizolowanych białek OMP i próbkę zwirowano (15 minut, 10 000  $\times$  g, 4°C). Następnie filtr przepłukano dwukrotnie 100  $\mu$ l 100mM buforu TEAB (Thermo Scientific). Redukcję mostków disulfidowych utworzonych przez łańcuchy boczne cystein przeprowadzono poprzez dodanie do 100  $\mu$ l 100mM buforu TEAB 5  $\mu$ l 200mM TCEP (ang. tris(2-carboxyethyl)phosphine) (Thermo Scientific). Próbki inkubowano przez 1 godzinę w 55°C. Alkilację grup sulfhydrylowych cystein przeprowadzono przez dodanie do próbek bezpośrednio po inkubacji 5  $\mu$ l 375mM jodoacetamidu (Thermo Scientific). Próbki inkubowano przez 30 minut w ciemności w temperaturze otoczenia. Po zakończeniu inkubacji próbki zwirowano (30 minut, 10 000  $\times$  g, 4°C). Trawienie białek przeprowadzono roztworem trypsyny (Promega) (2  $\mu$ g enzymu w 100  $\mu$ l 50mM buforu TEAB) w temperaturze 37°C przez 18 godzin.

### 7.10.3 Znakowanie peptydów znacznikami izobarycznymi

Do znakowania peptydów użyto znaczników izobarycznych TMTsixplex Label Reagent Set (Thermo Scientific). Znaczniki reagują z pierwszorzędowymi grupami aminowymi, co pozwala na efektywne znakowanie peptydów powstałych w wyniku enzymatycznej hydrolizy białek. Znaczniki zostały tak zaprojektowane, że różnica ich mas ujawnia się dopiero po procesie fragmentacji w spektrometrze mas. Znaczniki TMT są zbudowane z grupy reporterowej, grupy równoważącej oraz grupy amino-reaktywnej (rycina 9). Zastosowany w badaniach znacznik występuje w sześciu wariantach różniących się składem izotopowym grupy reporterowej (126-131 Da) i równoważącej. Sumaryczna nominalna masa całego znacznika jest w każdym przypadku identyczna. Powstałe w wyniku fragmentacji jony reporterowe różnią się masą monoizotopową, porównując ich stosunek intensywności można

określić różnice ilościowe między badanymi próbkami znakowanymi różnymi wariantami znacznika.

Znaczniki TMT (Thermo Scientific) ogrzano do temperatury otoczenia, rozpuszczono w 41  $\mu$ l acetonitrylu (Thermo Scientific) i inkubowano 5 minut mieszając. Następnie do znacznika dodano przygotowany wcześniej hydrolizat trypsynowy i całość inkubowano 1 godzinę w temperaturze otoczenia w ciemności. W celu zahamowania reakcji do próbek dodano 8  $\mu$ l 5% hydroksyloaminy (Thermo Scientific) i inkubowano 15 minut w temperaturze pokojowej. Zastosowane do eksperymentu znaczniki TMT zebrano w tabeli 7. Po wyznakowaniu, pobrano do analizy 10  $\mu$ l mieszaniny dla każdego badanego szczepu w obrębie każdego z trzech eksperymentów. Resztę próbki mrożono w  $-80^{\circ}\text{C}$ .



Rycina 9. Struktura znacznika TMT<sup>TM</sup> Thermo Scientific.

Tabela 7. Znaczniki TMT użyte do znakowania peptydów badanych mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817.

Szczep	Znacznik TMT		
	1 eksperyment	2 eksperyment	3 eksperyment
WT	<b>130</b>	<b>130</b>	<b>130</b>
$\Delta$ fepE	<b>129</b>	<b>129</b>	<b>129</b>
$\Delta$ wzz	<b>131</b>	<b>131</b>	<b>131</b>
$\Delta$ fepE $\Delta$ wzz	<b>126</b>	<b>126</b>	<b>127</b>
$\Delta$ wzy	<b>127</b>	<b>128</b>	<b>128</b>

#### 7.10.4 Identyfikacja i oznaczenie ilościowe peptydów i białek

Próbki rozdzielono za pomocą chromatografii cieczowej z wykorzystaniem aparatu Easy nLC 1000 (Thermo Scientific) oraz poddano analizie spektrometrycznej z wykorzystaniem aparatu LTQ Orbitrap Elite ETD (Thermo Scientific). Podczas rozdzielania chromatograficznego zastosowano następujące odczynniki i parametry: prekolumna nano Acclaim PepMap 100 C18 (Thermo Scientific); kolumna Acclaim PepMap, 75  $\mu\text{m}$   $\times$  50 cm, nanoviper (Thermo Scientific); faza ruchoma A: woda MiliQ, 0,1% kwas mrówkowy (Sigma-Aldrich); faza ruchoma B: mieszanina acetonitryl:woda MiliQ (90:10), 0,1% kwas mrówkowy (Sigma-Aldrich); gradient: 5-55% fazy B w 150 min; przepływ fazy ruchomej: 300 nl/min, nastrzyk 5  $\mu\text{l}$ .

Widma masowe zbierano w trybie jonizacji dodatniej z zakresem skanowania 110-2000 m/z z zastosowaniem fragmentacji HCD dla 10 najintensywniejszych peptydów w zakresie m/z równym 400-1650. Analizę danych oraz identyfikację białek przeprowadzono z wykorzystaniem serwerów Mascot 2.5 oraz Sequest HT w oparciu o bazy danych SwissProt (taksonomia: Bacteria, anotacja ręczna analiza komputerowa, data pobrania 22.03.2021). Parametry przeszukiwania baz danych: tolerancja masy: 10 ppm/0,1 Da; modyfikacje stałe: karbamidometylacja (C); modyfikacje zmienne: oksydacja (M), acetylacja (N-koniec). Do oznaczenia ilościowego białek i peptydów użyto programu Proteome Discoverer 2.4 (Thermo Scientific).

## 7.11 Wpływ surowicy ludzkiej na kształtowanie proteomu błony zewnętrznej

### 7.11.1 Izolacja białek błony zewnętrznej

Ze szczepu dzikiego *S. diarizonae* PCM 2511 oraz z zabezpieczonego szczepu po 9 pasażach w NSL (metoda 7.4.1) wyizolowano białka błony zewnętrznej według metody Murphy i Bartos [164,165].

Szczepy bakteryjne hodowano przez 18 godzin z wytrząsaniem w 37°C w 25 ml podłoża LB. Hodowlę wirowano (20 minut, 3 500 × g, 4°C) a osad zawieszano w 1,25 ml buforu β oraz 11,25 ml 5% Zwittergentu. Zawieszony osad inkubowano na mieszadle magnetycznym (ES21, Wigo) przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Następnie do mieszaniny dodawano 3,13 ml 96% zimnego alkoholu etylowego (POCH) i wirowano (10 minut, 12 000 × g 4°C). Do supernatantu dodawano, ciągle mieszając na mieszadle magnetycznym bardzo powoli 46,75 ml zimnego 96% alkoholu etylowego (POCH), po czym mieszaninę ponownie wirowano (10 minut, 12 000 × g, 4°C). Uzyskany osad suszono w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę. Następnie do osadu dodawano 2,5 ml buforu Z. Po 1 godzinie inkubacji w temperaturze pokojowej z buforem Z mieszaninę inkubowano w temp 4°C przez noc. Po całonocnej inkubacji mieszaninę wirowano (10 minut, 12 000 × g, 4°C) a supernatant zawierający białka OMP rozporcjowano i przechowywano w -20°C do dalszych eksperymentów. Stężenie wyizolowanych białek określono za pomocą komercyjnego zestawu Pierce™ Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit (Thermo Scientific) zgodnie z procedurą producenta.

Bufory użyte do izolacji białek błony zewnętrznej:

#### Zwittergent 5%

- Zwittergent Z 3-14<sup>®</sup> (Calbiochem) 5 g
- 0,5M CaCl<sub>2</sub> (POCH) 5,55 g
- Woda MiliQ 100 ml

#### Bufor β (pH 4)

- 0,001 M β- merkaptoetanol (Merck) 70 μl
- 1M CH<sub>3</sub>COONa (POCH) 8,2 g
- Woda MiliQ 100 ml

### Bufor Z (pH 8)

- Zwittergent Z 3-14<sup>®</sup> (Calbiochem) 0,05 g
- 0,05M Tris (Sigma-Aldrich) 0,606 g
- 0,01 M EDTA (Sigma-Aldrich) 0,372 g
- Woda MiliQ 100 ml

Wyizolowane białka błony zewnętrznej dla szczepu dzikiego *S. diarizonae* PCM 2511 oraz dla szczepu po 9 pasażach w 50% NSL poddano redukcji, alkilacji oraz trawieniu trypsyną zgodnie z procedurą 7.10.2. Trypsynat wyznakowano znacznikami izobarycznymi TMTsixplex Label Reagent Set (Thermo Scientific) zgodnie z procedurą 7.10.3. Zastosowane w doświadczeniu znaczniki TMT przedstawiono w tabeli 8. Identyfikacja i oznaczanie ilościowe białek zostało zlecone w Środowiskowym Laboratorium Spektrometrii Mas w Zakładzie Biofizyki Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN.

Tabela 8. Znaczniki TMT użyte do znakowania peptydów *S. diarizonae* PCM 2511 przed i po pasażowaniu w 50% NSL.

Pasaż	Znacznik TMT		
	1 eksperyment	2 eksperyment	3 eksperyment
0	<b>129</b>	<b>126</b>	<b>126</b>
9	<b>131</b>	<b>128</b>	<b>128</b>

### 7.11.2 Konstrukcja bakteryjnych mutantów chromosomalnych

Na podstawie uzyskanych danych z analizy proteomu błony zewnętrznej po pasażowaniu szczepu *S. diarizonae* PCM 2511 w 50% NSL wytypowano białka, które występowały w większej ilości u szczepu po 9 pasażach w surowicy ludzkiej w porównaniu do szczepu przed pasażami. Na podstawie jednego wytypowanego białek skonstruowano mutant, wykorzystując procedurę opisaną w punkcie 7.5 dla konstrukcji mutantów chromosomalnych o skróconej długości części O-swoistej LPS. Ze względu na problemy z otrzymaniem mutantów dla szczepu wyjściowego *S. diarizonae* PCM 2511 do konstrukcji mutantów białkowych użyto szczep powszechnie wykorzystywany do zabiegów inżynierii genetycznej: *S. Typhimurium* PCM 2255 LT2. W tabeli 9 zebrano startery wykorzystywane do reakcji PCR. Skład i warunki reakcji PCR do utworzenia liniowych fragmentów DNA przedstawiono w tabeli 10.

Tabela 9. Startery użyte do konstrukcji mutantów białkowych *S. Typhimurium* PCM 2255.

Nazwa startera	Sekwencja startera (5'→3')
ompDSTART	*ttataaaatgaaacttaagttagtggcagtggcagtggcGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
ompDSTOP	caaaattagaactgtagttcagaccaacagcaacgatgtATGGGAATTAGCCATGGTCC
ompDfspr	gccattgacaaacgcctcg
ompDrspr	agtctacatcaagagaaaaagccagc

\* małymi literami oznaczono sekwencję startera komplementarną do miejsca w chromosomie bakteryjnym; dużymi literami oznaczono sekwencję startera komplementarną do kasety kanamycynowej



Tabela 10. Skład i warunki reakcji PCR użytej do przygotowania liniowych fragmentów DNA do konstrukcji mutantów białkowych *S. Typhimurium* PCM 2255.

<b>Skład:</b>			<b>Objętość [μl]</b>
Bufor Phusion High-Fidelity (Thermo Scientific)			20
10 mM dNTP mix (A&A Biotechnology)			2
Starter ompDSTART/fliDSTART			2
Starter ompDSTOP/fliDESTOP			2
Woda MiliQ			72
Polimeraza Phusion High-Fidelity 1,25 U (Thermo Scientific)			1
DNA plazmidowe pKD4			1
<b>Etap cyklu</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Czas</b>	<b>Liczba cykli</b>
Wstępna denaturacja	98°C	2 min	1
Denaturacja	98°C	15 s	5
Hybrydyzacja	63°C	15 s	
Wydłużanie	72°C	50 s	
Denaturacja	98°C	15 s	25
Hybrydyzacja	72°C	60 s	
Wydłużanie końcowe	72°C	5 min	1

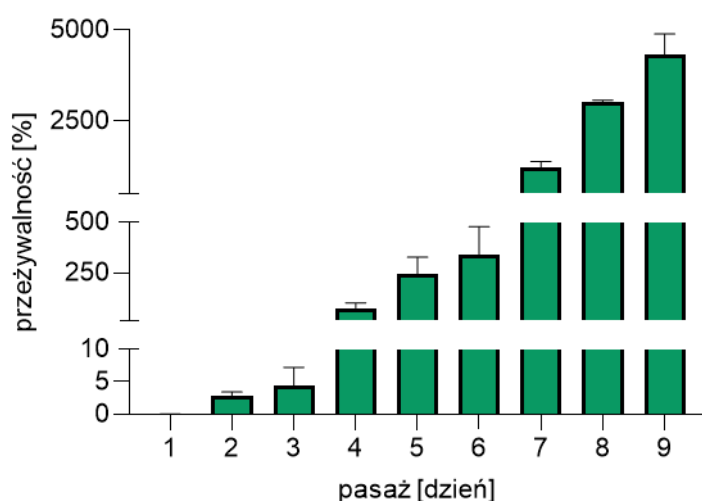
W celu dodatkowego potwierdzenia poprawności zajścia mutacji, wykonano trawienie enzymami restrykcyjnym PstI i/lub XbaI (Thermo Scientific) zgodnie z procedurą producenta. Wynik trawienia restrykcyjnego obrazowano z wykorzystaniem elektroforezy w 1% żelu agarozowym (metoda 7.5.4). Do określenia rozmiaru prążków (jako liczby par zasad, pz), obecnych na żelach agarozowych przed i po trawieniu enzymem restrykcyjnym, wykorzystano program SnapGene®. Po potwierdzeniu poprawnego zajścia mutacji, otrzymany mutant białkowy był testowany pod kątem przeżywalności w 50% NSL zgodnie z metodą opisaną w punkcie 7.7.1.

## 8. WYNIKI

### 8.1 Ocena wpływu surowicy ludzkiej na kształtowanie długości lipopolisacharydu

8.1.1 Określenie poziomu przeżywalności bakterii *Salmonella* podczas pasażowania w surowicy ludzkiej.

Szczep *S. diarizonae* PCM 2511 pasażowano dziewięciokrotnie w 50% NSL zgodnie z procedurą 7.4.1. Przeżywalność szczepu po pasażowaniu w surowicy ludzkiej przedstawiono na rycinie 10 oraz w tabeli 11. Szczep *S. diarizonae* PCM 2511 po pierwszym pasażu w surowicy charakteryzował się przeżywalnością na poziomie 0,05%. Po kolejnych dwóch etapach inkubacji przeżywalność szczepu w 50% NSL utrzymywała się na poziomie 3-4%. Po czwartym pasażu w surowicy przeżywalność szczepu wzrosła do 76%, po piątym 244%, po szóstym 342%, po siódmym 1215%, natomiast po ósmym 3019%. Po dziewięciu pasażach w 50% NSL przeżywalność szczepu *S. diarizonae* PCM 2511 wynosiła 4332%.



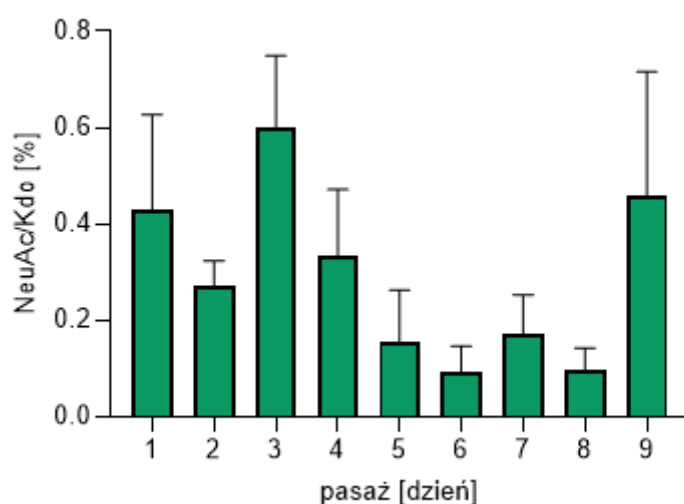
Rycina 10. Przeżywalność szczepu *S. diarizonae* PCM 2511 podczas 9 kolejnych pasażów w 50% NSL. Na wykresach pokazano średnią z odchyleniem standardowym próbki.

Tabela 11. Przeżywalność szczepu *S. diarizonae* PCM 2511 podczas pasażowania w 50% NSL.

Bakteriobójcza aktywność 50% NSL				
Pasaż	CFU/ml		Przeżywalność komórek [%]	
	T <sub>0</sub>	T <sub>120</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>120</sub>
1	$1,18 \times 10^7 \pm 2,68 \times 10^6$	$5,19 \times 10^3 \pm 2,08 \times 10^3$	100 ± 23	0,05 ± 0,03
2	$1,02 \times 10^7 \pm 7,21 \times 10^5$	$2,9 \times 10^5 \pm 7,34 \times 10^4$	100 ± 7	3 ± 0,5
3	$1,38 \times 10^7 \pm 5,72 \times 10^6$	$5,58 \times 10^5 \pm 2,66 \times 10^5$	100 ± 41	4 ± 2
4	$2,89 \times 10^7 \pm 1,01 \times 10^7$	$1,99 \times 10^7 \pm 3,02 \times 10^6$	100 ± 35	76 ± 21
5	$6,31 \times 10^7 \pm 1,24 \times 10^5$	$1,54 \times 10^7 \pm 4,34 \times 10^6$	100 ± 2	244 ± 69
6	$1,24 \times 10^7 \pm 1,74 \times 10^6$	$4,36 \times 10^7 \pm 1,69 \times 10^7$	100 ± 14	342 ± 111
7	$5,46 \times 10^7 \pm 1,91 \times 10^6$	$6,36 \times 10^7 \pm 1,91 \times 10^6$	100 ± 9	1215 ± 143
8	$1,13 \times 10^7 \pm 1,03 \times 10^6$	$3,41 \times 10^8 \pm 3,16 \times 10^7$	100 ± 10	3019 ± 45
9	$1,21 \times 10^7 \pm 1,20 \times 10^6$	$5,23 \times 10^8 \pm 6,26 \times 10^7$	100 ± 35	4332 ± 436

### 8.1.2 Analiza średniej długości lipopolisacharydu po kontakcie z surowicą ludzką

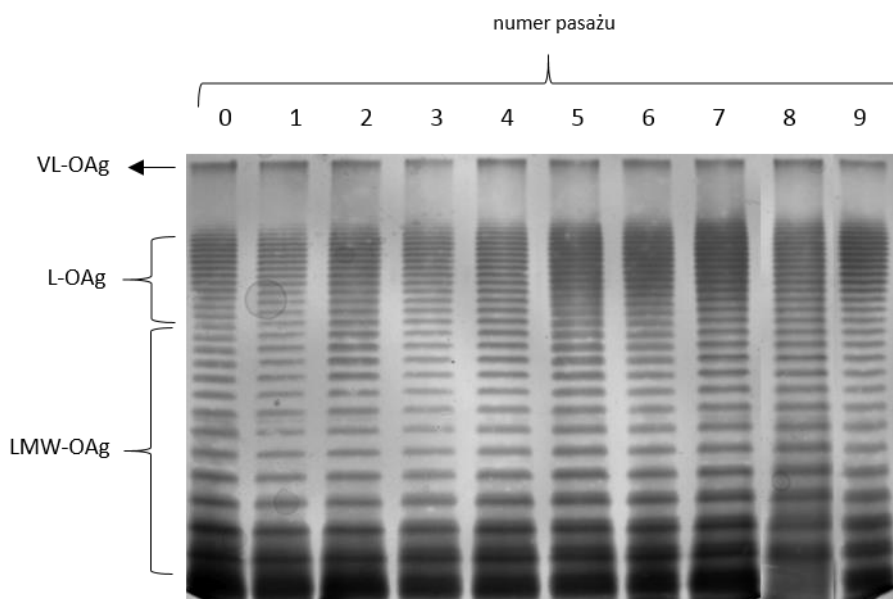
Zabezpieczoną po pasażach w 50% NSL masę bakteryjną analizowano pod kątem zawartości NeuAc i Kdo z wykorzystaniem GLC-MS zgodnie z procedurą 7.4.2 [1,141]. Szczep *S. diarizonae* PCM 2511 po pierwszym pasażu w 50% NSL charakteryzował się wartością NeuAc/Kdo na poziomie 0,43% (rycina 11). Po drugim pasażu wartość NeuAc/Kdo spadła do 0,27%. Po trzecim pasażu wartość NeuAc/Kdo wzrosła do 0,6%. Po kolejnych czterech pasażach w 50% NSL wartość NeuAc/Kdo wahała się pomiędzy 0,33 do 0,09% (po czwartym dniu pasażu: 0,33%, po piątym pasażu: 0,16%, po szóstym pasażu: 0,09%, po siódmym pasażu: 0,17%). Po ósmym pasażowaniu w 50% NSL wartość NeuAc/Kdo wynosiła 0,1% i wzrosła po dziewiątym dniu pasażu do wartości 0,47%. Eksperyment nie wykazał wyraźnej tendencji do wydłużania łańcucha O-swoistego u bakterii poddanych presji selekcyjnej surowicy ludzkiej.



Rycina 11. Analiza zawartości NeuAc/Kdo *S. diarizonae* PCM 2511 podczas 9 kolejnych pasażów w 50% NSL. Na wykresach pokazano średnią z odchyleniem standardowym próbki.

### 8.1.3 Analiza rozkładu długości lipopolisacharydu po kontakcie z surowicą ludzką

Z zabezpieczonej podczas pasażowania w 50% NSL masy bakteryjnej *S. diarizonae* PCM 2511 wyizolowano LPS zgodnie z metodą 7.4.3. Na rycinie 12 przedstawiono rozdział SDS-PAGE lipopolisacharydów wyizolowanych po każdym pasażu w surowicy ludzkiej. Szczep *S. diarizonae* PCM 2511 syntezuje LPS o trzech typach: VL-OAg, L-OAg oraz LMW-OAg. Po 9 pasażach w 50% NSL nie zaobserwowano wyraźnych zmian w ilości VL-OAg oraz LMW-OAg. W elektroforegramie można zaobserwować wzrost intensywności zabarwienia w obszarze L-OAg po 4 pasażu.

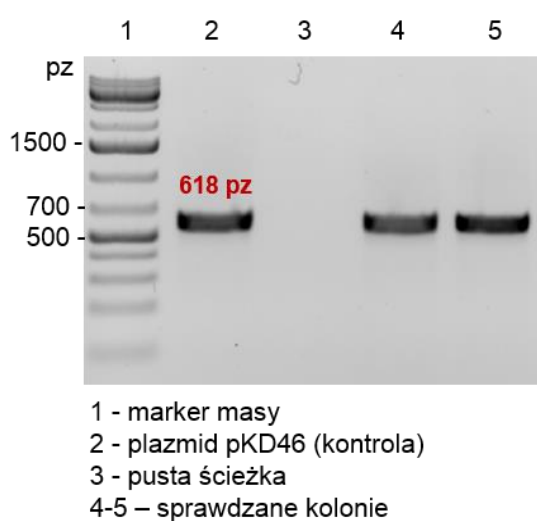


Rycina 12. Rozdział SDS-PAGE LPS *S. diarizonae* PCM 2511 po 9 pasażach w 50% NSL.

Nie wykazano korelacji pomiędzy średnią długością części O-swoistej LPS badanego szczepu (wyrażonej jako NeuAc/Kdo [%]) z poziomem przeżywalności *S. diarizonae* PCM 2511 w 50% NSL. **Pasażowanie w surowicy ludzkiej szczepu *S. diarizonae* PCM 2511 nie pozwoliło na otrzymanie wariantu szczepu, który charakteryzowałby się wyraźnie odrębnym typem lipopolisacharydu. W celu bardziej wnikliwej analizy roli jaką odgrywają poszczególne typy LPS (VL-OAg, L-OAg, LMW-OAg) w zjawisku generowania oporności na surowicę, skonstruowano mutanty bakteryjne różniące się długością części O-swoistej LPS. W związku z brakiem powodzenia przy konstrukcji mutantów bakteryjnych z wykorzystaniem szczepu *S. diarizonae* PCM 2511, mutanty długościowe LPS skonstruowano, wykorzystując szczep *S. Enteritidis* PCM 2817.**

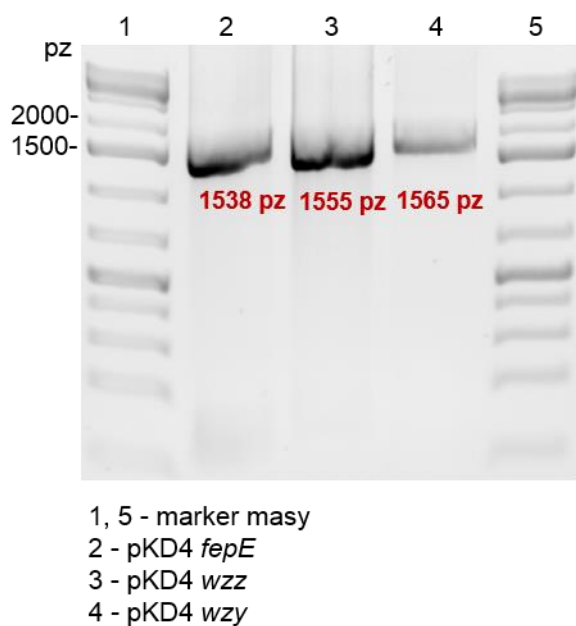
## 8.2 Konstrukcja bakteryjnych mutantów chromosomalnych o różnej długości części O-swoistej lipopolisacharydu

Do konstrukcji mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817 o różnej długości części O-swoistej LPS (rycina 6) wykorzystano system hiper-rekombinacji  $\lambda$  Red (rycina 7). W celu konstrukcji mutantów bakteryjnych w pierwszej kolejności szczep dziki *S. Enteritidis* PCM 2817 transformowano plazmidem pKD46 w celu otrzymania szczepu zdolnego do indukcji hiper-rekombinacji  $\lambda$  Red. Po selekcji szczepu pKD46 pozytywnego, następowała transformacja liniowym fragmentem DNA, której celem było usunięcie genu docelowego (*fepE*, *wzz*, *wzy*) odpowiedzialnego za syntezę różnych typów LPS w komórce bakteryjnej. Ostatni etap doświadczenia obejmował usunięcie wprowadzonej w miejsce usuwanego genu kasety antybiotykooporności. Matrycowe DNA plazmidowe wyizolowano z czystych hodowli szczepów bakteryjnych: *E. coli* BW25113 (pKD46), BT340 (pCP20) oraz BW25141(pKD4). Stężenie wyizolowanego DNA plazmidowego wynosiło: pKD46: 45,98 ng/ $\mu$ l ( $A_{260}/A_{280}=1,88$ ), pCP20: 70,51 ng/ $\mu$ l ( $A_{260}/A_{280}=1,82$ ), pKD4: 45,77 ng/ $\mu$ l ( $A_{260}/A_{280}=1,86$ ). Komórki elektrokompetentne *S. Enteritidis* PCM 2817 transformowano plazmidem pKD46. Potwierdzono obecność plazmidu pKD46 u 2 testowanych kolonii bakteryjnych (rycina 13). Wielkość produktu PCR po amplifikacji fragmentu kodującego kasetę termowrażliwości plazmidu pKD46 z wykorzystaniem starterów repA101tsFW i repA101tsRV wynosi 618 pz (kontrola pozytywna). **Do dalszych eksperymentów wybrano jednego transformanta, który w dalszej części pracy będzie oznaczony jako *S. Enteritidis* PCM 2817/pKD46.**



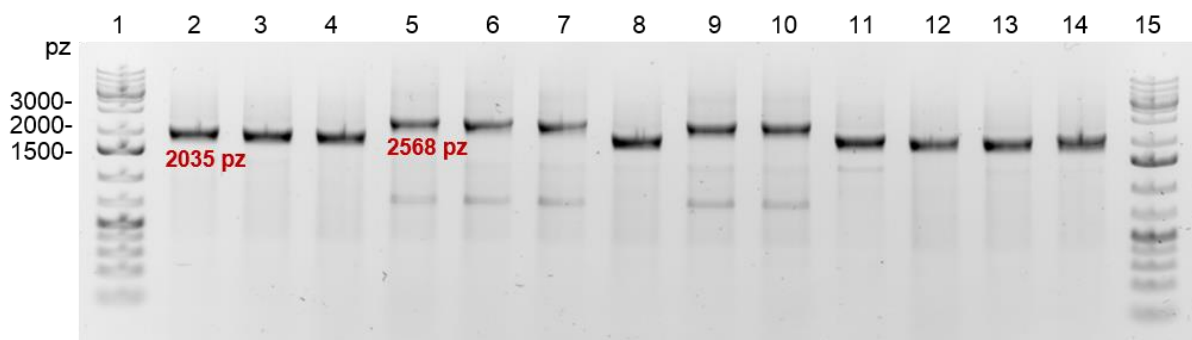
Rycina 13. Elektroforeza w żelu agarozowym potwierdzająca prawidłową transformację szczepu *S. Enteritidis* PCM 2817 plazmidem pKD46.

Rozdział zamplifikowanych produktów PCR utworzonych na matrycy plazmidu pKD4, którymi transformowano szczep *S. Enteritidis* PCM 2817/pKD46 przedstawiono na rycinie 14. Stężenie otrzymanych produktów PCR po oczyszczeniu wynosiło: 439,61 ng/μl ( $A_{260}/A_{280}=1,85$ ) dla genu *fepE*, 549,03 ng/μl ( $A_{260}/A_{280}=1,87$ ) dla genu *wzz* oraz 468,89 ng/μl ( $A_{260}/A_{280}=1,88$ ) dla genu *wzy*.



Rycina 14. Elektroforeza w żelu agarozowym zamplifikowanych produktów PCR przygotowanych do transformacji *S. Enteritidis* PCM 2817/pKD46.

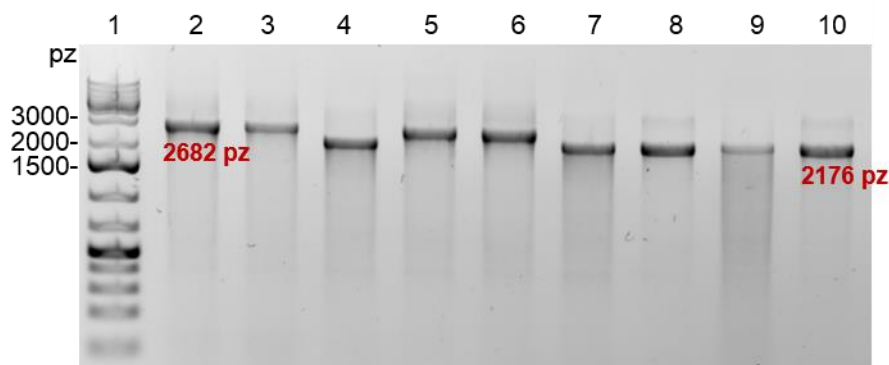
Komórki elektrokompetentne *S. Enteritidis* PCM 2817/pKD46 transformowano przygotowanymi produktami PCR dla genów *fepE*, *wzz* oraz *wzy*. Selekcję pozytywnych kolonii dla mutantu  $\Delta fepE::kan$  przedstawiono na rycinie 15. U 5 z 12 testowanych kolonii kasetka kanamycynowa wbudowała się w miejsce genu docelowego *fepE* (ścieżka 5-7, 9-10, rycina 15). Wielkość produktu PCR po amplifikacji dla genu *fepE* wynosi 2035 pz (kontrola negatywna). Mutant  $\Delta fepE::kan$  posiada kasetę oporności na kanamycynę w miejscu genu *fepE*. Wielkość produktu PCR dla mutantu  $\Delta fepE::kan$  wynosi 2568 pz. **Do dalszych eksperymentów wybrano jednego transformanta, który w dalszej części pracy będzie oznaczony jako *S. Enteritidis* PCM 2817  $\Delta fepE::kan$ .**



1,15 - marker masy  
 2 - *S. Enteritidis* PCM 2817 WT (kontrola)  
 3-14 - sprawdzane kolonie

Rycina 15. Selekcja pozytywnych klonów *S. Enteritidis* PCM 2817  $\Delta fepE::kan$ .

Selekcję pozytywnych kolonii dla mutantu  $\Delta wzz::kan$  przedstawiono na rycinie 16. U 4 z 8 testowanych kolonii kasetę kanamycynowa wbudowała się w miejsce genu docelowego *wzz* (ścieżka 2-3, 5-6, rycina 16). Wielkość produktu PCR po amplifikacji dla genu *wzz* wynosi 2176 pz (kontrola). Mutant  $\Delta wzz::kan$  posiada kasetę oporności na kanamycynę w miejscu genu *wzz*. Wielkość produktu PCR dla mutantu  $\Delta wzz::kan$  wynosi 2682 pz.. **Do dalszych eksperymentów wybrano jednego transformanta, który w dalszej części pracy będzie oznaczony jako *S. Enteritidis* PCM 2817  $\Delta wzz::kan$ .**



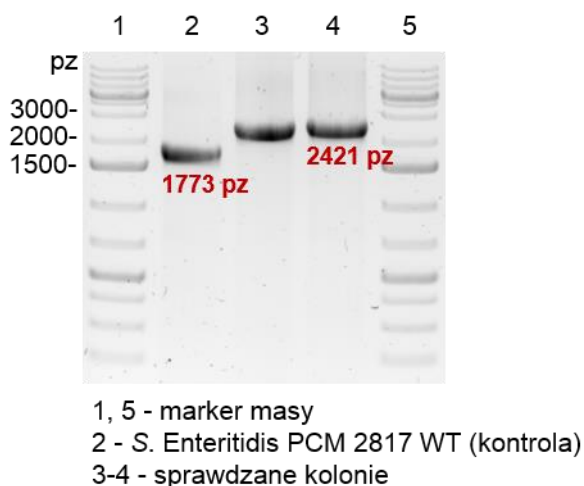
1 - marker masy  
 2-9 - sprawdzane kolonie  
 10 - *S. Enteritidis* PCM 2817 WT (kontrola)

Rycina 16. Selekcja pozytywnych klonów *S. Enteritidis* PCM 2817  $\Delta wzz::kan$ .

Selekcję pozytywnych kolonii dla mutantu  $\Delta wzy::kan$  przedstawiono na rycinie 17. U 2 testowanych kolonii kasetę kanamycynowa wbudowała się w miejsce genu docelowego *wzy* (ścieżka 3-4, rycina 17). Wielkość produktu PCR po amplifikacji dla genu *wzy* wynosi



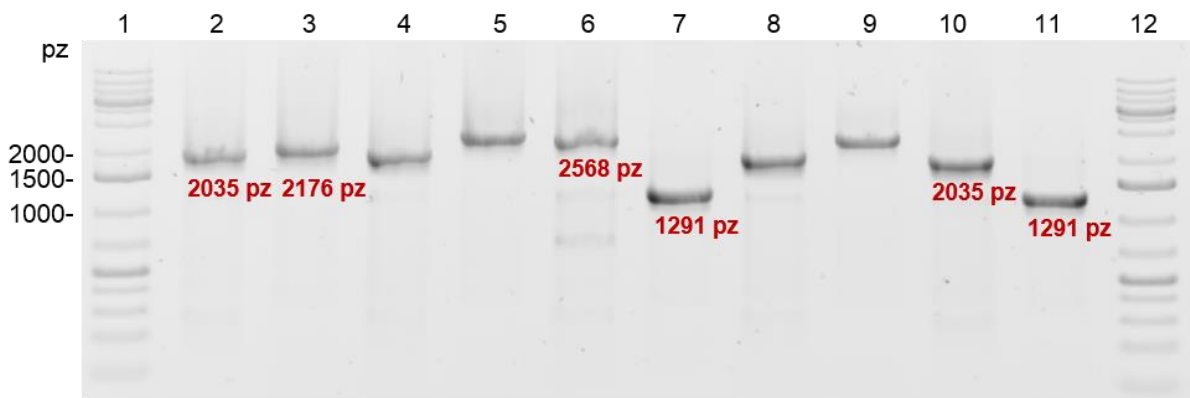
1773 pz (kontrola). Mutant  $\Delta wzy::kan$  posiada kasetę oporności na kanamycynę w miejscu genu *wzy*. Wielkość produktu PCR dla mutantu  $\Delta wzy::kan$  wynosi 2421 pz.. **Do dalszych eksperymentów wybrano jednego transformanta, który w dalszej części pracy będzie oznaczony jako *S. Enteritidis* PCM 2817  $\Delta wzy::kan$ .**



Rycina 17. Selekcja pozytywnych klonów *S. Enteritidis* PCM 2817  $\Delta wzy::kan$ .

W celu utworzenia mutantu *S. Enteritidis* PCM 2817  $\Delta fepE::kan \Delta wzz$  z wcześniej otrzymanego mutantu *S. Enteritidis* PCM 2817  $\Delta wzz::kan$  usunięto plazmid pKD46 oraz usunięto kasetę kanamycynową z wykorzystaniem rekombinacji FLP (plazmid pCP20, metoda 7.5.9) otrzymując szczep *S. Enteritidis* PCM 2817  $\Delta wzz::FRT (\Delta wzz)$ . Otrzymany szczep transformowano plazmidem pKD46 a później produktem PCR dla genu *fepE* (metoda 7.5.7). Selekcję pozytywnych kolonii dla mutantu  $\Delta fepE::kan \Delta wzz$  przedstawiono na rycinie 18. Wielkość produktu PCR po amplifikacji dla genu *fepE* wynosi 2035 pz, dla genu *wzz* wynosi 2176 pz (kontrola). Wielkość produktu PCR po amplifikacji dla genu *wzz* po zastosowaniu rekombinacji FLP i usunięciu kasety kanamycynowej wynosi 1291 pz (kontrola).

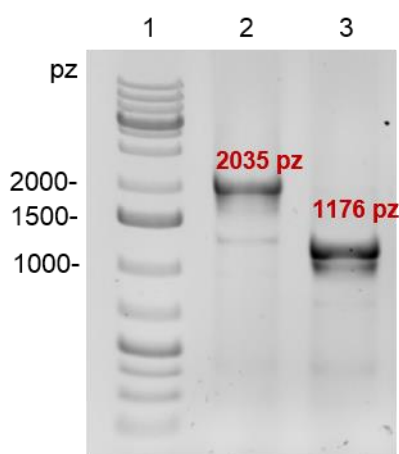
U 1 z 3 testowanych kolonii kasety kanamycynowej wbudowała się w miejsce genu *fepE* (ścieżka 6, rycina 18). Testowana kolonia charakteryzowała się brakiem kasety oporności na antybiotyki w miejscu genu *wzz* (ścieżka 7, rycina 18). **Do dalszych eksperymentów wybrano odpowiedniego transformanta, który w dalszej części pracy będzie oznaczony jako *S. Enteritidis* PCM 2817  $\Delta fepE::kan \Delta wzz$ .**



- 1, 12 - marker masy  
 2 - 3 - *S. Enteritidis* PCM 2817 WT (ścieżka 2 gen *fepE*, ścieżka 3 gen *wzz*; kontrola)  
 4-5 - sprawdzana kolonia nr 1 (ścieżka 4 gen *fepE*, ścieżka 5 gen *wzz*)  
 6-7 - sprawdzana kolonia nr 2 (ścieżka 6 gen *fepE*, ścieżka 7 gen *wzz*)  
 8-9 - sprawdzana kolonia nr 3 (ścieżka 8 gen *fepE*, ścieżka 9 gen *wzz*)  
 10-11 - *S. Enteritidis* PCM 2817  $\Delta wzz$  (kontrola pozytywna dla genu *wzz*)

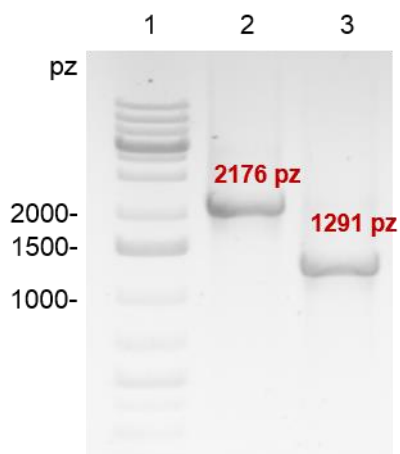
Rycina 18. Selekcja pozytywnych klonów *S. Enteritidis* PCM 2817  $\Delta fepE::kan \Delta wzz$ .

W kolejnym kroku otrzymane mutanty *S. Enteritidis* PCM 2817  $\Delta fepE::kan$ ,  $\Delta fepE::kan \Delta wzz$  oraz  $\Delta wzy::kan$  poddano rekombinacji FLP w celu usunięcia kasety oporności na antybiotyki. Wielkość produktu PCR po amplifikacji dla genu *fepE* po zastosowaniu rekombinacji FLP i usunięciu kasety kanamycynowej wynosi 1176 pz (rycina 19, rycina 21), dla genu *wzz* 1291 pz (rycina 20, rycina 21) oraz 1030 pz dla genu *wzy* (rycina 22).



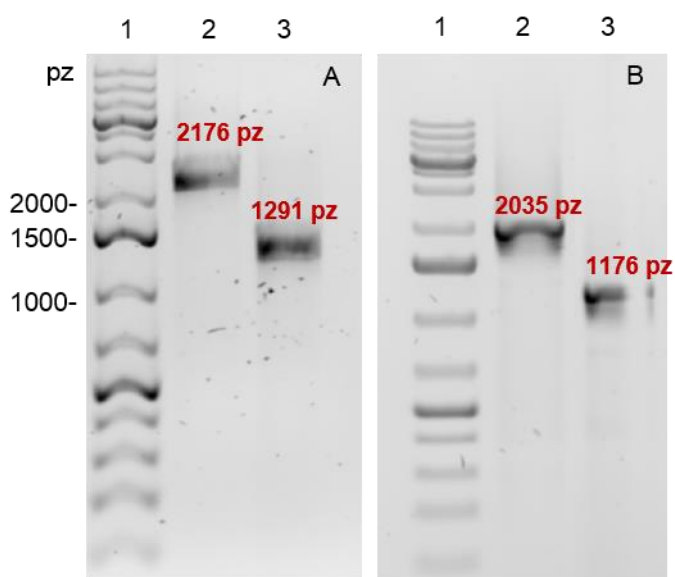
- 1 - marker masy  
 2 - *S. Enteritidis* PCM 2817 WT, gen *fepE*, kontrola  
 3 - *S. Enteritidis* PCM 2817  $\Delta fepE::FRT$

Rycina 19. Rozdział elektroforetyczny pozytywnych klonów *S. Enteritidis* PCM 2817  $\Delta fepE::FRT$ .



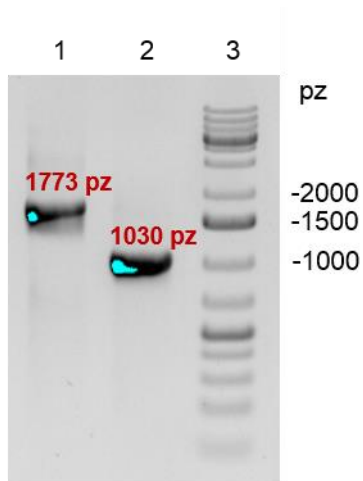
- 1 - marker masy
- 2 - *S. Enteritidis* PCM 2817 WT, gen *wzz*, kontrola
- 3 - *S. Enteritidis* PCM 2817  $\Delta wzz::FRT$

Rycina 20. Rozdział elektroforetyczny pozytywnych klonów *S. Enteritidis* PCM 2817  $\Delta wzz::FRT$ .



- A:
  - 1 - marker masy
  - 2 - *S. Enteritidis* PCM 2817 WT, gen *wzz*, kontrola
  - 3 - *S. Enteritidis* PCM 2817  $\Delta fepE::FRT \Delta wzz::FRT$ , gen *wzz*
- B:
  - 1 - marker masy
  - 2 - *S. Enteritidis* PCM 2817 WT, gen *fepE*, kontrola
  - 3 - *S. Enteritidis* PCM 2817  $\Delta fepE::FRT \Delta wzz::FRT$ , gen *fepE*

Rycina 21. Rozdział elektroforetyczny pozytywnych klonów *S. Enteritidis* PCM 2817  $\Delta fepE::FRT \Delta wzz::FRT$ .



- 1 - marker masy  
 2 - *S. Enteritidis* PCM 2817 WT, gen wzy, kontrola  
 3 - *S. Enteritidis* PCM 2817  $\Delta wzy::FRT$

Rycina 22. Rozdział elektroforetyczny pozytywnych klonów *S. Enteritidis* PCM 2817  $wzy::FRT$ .

W wyniku sekwencjonowania genomów uzyskanych mutantów bakteryjnych potwierdzono poprawność zajścia mutacji. Analiza bioinformatyczna nie wykazała dodatkowych zmian w genomie bakteryjnym.

**Do dalszych eksperymentów wykorzystano mutanty bez kasety oporności na antybiotyki oznaczone jako:**

***S. Enteritidis* PCM 2817  $\Delta fepE::FRT$  ( $\Delta fepE$ )**

***S. Enteritidis* PCM 2817  $\Delta wzz::FRT$  ( $\Delta wzz$ )**

***S. Enteritidis* PCM 2817  $\Delta fepE::FRT \Delta wzz::FRT$  ( $\Delta fepE \Delta wzz$ )**

***S. Enteritidis* PCM 2817  $\Delta wzy::FRT$  ( $\Delta wzy$ ).**

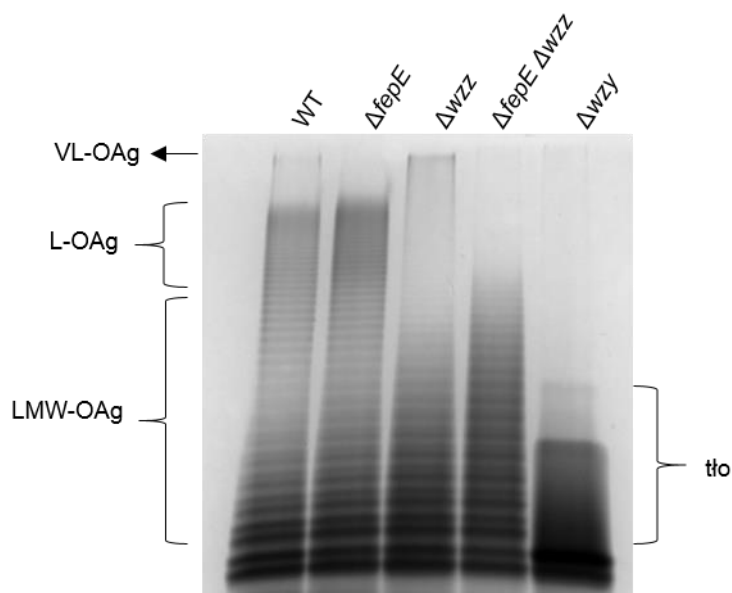
### 8.3 Pomiar średniej długości lipopolisacharydu badanych mutantów *S. Enteritidis*

#### 8.3.1 Analiza składu cukrowego

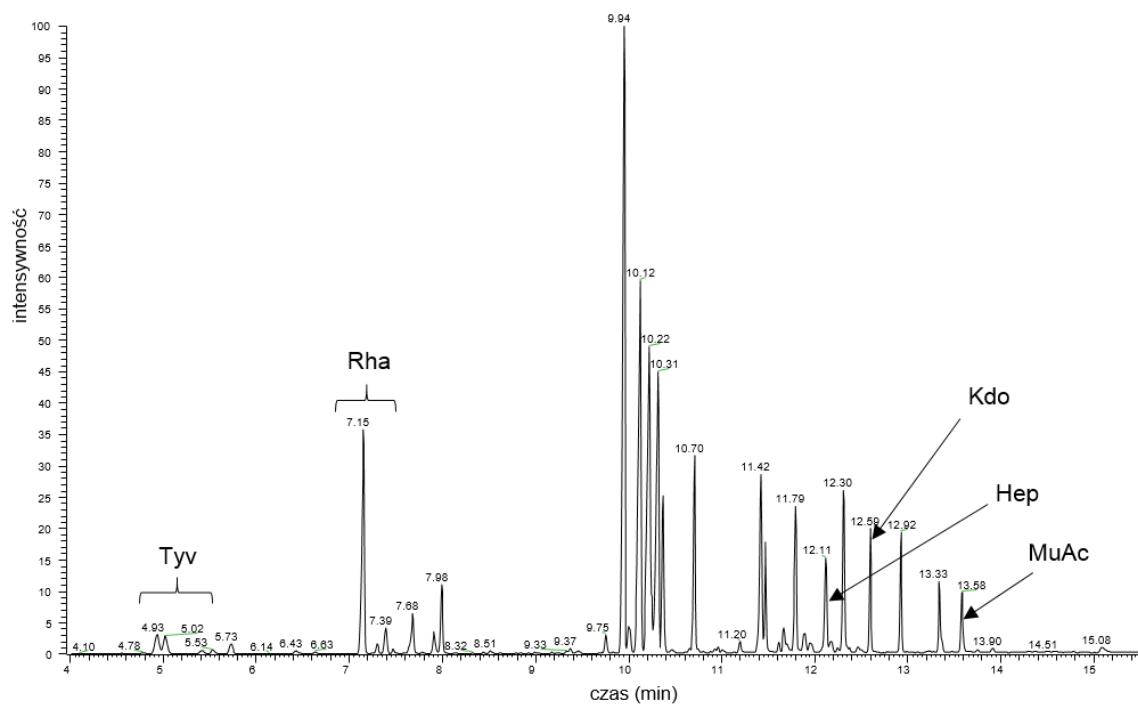
Skład cukrowy cząsteczki LPS potwierdzono w oparciu o analizę cukrową z wykorzystaniem techniki GLC-MS zgodnie z metodą 7.6.2. Porównano czasy retencji (ang. retention time, RT) i widma masowe otrzymanych lotnych pochodnych składników cukrowych z odpowiednimi standardami. Na podstawie analizy czasów retencji i widm zidentyfikowano w próbce obecność cukrów, które wytypowano jako markery chemiczne do opracowania metody pomiaru średniej długości części O-swoistej LPS: Rha (RT: 9,44) oraz Tyv (RT: 8,21). Dodatkowo w próbce zidentyfikowano marker chemiczny części rdzeniowej LPS: Hep (RT: 13.56).

#### 8.3.2 Analiza średniej długości lipopolisacharydu

Analizę średniej długości części O-swoistej LPS przeprowadzono na całych komórkach bakteryjnych oraz na izolowanych z poszczególnych mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817 preparatach LPS (rycina 23). Wyniki z poszczególnych analiz zostały wyrażone w %, przyjmując wartość 100% dla szczepu  $\Delta wzy$ . Na rycinie 24 przedstawiono przykładowy chromatogram z rozdziału pochodnych dla całych komórek bakteryjnych.

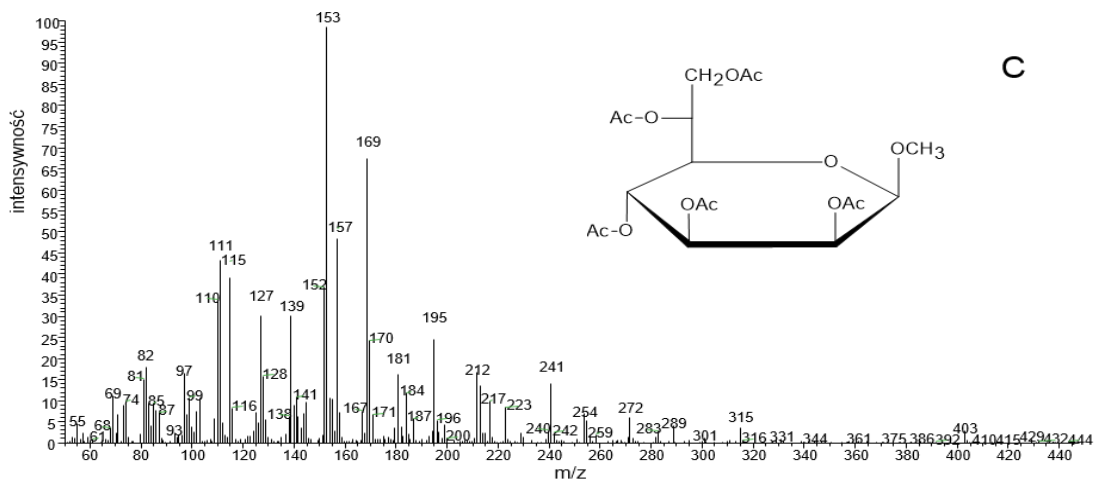
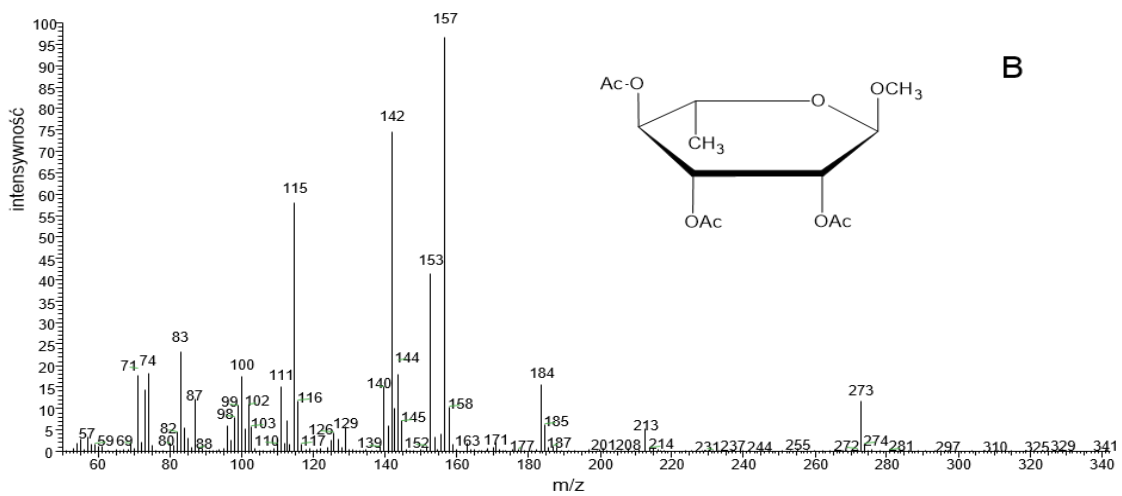
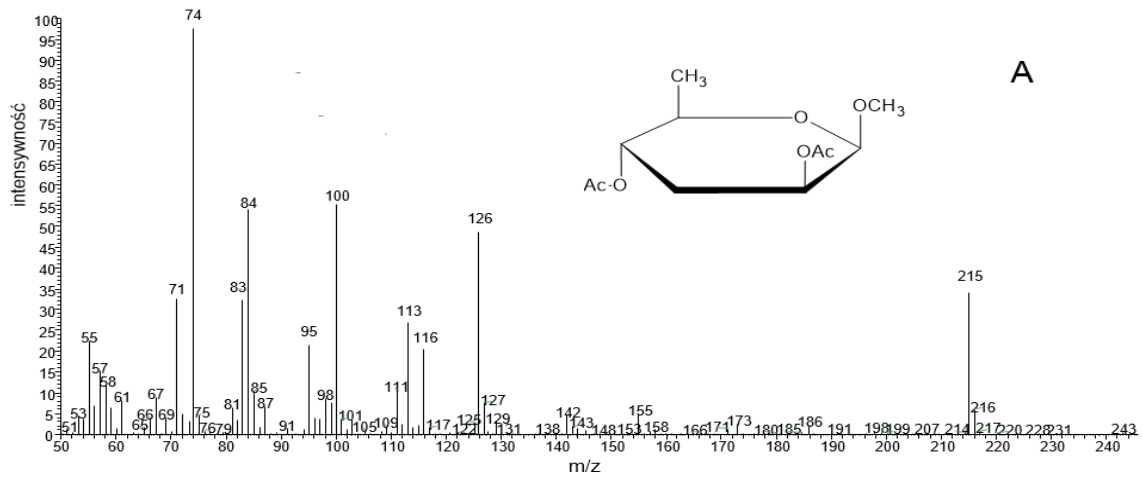


Rycina 23. Rozdział SDS-PAGE cząsteczek LPS badanych mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817.

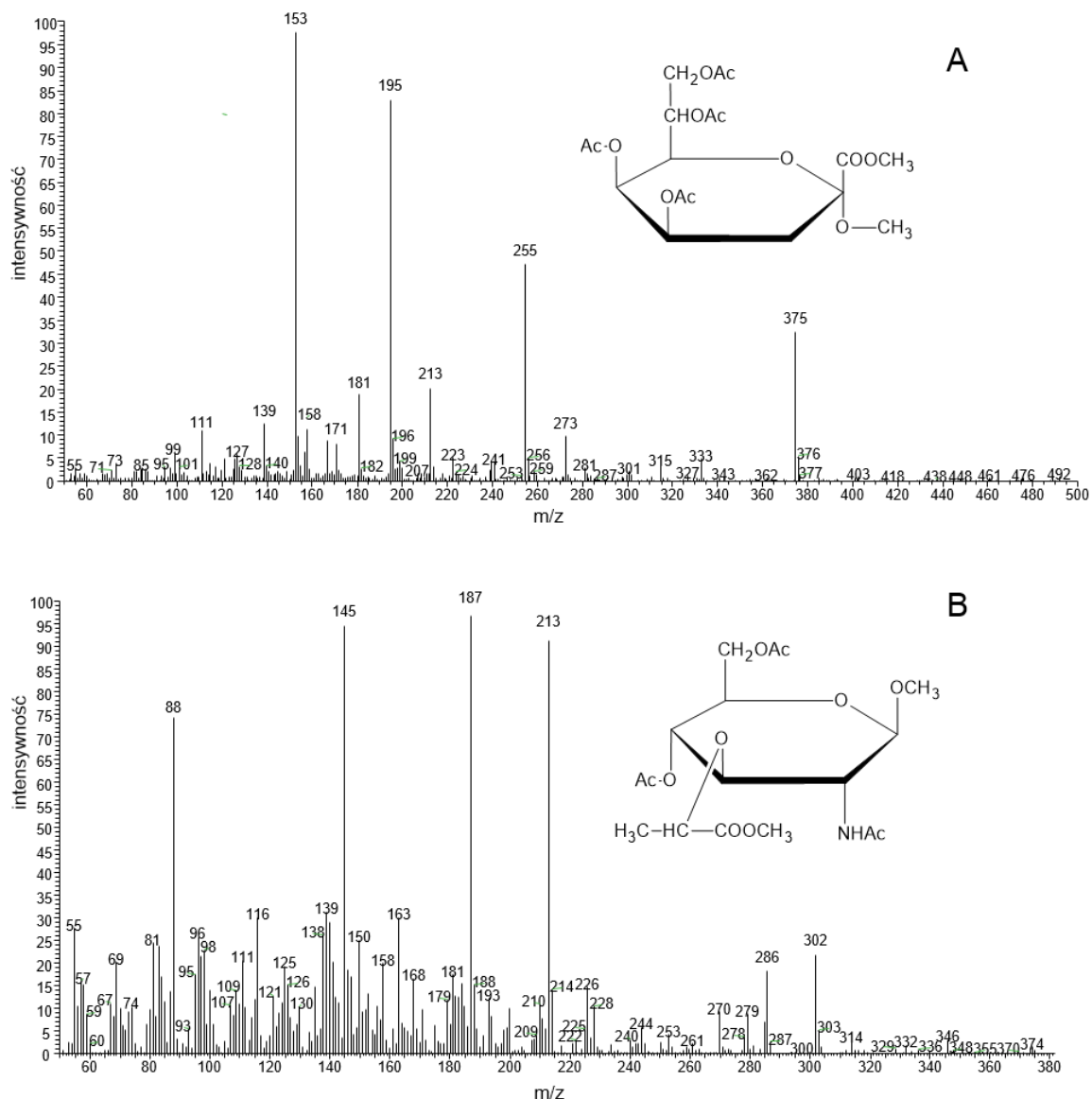


Rycina 24. Przykładowy chromatogram z rozdziału pochodnych cukrowych dla całych komórek bakteryjnych *S. Enteritidis* PCM 2817.

Na rycinie 25 przedstawiono strukturę pochodnych oraz widma masowe utworzonych w wyniku zastosowanej procedury acetylowanych metyloglikozydów tywelozy (A), ramnozy (B) oraz heptozy (C). Acetylowany ester metylowy kwasu muraminowego oraz Kdo i ich widma masowe przedstawiono na rycinie 26.



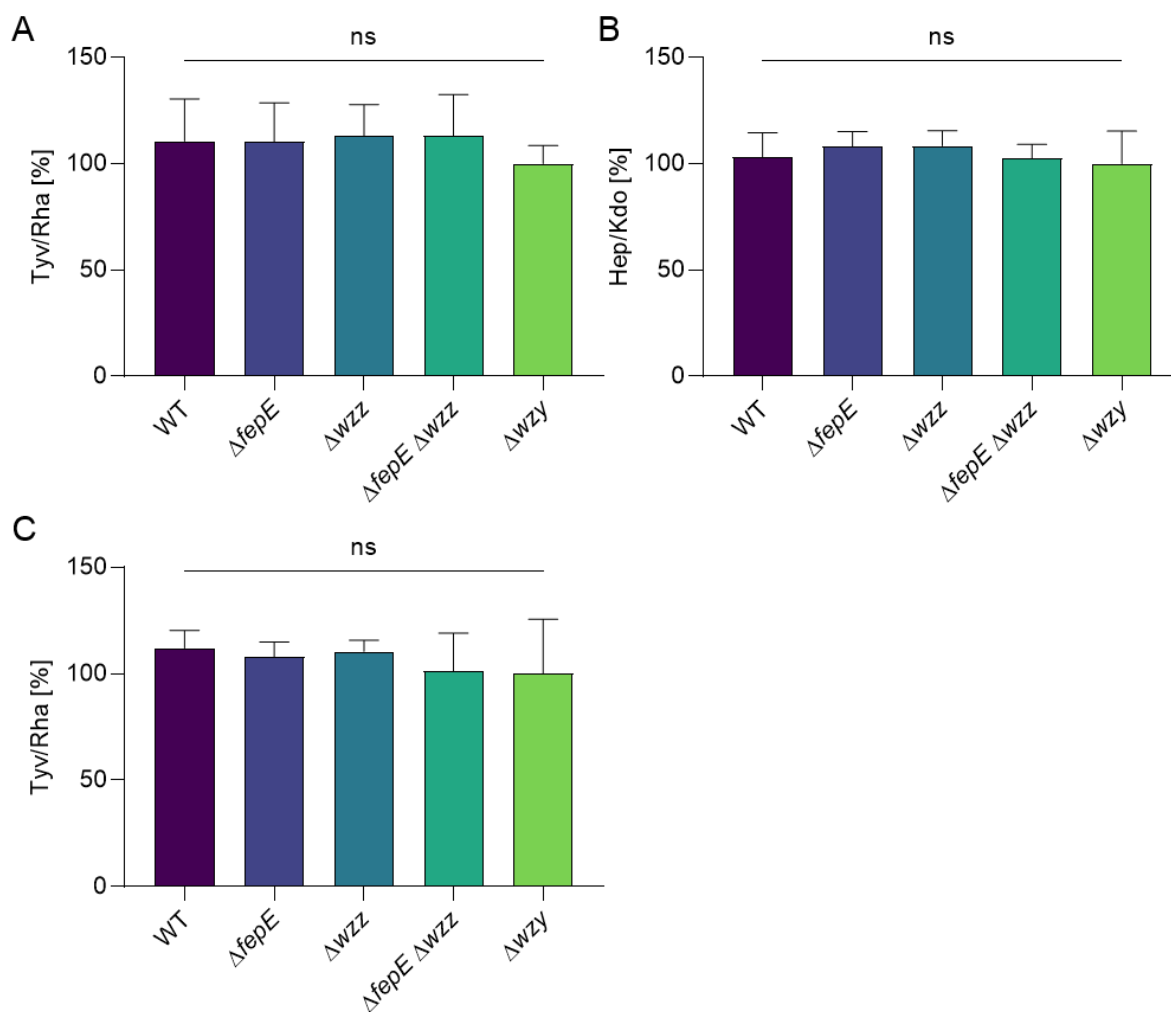
Rycina 25. Widma masowe i struktura acetylowanych metyloglikozydów Tyv (A), Rha (B) i Hep (C).



Rycina 26. Widma masowe i struktura pochodnych Kdo (A) i MuAc (B).

Analiza proporcji zawartości tywelozy i ramnozy w masie bakteryjnej (rycina 27, A) i w izolowanych preparatach LPS (rycina 28, C) oraz proporcja zawartości heptozy i Kdo (Rycina 27, B) w masie bakteryjnej wykazała, że nie ma istotnych różnic w uzyskiwanych proporcjach pomiędzy składnikami O-antygeny oraz pomiędzy składnikami rdzenia (u bakterii) dla poszczególnych mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817. Poziom Tyv/Rha dla masy bakteryjnej wahał się od 111 do 113%, natomiast poziom Tyv/Rha dla LPS wahał się od 101 do 112% (rycina 27, A i C). Poziom Hep/Kdo dla badanych szczepów wahał się od 103 do 108% (rycina 27, B). Uzyskany wynik potwierdził założenie, że zawartość wybranych markerów chemicznych części O-swoistej oraz części rdzeniowej LPS powinien być stały i można wykorzystać powyższe markery do analizy średniej długości LPS w badanych szczepach.

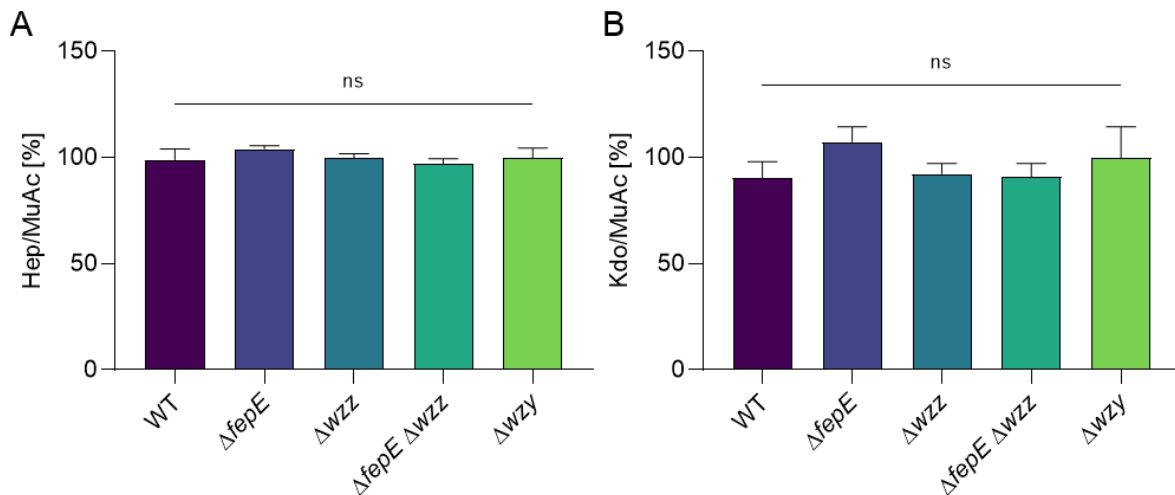




Rycina 27. Porównanie proporcji monosacharydów Tyv, Rha, Hep, Kdo w całych komórkach bakteryjnych oraz izolowanych preparatach LPS mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817.

Wyniki zostały przedstawione jako stosunek: Tyv/Rha (A), Hep/Kdo (B) dla całych komórek bakteryjnych oraz Tyv/Rha (C) dla izolowanych typów LPS, wyrażony w procentach, przyjmując wartość 100% dla szczepu  $\Delta wzy$ . Zebrane wyniki analizowano testem ANOVA ( $p < 0,05$ ).

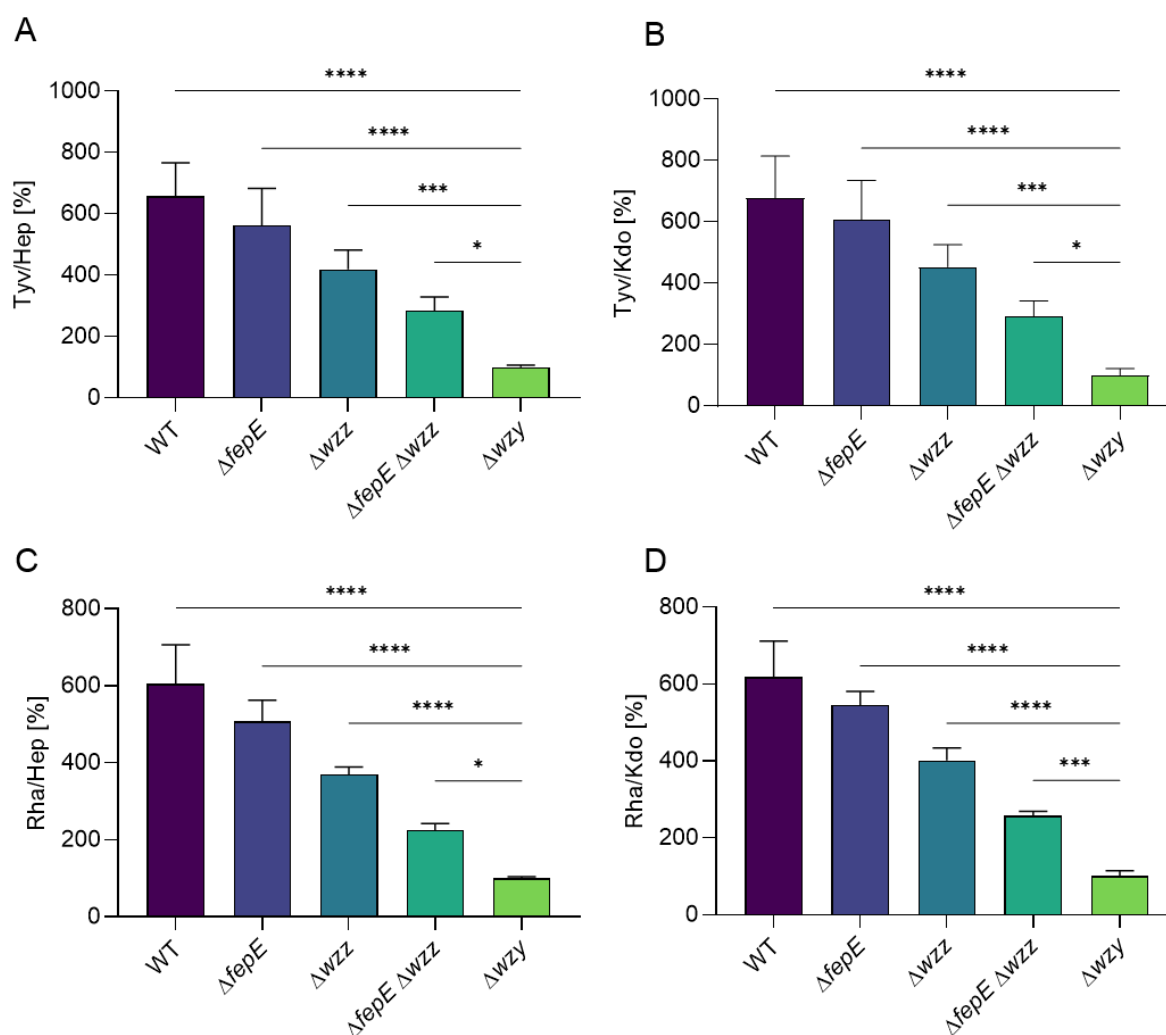
Porównanie proporcji uzyskanych poziomów Hep i Kdo w porównaniu do MuAc, występującego w ścianie komórkowej bakterii również nie wykazała istotnych różnic pomiędzy badanymi mutantami *S. Enteritidis* PCM 2817 (rycina 28). Poziom Hep/MuAc wahał się od 97 do 104%, natomiast poziom Kdo/MuAc od 90 do 107%. **Uzyskane wyniki wskazują na podobną liczbę cząsteczek LPS w poszczególnych komórkach bakteryjnych.**



Rycina 28. Porównanie proporcji monosacharydów Hep, MuAc oraz Kdo w całych komórkach bakteryjnych mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817. Wyniki zostały przedstawione jako stosunek Hep/MuAc (A) oraz Kdo/MuAc (B) wyrażony w procentach, przyjmując wartość 100% dla szczepu  $\Delta wzy$ . Zebrane wyniki analizowano testem ANOVA ( $p < 0,05$ ).

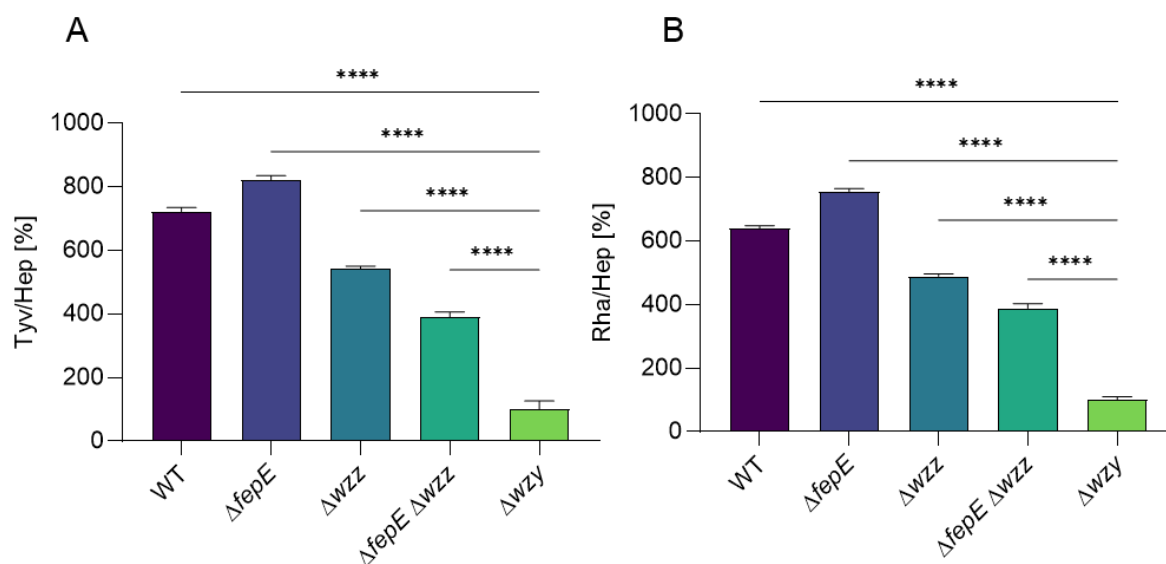
W kolejnym kroku przeprowadzono ilościową ocenę średnich długości cząsteczek LPS na całych komórkach bakteryjnych. Dzięki analizie poziomu tywelozy lub ramnozy i jego porównanie do ilości heptozy lub Kdo określono średnią długość części O-swoistej LPS badanych mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817. Zarówno analiza poziomu tywelozy do heptozy jak i tywelozy do Kdo wykazała, że szczep dziki charakteryzował się największą zawartością części O-swoistej LPS, osiągając wartość Tyv/Hep 657% oraz Tyv/Kdo 678% (rycina 29; A, B). Szczep  $\Delta fepE$  wykazywał wartość Tyv/Hep na poziomie 562% oraz wartością Tyv/Kdo na poziomie 606%. Z kolei szczep z wyłączonym genem *wzz*, charakteryzował się wartością Tyv/Hep 418% oraz Tyv/Kdo 453%. Wyłączenie genów *wzz* oraz *fepE* przyczyniło się do dalszego zmniejszenia ilości części O-swoistej LPS (Tyv/Hep 285%, Tyv/Kdo 292%) (rycina 29, A, B). Analiza drugiego markera chemicznego części O-swoistej LPS w stosunku do heptozy i Kdo wykazała podobne tendencje dla testowanych szczepów bakteryjnych. Szczep dziki *S. Enteritidis* PCM 2817 charakteryzował się największą zawartością części O-swoistej

LPS, wykazując wartości Tyv/Hep 606% oraz Tyv/Kdo 619% (rycina 29, C, D). Średnia wartość Tyv/Hep wynosiła odpowiednio: 508% dla szczepu  $\Delta\text{fepE}$ , 370% dla szczepu  $\Delta\text{wzz}$  oraz 225% dla szczepu  $\Delta\text{fepE } \Delta\text{wzz}$ . Średnia wartość Tyv/Kdo wynosiła odpowiednio: 546% dla szczepu  $\Delta\text{fepE}$ , 401% dla szczepu  $\Delta\text{wzz}$  oraz 258% dla szczepu  $\Delta\text{fepE } \Delta\text{wzz}$  (rycina 29, C, D).



Rycina 29. Analiza GLC-MS zawartości Tyv, Rha, Hep i Kdo w całych komórkach bakteryjnych mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817. Wyniki zostały przedstawione jako stosunek: Tyv/Hep (A), Tyv/Kdo (B), Rha/Hep (C) oraz Rha/Kdo (D) wyrażony w procentach, przyjmując wartość 100% dla szczepu  $\Delta\text{wzy}$ . Zebrane wyniki analizowano testem ANOVA oraz testem post hoc Dunnetta ( $p < 0,05$ ) przyjmując jako grupę kontrolną  $\Delta\text{wzy}$ .

W związku z otrzymaniem porównywalnych wyników podczas analizy masy bakteryjnej dla dwóch markerów chemicznych części rdzeniowej LPS (Hep, Kdo) do analizy izolowanych cząsteczek LPS wykorzystano Hep jako marker części rdzeniowej oraz Tyv i Rha jako marker części O-swoistej LPS. Analiza markerów chemicznych części O-swoistej LPS w stosunku do heptozy wykazała podobne wyniki zarówno dla tywelozy jak i ramnozy (rycina 30; A, B). Uzyskane wyniki różniły się jednak w porównaniu do wyników otrzymanych z pomiarów Tyv/Hep i Rha/Hep masy bakteryjnej. Pomiar izolowanych frakcji LPS wykazały, że najwyższą wartością Tyv/Hep i Rha/Hep charakteryzował się szczep  $\Delta fepE$  a nie jak w przypadku masy bakteryjnej szczep dziki. Wartość Tyv/Hep wynosiła 726% dla szczepu dzikiego, 821% dla szczepu  $\Delta fepE$ , 543% dla szczepu  $\Delta wzz$  oraz 389% dla szczepu  $\Delta fepE \Delta wzz$ . Porównywalne wyniki zaobserwowano przy analizie proporcji Rha/Hep: 640% dla szczepu dzikiego, 755% dla szczepu  $\Delta fepE$ , 489% dla szczepu  $\Delta wzz$  oraz 388% dla szczepu  $\Delta fepE \Delta wzz$  (rycina 30; A,B).

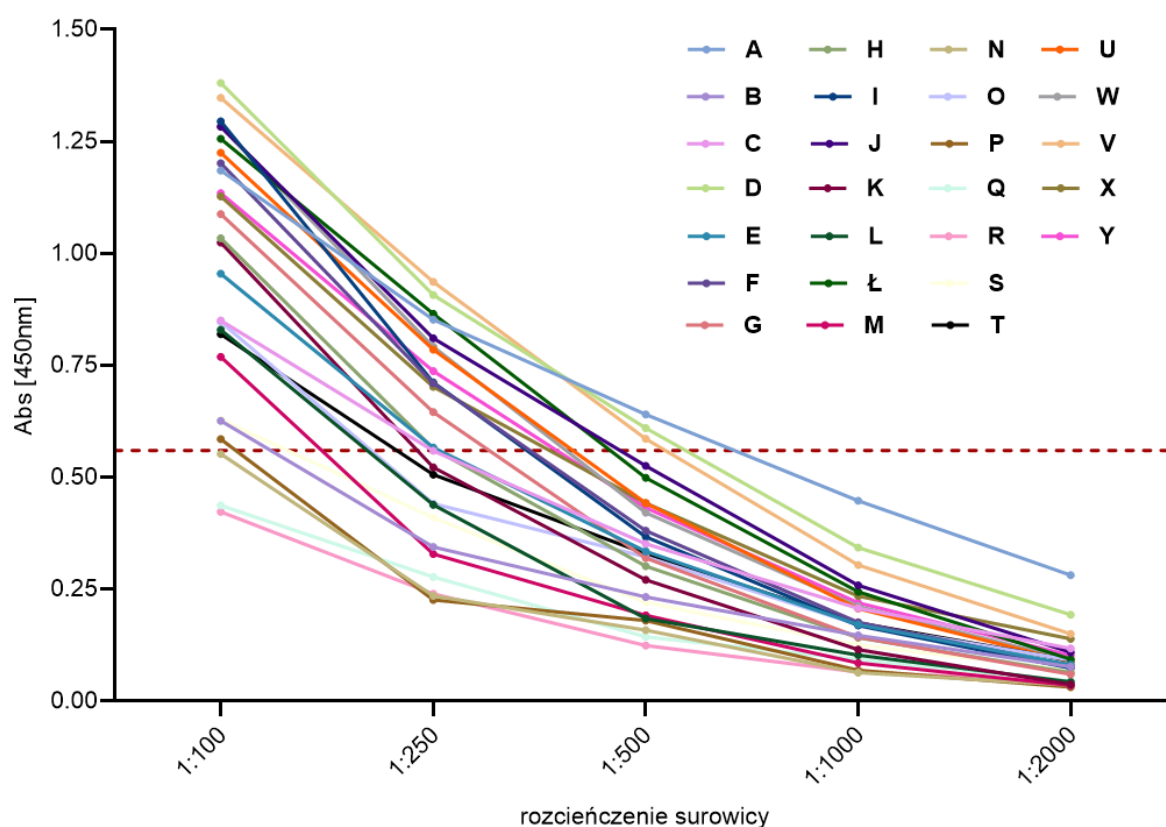


Rycina 30. Analiza GLC-MS zawartości Tyv, Rha i Hep w LPS badanych mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817. Wyniki zostały przedstawione jako stosunek: Tyv/Hep (A) oraz Rha/Hep (B) wyrażony w procentach, przyjmując wartość 100% dla szczepu  $\Delta wzy$ . Zebrane wyniki analizowano testem ANOVA oraz testem post hoc Dunnetta ( $p < 0,05$ ), przyjmując jako grupę kontrolną  $\Delta wzy$ .

**Podsumowując, opracowana metoda pozwala na ilościową ocenę średniej długości części O-swoistej LPS w badanych mutantach *S. Enteritidis* PCM 2817. Wyniki uzyskane z pomiaru markerów chemicznych z masy bakteryjnej różnią się dla szczepu dzikiego oraz szczepu  $\Delta fepE$  w porównaniu do wyników uzyskanych z pomiaru izolowanych typów LPS.**

#### 8.4 Określenie poziomu przeciwciał anti-*Salmonella* w próbkach surowicy

W celu stworzenia puli surowicy do dalszych badań, w otrzymanych z RCKiK indywidualnych próbkach surowicy określono poziom przeciwciał anti-*Salmonella* klasy IgG testem ELISA. Z RCKiK otrzymano 130 indywidualnych próbek NSL. W celu zminimalizowania liczby próbek do przebadania, próbki NSL zostały pogrupowane po 5 sztuk, tworząc 26 grup oznaczonych literami od A do Y. Poziom przeciwciał anti-*Salmonella* IgG w badanych grupach przedstawiono na rycinie 31. Wartość „odcięcia” obliczona ze wzoru: logarytm ze średniej +  $2 \times$  wartość odchylenia standardowego wynosiła 0,56. Z surowic, które przy rozcieńczeniu 1:250 wykazywały wartości poniżej 0,56 (B, E, H, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T) utworzono pulę surowic do dalszych badań.



Rycina 31. Poziom przeciwciał anti *S. Enteritidis* PCM 2817 w próbkach surowicy.

Na wykresie przerywaną linią zaznaczono wartość „odcięcia” powyżej, której odrzucano próbki surowicy.

## 8.5 Ocena modelowej patogenności *in vitro* – wpływ długości lipopolisacharydu na interakcje z układem dopełniacza

### 8.5.1 Określenie poziomu przeżywalności badanych szczepów w surowicy ludzkiej

Określono poziom przeżywalności badanych mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817 w surowicy ludzkiej. W badaniach wstępnych ustalono, że najbardziej różnicującym pod względem poziomu wrażliwości dla badanych szczepów *Salmonella* jest działanie surowicy ludzkiej w stężeniu 50%. W celu określenia poziomu przeżywalności badane szczepy bakteryjne inkubowano przez 120 minut z 50% NSL, NSL/KL, NSL/A oraz ITS (tabela 12) zgodnie z metodą 7.7.1. Posiewy wykonywano w czterech punktach czasowych: bezpośrednio po zmieszaniu, czas 0 minut ( $T_0$ ), po 30 minutach inkubacji ( $T_{30}$ ), po 60 minutach inkubacji ( $T_{60}$ ) oraz po 120 minutach inkubacji ( $T_{120}$ ). Punktem odniesienia przy szacowaniu spadku liczby żywych komórek w mieszaninie była liczba komórek bakteryjnych wyrosłych na płytkach wysianych bezpośrednio po zmieszaniu bakterii z surowicą (100% przeżywalności). W celu określenia poziomu oporności na działanie surowicy ludzkiej w pracy przyjęto następującą skalę oceny przeżywalności badanych mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817 w czasie  $T_{120}$  inkubacji (tabela 13).

Tabela 12. Charakterystyka używanych typów surowicy.

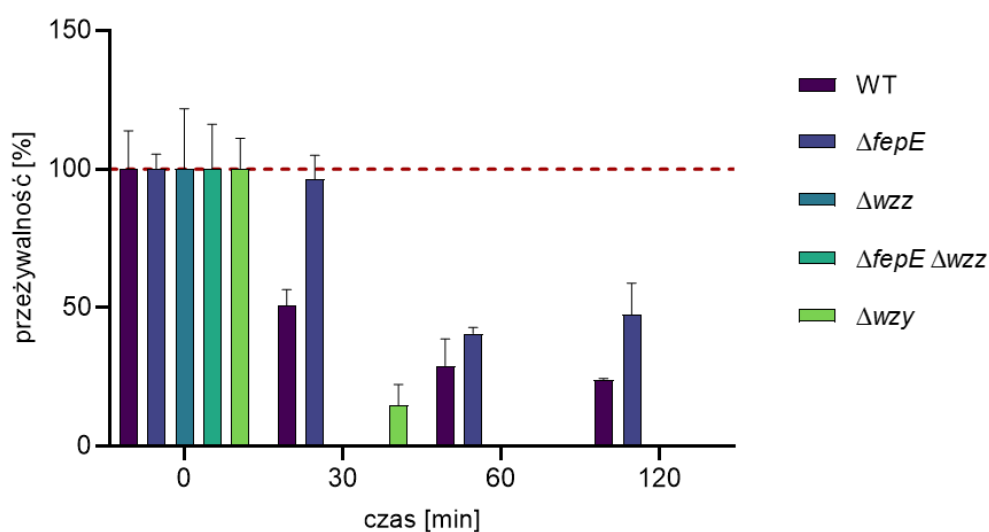
Nazwa surowicy	Aktywność ścieżek układu dopełniacza*		
	Klasyczna	Alternatywna	Lektynowa
NSL	+	+	+
NSL/KL	+	-	+
NSL/A	-	+	-
ITS	-	-	-

\* znakiem „+” oznaczono ścieżkę aktywną w danym rodzaju surowicy

Tabela 13. Skala oceny przeżywalności badanych mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817 w 50% surowicy.

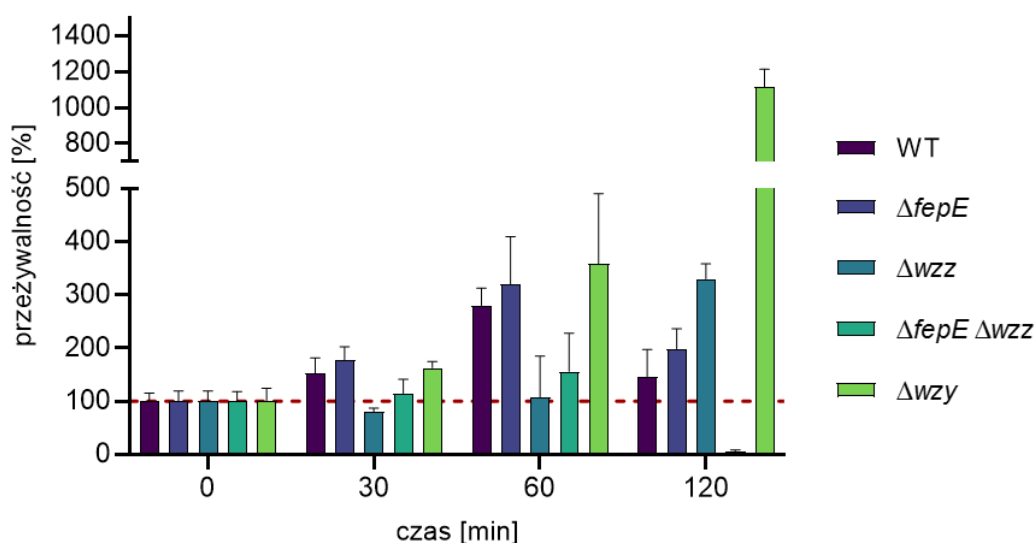
Przeżywalność w 50% surowicy w czasie				Poziom oporności na 50% surowicę
T <sub>0</sub>		T <sub>120</sub>		
Procentowa [%]	CFU/ml	Procentowa [%]	CFU/ml	
		>100	>10 <sup>7</sup>	oporny
100	~10 <sup>7</sup>	30-100	~10 <sup>6</sup>	średnio-oporny
		<30	<10 <sup>6</sup>	wrażliwy

Badane mutanty *S. Enteritidis* PCM 2817 wykazały zróżnicowany poziom wrażliwości na bakteriobójcze działanie 50% NSL po 120 minutach inkubacji (tabela 14, rycina 32). Stosując się do wcześniej ustalonej skali oceny przeżywalności badanych szczepów w surowicy, mutant *ΔfepE* określono jako średnio-oporny na działanie 50% NSL. Mutant *ΔfepE* charakteryzował się najwyższym poziomem przeżywalności w surowicy po 120 minutach (47%). *S. Enteritidis* PCM 2817 *Δwzz*, *ΔfepE Δwzz* oraz *Δwzy* sklasyfikowano jako mutanty wrażliwe na działanie 50% NSL. Po 30 minutach inkubacji z surowicą przeżywalność szczepów wrażliwych spadła do 51% dla szczepu dzikiego, do 0,01% dla mutantów *Δwzz* i *ΔfepE Δwzz*, oraz do 15% dla mutantu *Δwzy*. Przeżywalność mutantu *ΔfepE* po 30 minutach inkubacji z 50% NSL wynosiła 96%. W czasie T<sub>60</sub> przeżywalność szczepów spadła dla szczepu dzikiego do 29%, dla mutantu *ΔfepE* do 41% oraz dla mutantu *Δwzy* poniżej 1%.



Rycina 32. Przeżywalność badanych mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817 w 50% NSL. Na wykresach pokazano średnią z odchyleniem standardowym próbek.

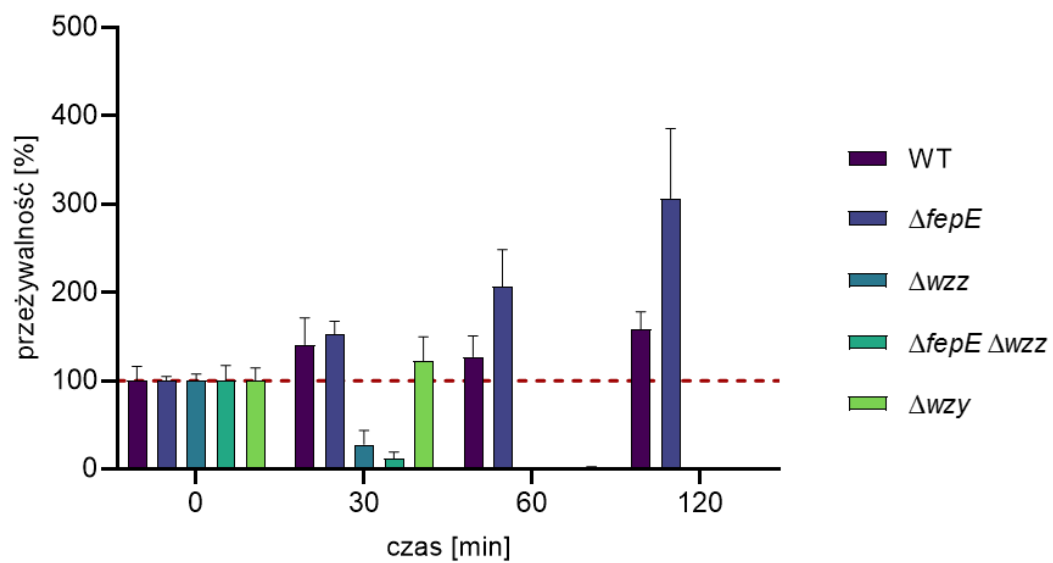
Drugim testowanym typem surowicy była surowica z aktywną drogą klasyczną i lektynową układu dopełniacza (tabela 12). Wszystkie testowane szczepy charakteryzowały się wzrostem przeżywalności w 50% NSL/KL po 30 oraz 60 minutach inkubacji (tabela 15, rycina 33). Przeżywalność w czasie  $T_{60}$  wzrosła dla szczepu dzikiego do 280%, dla  $\Delta fepE$  do 320%, dla  $\Delta wzz$  do 108%, dla  $\Delta fepE \Delta wzz$  do 156% oraz dla szczepu  $\Delta wzy$  do 359%. W czasie  $T_{120}$  zaobserwowano spadek przeżywalności dla szczepów: WT (spadek do 147%),  $\Delta fepE$  (spadek do 199%), bardzo wyraźny dla  $\Delta fepE \Delta wzz$  (spadek do 5%) oraz wzrost przeżywalności dla mutantów:  $\Delta wzz$  (wzrost do 294%) oraz  $\Delta wzy$  (wzrost do 1114%).



Rycina 33. Przeżywalność badanych mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817 w 50% NSL/KL. Na wykresach pokazano średnią z odchyleniem standardowym próbki.

W surowicy z aktywną drogą alternatywną układu dopełniacza tylko 2 spośród 5 testowanych szczepów namnażały się po 120 minutach inkubacji (tabela 16, rycina 34). Przeżywalność dla szczepu dzikiego w czasie  $T_{120}$  wynosiła 158% natomiast dla szczepu  $\Delta fepE$  306%. Po 30 minutach inkubacji z 50% NSL/A przeżywalność dla badanych szczepów wynosiła: 141% dla szczepu WT, 153% dla  $\Delta fepE$ , 28% dla  $\Delta wzz$ , 12% dla  $\Delta fepE \Delta wzz$  oraz 122% dla  $\Delta wzy$ . W czasie  $T_{60}$  inkubacji przeżywalność dla mutantów:  $\Delta wzz$ ,  $\Delta fepE \Delta wzz$  oraz  $\Delta wzy$  spadła poniżej 5%, wzrosła do 207% dla szczepu  $\Delta fepE$  oraz spadła do 127% dla szczepu dzikiego.





Rycina 34. Przeżywalność badanych mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817 w 50% NSL/A. Na wykresach pokazano średnią z odchyleniem standardowym próbki.

Tabela 14. Przeżywalność badanych mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817 w czasie 120 minut inkubacji w 50% NSL.

Bakteriobójcza aktywność 50% NSL									
<i>S. Enteritidis</i> PCM 2817	CFU/ml				Przeżywalność komórek [%]				Poziom wrażliwości
	T <sub>0</sub>	T <sub>30</sub>	T <sub>60</sub>	T <sub>120</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>30</sub>	T <sub>60</sub>	T <sub>120</sub>	
WT	$1,29 \times 10^7$ $\pm 1,80 \times 10^6$	$6,55 \times 10^6$ $\pm 7,47 \times 10^5$	$3,76 \times 10^6$ $\pm 1,25 \times 10^5$	$3,11 \times 10^6$ $\pm 5,92 \times 10^4$	100 $\pm 14$	51 $\pm 6$	29 $\pm 10$	24 $\pm 1$	średnio-oporny
$\Delta$ <i>fepE</i>	$1,60 \times 10^7$ $\pm 8,61 \times 10^5$	$1,54 \times 10^7$ $\pm 1,39 \times 10^6$	$6,5 \times 10^6$ $\pm 3,61 \times 10^5$	$7,58 \times 10^6$ $\pm 1,83 \times 10^6$	100 $\pm 5$	96 $\pm 9$	41 $\pm 2$	47 $\pm 11$	średnio-oporny
$\Delta$ <i>wzz</i>	$1,47 \times 10^7$ $\pm 3,21 \times 10^6$	$1,26 \times 10^3$ $\pm 3,60 \times 10^2$	$3,0 \times 10^1$ $\pm 1,00 \times 10^1$	0	100 $\pm 22$	< 1	< 1	0	wrażliwy
$\Delta$ <i>fepE</i> $\Delta$ <i>wzz</i>	$1,80 \times 10^7$ $\pm 2,93 \times 10^6$	$2,26 \times 10^3$ $\pm 5,00 \times 10^2$	$1,33 \times 10^1$ $\pm 1,53 \times 10^1$	0	100 $\pm 16$	< 1	< 1	0	wrażliwy
$\Delta$ <i>wzy</i>	$1,38 \times 10^7$ $\pm 1,54 \times 10^6$	$2,05 \times 10^6$ $\pm 1,05 \times 10^6$	$8,84 \times 10^3$ $\pm 2,80 \times 10^3$	$2,17 \times 10^1$ $\pm 8,49$	100 $\pm 11$	15 $\pm 8$	< 1	< 1	wrażliwy

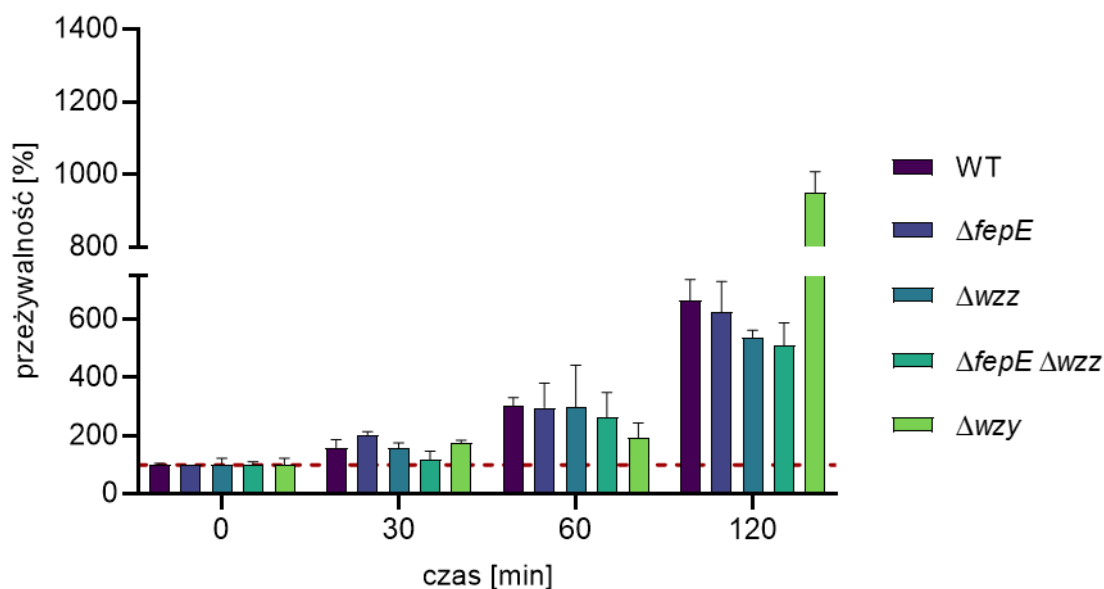
Tabela 15. Przeżywalność badanych mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817 w czasie 120 minut inkubacji w 50% NSL/KL.

Bakteriobójcza aktywność 50% NSL/KL									
<i>S. Enteritidis</i> PCM 2817	CFU/ml				Przeżywalność komórek [%]				Poziom wrażliwości
	T <sub>0</sub>	T <sub>30</sub>	T <sub>60</sub>	T <sub>120</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>30</sub>	T <sub>60</sub>	T <sub>120</sub>	
WT	$1,37 \times 10^7$ $\pm 2,17 \times 10^6$	$2,09 \times 10^7$ $\pm 3,98 \times 10^6$	$3,84 \times 10^7$ $\pm 4,57 \times 10^6$	$2,01 \times 10^7$ $\pm 6,93 \times 10^6$	100 $\pm 16$	153 $\pm 29$	280 $\pm 33$	147 $\pm 51$	oporny
$\Delta$ <i>fepE</i>	$1,52 \times 10^7$ $\pm 2,94 \times 10^6$	$2,70 \times 10^7$ $\pm 3,65 \times 10^6$	$4,85 \times 10^7$ $\pm 1,36 \times 10^7$	$3,01 \times 10^7$ $\pm 5,75 \times 10^6$	100 $\pm 19$	178 $\pm 24$	320 $\pm 90$	199 $\pm 38$	oporny
$\Delta$ <i>wzz</i>	$1,32 \times 10^7$ $\pm 2,55 \times 10^6$	$1,06 \times 10^7$ $\pm 9,25 \times 10^5$	$1,43 \times 10^7$ $\pm 1,02 \times 10^7$	$4,37 \times 10^7$ $\pm 3,78 \times 10^6$	100 $\pm 19$	80 $\pm 7$	108 $\pm 77$	330 $\pm 29$	oporny
$\Delta$ <i>fepE</i> $\Delta$ <i>wzz</i>	$1,84 \times 10^7$ $\pm 3,43 \times 10^6$	$2,12 \times 10^7$ $\pm 4,82 \times 10^6$	$2,88 \times 10^7$ $\pm 1,32 \times 10^7$	$9,87 \times 10^5$ $6,66 \times 10^5$	100 $\pm 19$	115 $\pm 26$	156 $\pm 72$	5 $\pm 4$	wrażliwy
$\Delta$ <i>wzy</i>	$1,22 \times 10^7$ $\pm 3,01 \times 10^6$	$2,00 \times 10^7$ $\pm 1,45 \times 10^6$	$4,39 \times 10^7$ $\pm 1,60 \times 10^7$	$1,36 \times 10^8$ $\pm 1,24 \times 10^7$	100 $\pm 25$	163 $\pm 12$	359 $\pm 131$	1114 $\pm 101$	oporny

Tabela 16. Przeżywalność badanych mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817 w czasie 120 minut inkubacji w 50% NSL/A.

Bakteriobójcza aktywność 50% NSL/A									
<i>S. Enteritidis</i> PCM 2817	CFU/ml				Przeżywalność komórek [%]				Poziom wrażliwości
	T <sub>0</sub>	T <sub>30</sub>	T <sub>60</sub>	T <sub>120</sub>	T <sub>30</sub>	T <sub>30</sub>	T <sub>60</sub>	T <sub>120</sub>	
WT	$1,32 \times 10^7$ $\pm 2,14 \times 10^6$	$1,86 \times 10^7$ $\pm 3,99 \times 10^6$	$1,68 \times 10^7$ $\pm 3,11 \times 10^6$	$2,08 \times 10^7$ $\pm 2,62 \times 10^6$	100 $\pm 16$	141 $\pm 30$	127 $\pm 24$	158 $\pm 20$	oporny
$\Delta$ <i>fepE</i>	$1,66 \times 10^7$ $\pm 7,81 \times 10^5$	$2,53 \times 10^7$ $\pm 2,47 \times 10^6$	$3,42 \times 10^7$ $\pm 6,95 \times 10^6$	$5,07 \times 10^7$ $\pm 1,31 \times 10^7$	100 $\pm 5$	153 $\pm 15$	207 $\pm 42$	306 $\pm 79$	oporny
$\Delta$ <i>wzz</i>	$1,25 \times 10^7$ $\pm 9,61 \times 10^5$	$3,52 \times 10^6$ $\pm 1,95 \times 10^6$	$1,58 \times 10^3$ $\pm 1,14 \times 10^3$	$2,89 \times 10^2$ $\pm 0,17$	100 $\pm 8$	28 $\pm 16$	< 1	< 1	wrażliwy
$\Delta$ <i>fepE</i> $\Delta$ <i>wzz</i>	$1,52 \times 10^7$ $\pm 2,59 \times 10^6$	$1,81 \times 10^6$ $\pm 1,13 \times 10^6$	$2,54 \times 10^3$ $\pm 1,16 \times 10^3$	$3,33 \times 10^1$ $\pm 0,65$	100 $\pm 17$	12 $\pm 7$	< 1	< 1	wrażliwy
$\Delta$ <i>wzy</i>	$1,30 \times 10^7$ $\pm 1,90 \times 10^6$	$1,59 \times 10^7$ $\pm 3,58 \times 10^6$	$3,50 \times 10^5$ $\pm 2,09 \times 10^4$	$1,17 \times 10^3$ $\pm 2,36 \times 10^2$	100 $\pm 15$	122 $\pm 28$	3 $\pm 0,1$	< 1	wrażliwy

Kontrolę w doświadczeniu stanowiła 50% ITS. Wszystkie badane mutanty *S. Enteritidis* PCM 2817 charakteryzowały się wzrostem przeżywalności po 30, 60 oraz 120 minutach inkubacji z 50% ITS (rycina 35, tabela 17).



Rycina 35. Przeżywalność badanych mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817 w 50% ITS. Na wykresach pokazano średnią z odchyleniem standardowym próbki.

Tabela 17. Przeżywalność badanych mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817 w czasie 120 minut inkubacji w 50% ITS.

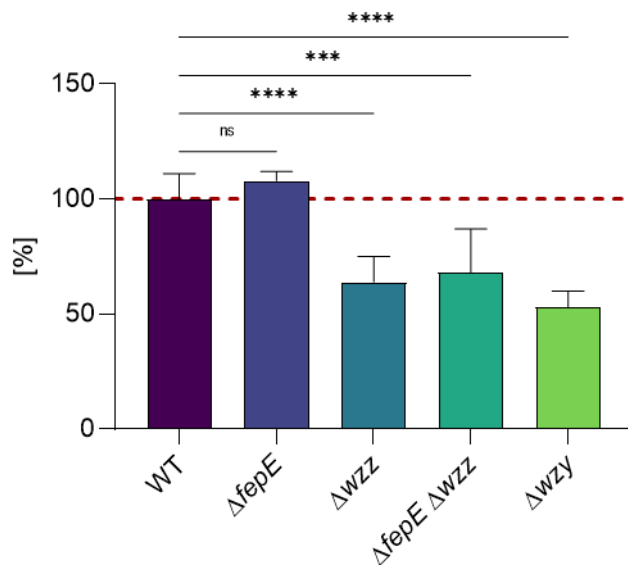
Bakteriobójcza aktywność 50% ITS						
<i>S. Enteritidis</i> PCM 2817	CFU/ml				Przeżywalność komórek [%]	
	T <sub>0</sub>	T <sub>30</sub>	T <sub>60</sub>	T <sub>120</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>120</sub>
WT	$1,42 \times 10^7$ $\pm 7,78 \times 10^5$	$2,26 \times 10^7$ $\pm 3,92 \times 10^6$	$4,30 \times 10^7$ $\pm 3,93 \times 10^6$	$9,46 \times 10^7$ $\pm 1,03 \times 10^7$	100 $\pm 5$	665 $\pm 72$
$\Delta fepE$	$1,60 \times 10^7$ $\pm 2,89 \times 10^4$	$3,23 \times 10^7$ $\pm 1,95 \times 10^6$	$4,75 \times 10^7$ $\pm 1,35 \times 10^7$	$1,00 \times 10^8$ $\pm 1,66 \times 10^7$	100 $\pm 1$	626 $\pm 104$
$\Delta wzz$	$1,40 \times 10^7$ $\pm 3,12 \times 10^6$	$2,20 \times 10^7$ $\pm 2,50 \times 10^6$	$4,15 \times 10^7$ $\pm 2,01 \times 10^7$	$7,52 \times 10^7$ $\pm 3,29 \times 10^6$	100 $\pm 22$	539 $\pm 24$
$\Delta fepE$ $\Delta wzz$	$1,85 \times 10^7$ $\pm 2,00 \times 10^6$	$2,18 \times 10^7$ $\pm 5,32 \times 10^6$	$4,86 \times 10^7$ $\pm 1,57 \times 10^7$	$9,43 \times 10^7$ $\pm 1,43 \times 10^7$	100 $\pm 11$	511 $\pm 77$
$\Delta wzy$	$1,39 \times 10^7$ $\pm 3,17 \times 10^6$	$2,44 \times 10^7$ $\pm 1,18 \times 10^6$	$2,70 \times 10^7$ $\pm 6,84 \times 10^6$	$1,32 \times 10^8$ $\pm 8,02 \times 10^6$	100 $\pm 23$	949 $\pm 58$

### 8.5.2 Określenie poziomu aktywacji układu dopełniacza przez badane mutanty bakteryjne

Poziom aktywacji układu dopełniacza przez mutanty *S. Enteritidis* PCM 2817 zbadano za pomocą cytometrii przepływowej z wykorzystaniem specyficznego przeciwciała wykrywającego kompleks C5b-9 (metoda 7.7.2). Badane szczepy inkubowano 30 minut z 50% NSL, wyznakowano przeciwciałami i zmierzono komórki w cytometrze przepływowym. Wartości średniej intensywności fluorescencji uzyskanej podczas pomiarów (ang. mean fluorescent intensity, MFI) dla szczepu dzikiego przypisano wartość 100%, a następnie, w celu porównania różnic pomiędzy badanymi szczepami, uzyskane wartości MFI dla każdego szczepu znormalizowano w stosunku do szczepu dzikiego (tabela 18). Poziom aktywacji układu dopełniacza przez całe komórki bakteryjne badanych mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817 przedstawiono na rycinie 36. Mutant  $\Delta fepE$  aktywował układ dopełniacza w największym stopniu (108%), mutanty:  $\Delta wzz$ ,  $\Delta fepE \Delta wzz$  oraz  $\Delta wzy$  aktywowały układ dopełniacza w mniejszym stopniu w porównaniu do szczepu dzikiego ( $\Delta wzz$  - 64%,  $\Delta fepE \Delta wzz$  - 68 %,  $\Delta wzy$  - 53%). Mutant  $\Delta wzy$  wykazał najniższy poziom aktywacji układu dopełniacza spośród wszystkich testowanych szczepów (rycina 36).

Tabela 18. Normalizacja wartości MFI dla C5b-9 pozytywnych komórek *S. Enteritidis* PCM 2817.

<i>S. Enteritidis</i> PCM 2817	MFI	Poziom aktywacji układu dopełniacza [%]
WT	86 ± 9	100 ± 11
$\Delta fepE$	92 ± 4	108 ± 4
$\Delta wzz$	55 ± 9	64 ± 11
$\Delta fepE \Delta wzz$	58 ± 16	68 ± 19
$\Delta wzy$	46 ± 6	53 ± 7



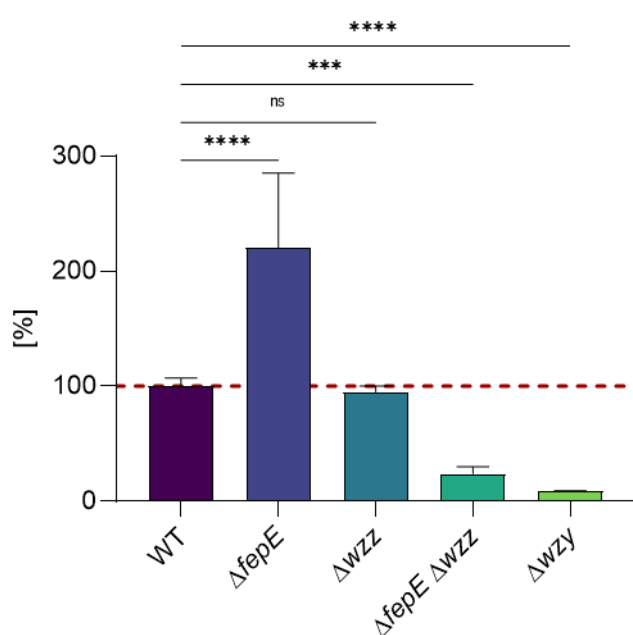
Rycina 36. Poziom aktywacji układu dopełniacza przez badane mutanty *S. Enteritidis* PCM 2817. Zebrane wyniki analizowano testem ANOVA oraz testem post hoc Dunnetta ( $p < 0,05$ ) przyjmując jako grupę kontrolną WT.

### 8.5.3 Określenie poziomu aktywacji układu dopełniacza przez izolowane typy lipopolisacharydu

Analizę poziomu aktywacji drogi alternatywnej układu dopełniacza przez różne typy LPS wyizolowane z testowanych mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817 przeprowadzono z wykorzystaniem testu ELISA oraz specyficznego przeciwciała wykrywającego kompleks C5b-9 (metoda 7.7.3). Uzyskane wyniki z odczytu absorbancji przy 450 nm znormalizowano, przypisując szczepowi dzikiemu wartość 100%. Poziom aktywacji układu dopełniacza na drodze alternatywnej przez różne typy LPS przedstawiono w tabeli 19 oraz na rycinie 37. LPS wyizolowany od mutantu  $\Delta fepE$  aktywował układ dopełniacza na drodze alternatywnej na poziomie dwukrotnie wyższym niż szczep dziki (220%). Dla LPS  $\Delta wzz$ ,  $\Delta fepE \Delta wzz$  oraz  $\Delta wzy$  zaobserwowano zależność, że wraz ze skracaniem długości LPS spada poziom aktywacji układu dopełniacza na drodze alternatywnej. Mutant  $\Delta wzz$  aktywował dopełniacz na poziomie 98%, mutant  $\Delta fepE \Delta wzz$  na poziomie 24% natomiast mutant  $\Delta wzy$  tylko na poziomie 9% (rycina 37).

Tabela 19. Poziom aktywacji układu dopełniacza na drodze alternatywnej przez różne typy LPS wyizolowane z bakterii *S. Enteritidis* PCM 2817.

LPS <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817	Poziom aktywacji układu dopełniacza [%]
WT	100 ± 7
$\Delta$ <i>fepE</i>	220 ± 65
$\Delta$ <i>wzz</i>	98 ± 5
$\Delta$ <i>fepE</i> $\Delta$ <i>wzz</i>	24 ± 6
$\Delta$ <i>wzy</i>	9 ± 0,4



Rycina 37. Poziom aktywacji układu dopełniacza na drodze alternatywnej przez różne typy LPS wyizolowane z bakterii *S. Enteritidis* PCM 2817. Zebrane wyniki analizowano testem ANOVA oraz testem post hoc Dunnetta ( $p < 0,05$ ) przyjmując jako grupę kontrolną WT.

#### 8.5.4 Analiza wiązania składnika C3 układu dopełniacza przez badane mutanty bakteryjne

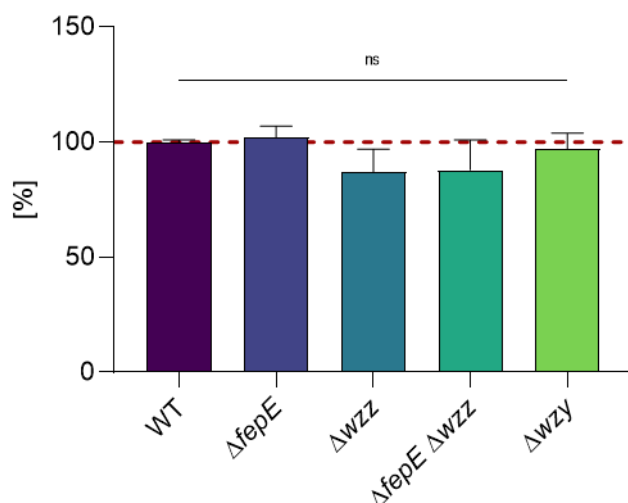
Analizę wiązania składnika C3 do całych komórek badanych mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817 przeprowadzono z wykorzystaniem cytometrii przepływowej, stosując specyficzne przeciwciało wykrywające zdeponowany na powierzchni komórki składnik C3d układu dopełniacza (metoda 7.7.4). Szczep dziki *S. Enteritidis* PCM 2817 oraz jego mutanty długościowe inkubowano 30 minut z 50% NSL/A, wyznakowano przeciwciałami i analizowano komórki w cytometrze przepływowym. Uzyskanej średniej wartości MFI dla szczepu dzikiego przypisano wartość 100%, a następnie, w celu porównania różnic pomiędzy



badanymi szczepami, uzyskane wartości MFI dla każdego szczepu znormalizowano w stosunku do szczepu dzikiego (tabela 20). Poziom wiązania składnika C3 przez całe komórki bakteryjne badanych szczepów *S. Enteritidis* PCM 2817 przedstawiono na rycinie 38. Nie zaobserwowano istotnych zmian w poziomie wiązania składnika C3 do żadnego z testowanych szczepów bakteryjnych w porównaniu do szczepu dzikiego. Mutant  $\Delta fepE$  wiązał składnik C3 na poziomie 102%, mutant  $\Delta wzz$  na poziomie 87%, mutant  $\Delta fepE \Delta wzz$  na poziomie 88% natomiast mutant  $\Delta wzy$  na poziomie 97%.

Tabela 20. Normalizacja wartości MFI dla C3d pozytywnych komórek *S. Enteritidis* PCM 2817.

<i>S. Enteritidis</i> PCM 2817	MFI	Poziom wiązania składnika C3d [%]
WT	92 ± 1	100 ± 1
$\Delta fepE$	94 ± 4	102 ± 5
$\Delta wzz$	80 ± 10	87 ± 10
$\Delta fepE \Delta wzz$	82 ± 13	88 ± 13
$\Delta wzy$	90 ± 6	97 ± 7



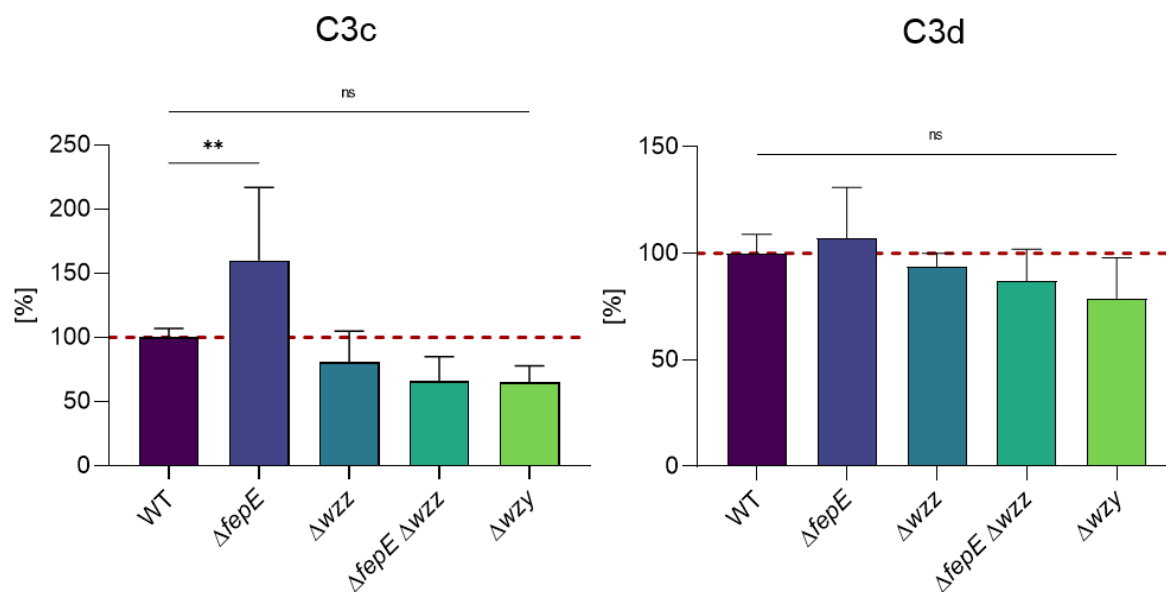
Rycina 38. Poziom wiązania składnika C3 układu dopełniacza przez badane mutanty *S. Enteritidis* PCM 2817. Zebrane wyniki analizowano testem ANOVA oraz testem post hoc Dunnetta ( $p < 0,05$ ) przyjmując jako grupę kontrolną WT.

### 8.5.5 Analiza wiązania składnika C3 układu dopełniacza przez izolowane typy lipopolisacharydu

Analizę wiązania składnika C3 do różnych typów LPS izolowanych z badanych mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817 przeprowadzono z wykorzystaniem testu ELISA (metoda 7.7.5). W przeprowadzonym teście użyto dwóch typów przeciwciał: anty ludzkie C3c oraz anty ludzkie C3d. Uzyskane wyniki z odczytu absorbancji przy 450 nm znormalizowano, przypisując szczepu dzikiemu wartość 100%. Poziom wiązania składnika C3 układu dopełniacza przez różne typy LPS przedstawiono w tabeli 21 oraz na rycinie 39. Najwyższy poziom wiązania składnika C3 zaobserwowano dla szczepu  $\Delta fepE$ , który wynosił odpowiednio 160% przy zastosowaniu przeciwciała wykrywającego składnik C3c oraz 107% przy zastosowaniu przeciwciała wykrywającego składnik C3d układu dopełniacza. Poziom wiązania składnika C3 wykryty z zastosowaniem przeciwciała C3c dla pozostałych testowanych typów LPS wynosił odpowiednio: 81% dla  $\Delta wzz$ , 66% dla  $\Delta fepE \Delta wzz$  oraz 65% dla  $\Delta wzz$ . Analiza wiązania składnika C3 z zastosowaniem przeciwciała wykrywającego C3d wykazała, że mutant  $\Delta wzz$  związał składnik C3 na poziomie 94%, mutant  $\Delta fepE \Delta wzz$  na poziomie 87% natomiast mutant  $\Delta wzy$  na poziomie 79% w stosunku do szczepu dzikiego.

Tabela 21. Poziom wiązania składnika C3 układu dopełniacza na drodze alternatywnej przez różne typy LPS wyizolowane z *S. Enteritidis* PCM 2817.

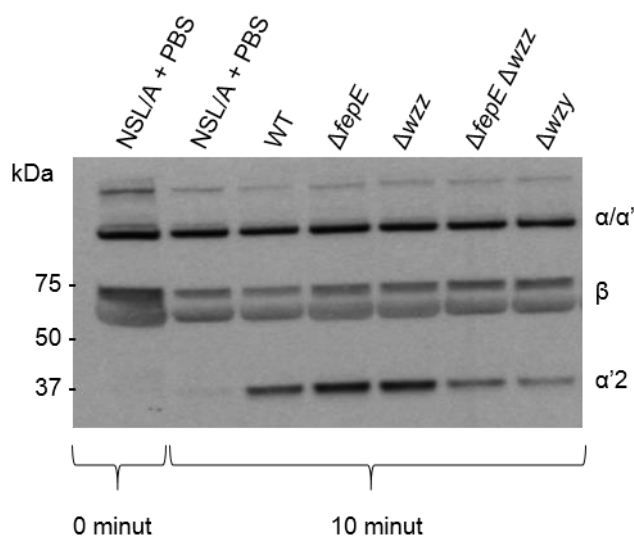
<i>S. Enteritidis</i> PCM 2817	Poziom wiązania składnika C3 [%]	
	C3c	C3d
WT	100 ± 7	100 ± 9
$\Delta fepE$	160 ± 57	107 ± 24
$\Delta wzz$	81 ± 24	94 ± 6
$\Delta fepE \Delta wzz$	66 ± 19	87 ± 15
$\Delta wzy$	65 ± 13	79 ± 19



Rycina 39. Poziom wiązania składnika C3 układu dopełniacza przez różne typy LPS wyizolowane z badanych mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817. Zebrane wyniki analizowano testem ANOVA oraz testem post hoc Dunnetta ( $p < 0,05$ ) przyjmując jako grupę kontrolną WT.

### 8.5.6 Analiza rozkładu składnika C3 układu dopełniacza w surowicy pod wpływem badanych mutantów bakteryjnych

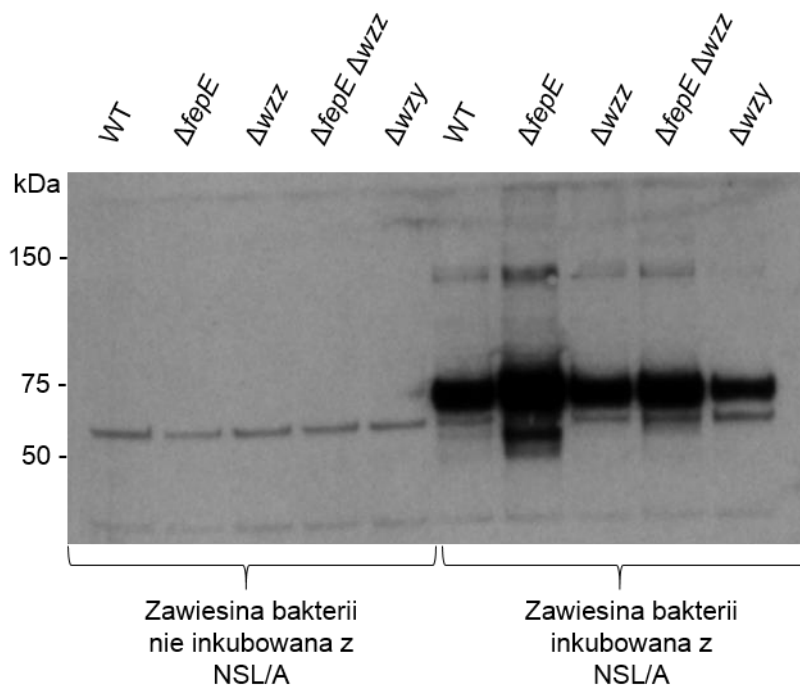
W celu zbadania stopnia rozkładu składnika C3 przez badane mutanty *S. Enteritidis* PCM 2817, bakterie inkubowano z 50% NSL/A, a po zwirowaniu supernatanty analizowano za pomocą techniki Western blot (metoda 7.7.6). Do detekcji produktów trawienia zastosowano przeciwciało anty ludzkie C3c. Wszystkie testowane mutanty *S. Enteritidis* PCM 2817 inaktywowały składnik C3 w surowicy (rycina 40). Nie zaobserwowano cięcia składnika C3 w przypadku inkubacji 50% NSL/A z buforem PBS (kontrola eksperymentu). Pod wpływem aktywacji układu dopełniacza, łańcuch C3 $\alpha$  został pocięty na dwa fragmenty o masie około 63 oraz 38 kDa. Największą ilość powstałego produktu o masie około 39 kDa ( $\alpha'$ 2) zaobserwowano dla: WT,  $\Delta$ *fepE* oraz  $\Delta$ *wzz* (rycina 40).



Rycina 40. Inaktywacja składnika C3 w surowicy przez testowane mutanty *S. Enteritidis* PCM 2817.

### 8.5.7 Analiza wiązania składnika C9 układu dopełniacza przez badane mutanty bakteryjne

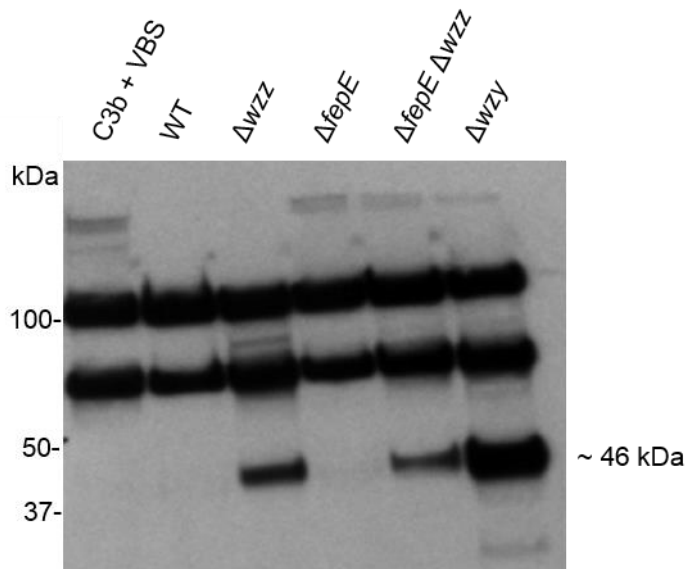
W celu zwizualizowania wiązania składnika C9 do badanych szczepów, bakterie *S. Enteritidis* PCM 2817 inkubowano z 50% NSL/A, następnie osad analizowano za pomocą techniki Western blot, używając przeciwciała anty ludzkie C9 (metoda 7.7.7). Na rycinie 41 przedstawiono poziom wiązania składnika C9 do badanych szczepów bakteryjnych. Najwięcej składnika C9 związał szczep  $\Delta fepE$ , natomiast szczep  $\Delta wzy$  charakteryzował się najniższym poziomem wiązania składnika C9.



Rycina 41. Wiązanie białka C9 układu dopełniacza do badanych mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817.

### 8.5.8 Określenie wpływu długości lipopolisacharydu na proteolityczną aktywność białka PgtE względem składnika C3 układu dopełniacza

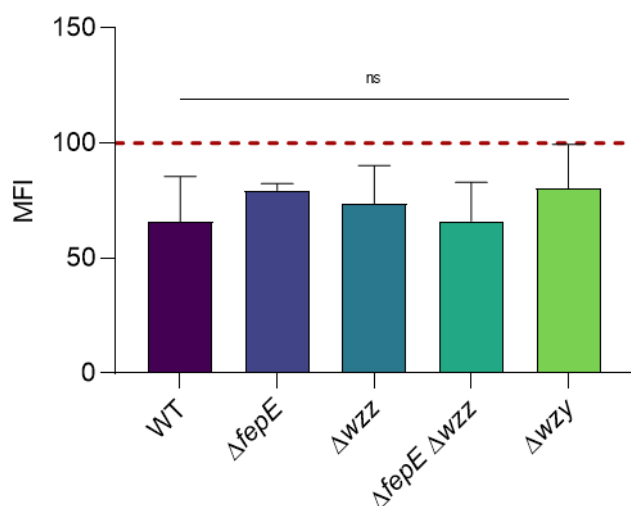
Określono wpływ długości części O-swoistej LPS badanych mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817 na proteolityczną aktywność białka PgtE względem składnika C3 układu dopełniacza. W tym celu szczepy inkubowano przez 4 godziny z oczyszczonym białkiem C3b, a następnie analizowano rozkład białka techniką Western blot (metoda 7.7.8). Rozkład białka C3b zaobserwowano dla mutantów  $\Delta wzz$ ,  $\Delta fepE \Delta wzz$  oraz  $\Delta wzy$  (rycina 42). U powyższych szczepów białko C3b uległo proteolizie w wyniku której powstał fragment o wielkości około 46 kDa. Mutant  $\Delta wzy$  charakteryzował się największą aktywnością względem białka C3b.



Rycina 42. Proteolityczna aktywność białka PgtE u badanych mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817.

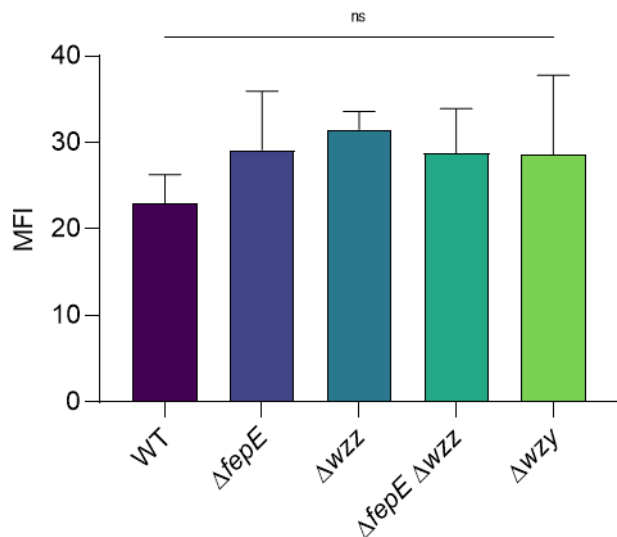
## 8.6 Ocena modelowej patogenności *in vitro* – wpływ długości lipopolisacharydu na pochłanianie bakterii przez komórki ssacze

W celu oceny czy długość części O-swoistej LPS bakterii *S. Enteritidis* PCM 2817 ma wpływ na pochłanianie przez komórki ssacze, bakterie inkubowano z 3 typami komórek (mysie niedojrzałe komórki dendrytyczne – JAWSII, mysie makrofagi - RAW 264.7 oraz ludzkie komórki gruczołaka okrężnicy – Caco-2), a następnie analizowano komórki z wykorzystaniem cytometrii przepływowej (metoda 7.8). MFI jest wskaźnikiem ilości pobranych bakterii przez testowane linie komórkowe. W przypadku komórek dendrytycznych linii JAWSII nie wykazano istotnych różnic w poziomie pobierania bakterii *S. Enteritidis* PCM 2817 o różnej długości części O-swoistej LPS (rycina 43).

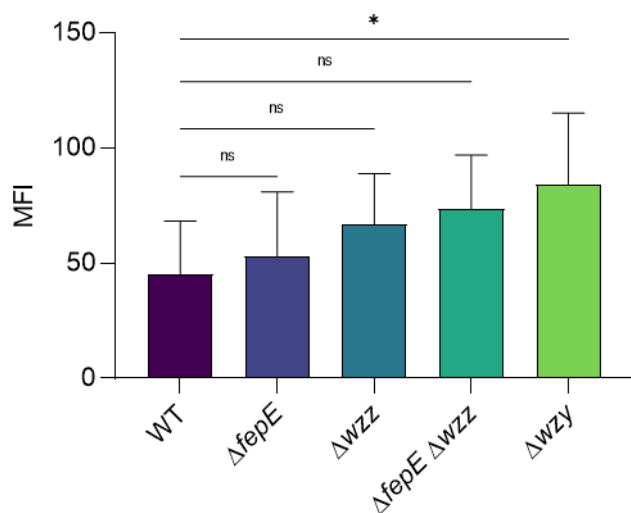


Rycina 43. Pobieranie bakterii *S. Enteritidis* PCM 2817 przez komórki dendrytyczne JAWSII. Zebrane wyniki analizowano testem ANOVA ( $p < 0,05$ ).

W przypadku ludzkich komórek gruczołaka okrężnicy – Caco-2 również nie zaobserwowano istotnych różnic w stopniu pobierania testowanych szczepów bakteryjnych (rycina 44). Ostatnią testowaną linią komórkową były mysie makrofagi RAW 264.7. Uzyskane wyniki wskazują na istotny wpływ długości części O-swoistej LPS na pochłanianie przez makrofagi (rycina 45). Szczep  $\Delta wzy$  charakteryzował się dwukrotnie wyższym stopniem pochłaniania przez makrofagi w porównaniu do szczepu dzikiego. **Można zaobserwować wyraźny trend, który wskazuje, że wraz ze skracaniem długości części O-swoistej LPS zwiększa się stopień pochłaniania bakterii przez testowaną linię komórkową mysich makrofagów RAW 264.7.**



Rycina 44. Pobieranie bakterii *S. Enteritidis* PCM 2817 przez komórki Caco-2. Zebrane wyniki analizowano testem ANOVA ( $p < 0,05$ ).



Rycina 45. Pobieranie bakterii *S. Enteritidis* PCM 2817 przez komórki RAW 264.7. Zebrane wyniki analizowano testem ANOVA oraz testem post hoc Dunnetta ( $p < 0,05$ ) przyjmując jako grupę kontrolną WT.



## 8.7 Ocena modelowej patogenności *in vivo* z wykorzystaniem modelu larw barciaka większego *Galleria mellonella*

Do określenia poziomu patogenności *in vivo* badanych mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817 o skróconej długości łańcucha O-swoistego LPS wybrano owadzi model larw barciaka większego – *Galleria mellonella*. W przeprowadzonym teście analizowano przeżywalność larw po zaaplikowaniu zawiesin danego szczepu bakteryjnego o określonej wartości OD<sub>600</sub> (metoda 7.9). Dla każdej wartości gęstości optycznej nastrzykiwano 15 larw. Liczba larw po 120 godzinach inkubacji oraz wartości CFU/ml wyjściowej zawiesiny bakteryjnej zostały przedstawione w tabeli 22. Wartość CFU/ml dla gęstości optycznej OD<sub>600</sub> = 0,1 wynosiła około 10<sup>8</sup> bakterii, dla 0,01 około 10<sup>7</sup> oraz dla 0,001 około 10<sup>6</sup>. Na podstawie wykonanych testów przeżywalności, ustalono, że najbardziej różnicująca pod kątem patogenności badane szczepy była zawiesina bakteryjna o gęstości optycznej OD<sub>600</sub> równej 0,01 (CFU/ml = 10<sup>7</sup>). W celu oceny stopnia patogenności *in vivo* na potrzeby pracy doktorskiej została wprowadzona skala różnicująca badane szczepy w oparciu o stopień przeżywalności larw wyrażony w [%] po iniekcji CFU/ml = 10<sup>7</sup> po 120 godzinach inkubacji (tabela 23). Wprowadzona skala:

- od 0% do 15% przeżywalności larw – stopień patogenności bardzo wysoki
- od 16% do 40% przeżywalności larw – stopień patogenności wysoki
- od 41% do 75% przeżywalności larw – stopień patogenności średni
- od 76% do 100% przeżywalności larw – stopień patogenności niski

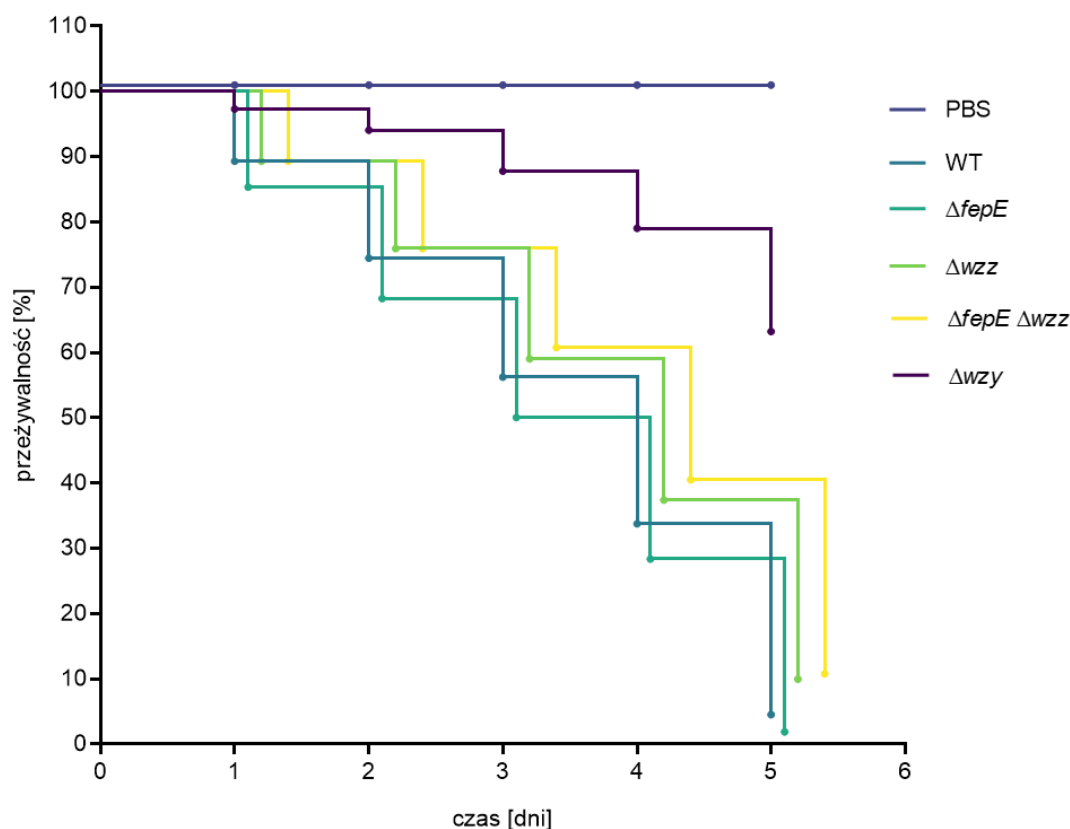
Tabela 22. Liczba larw żywych po 120 minutach inkubacji oraz wartości CFU/ml inokulum bakteryjnego.

<i>S. Enteritidis</i>	Liczba żywych larw po 120 godzinach inkubacji			Wartość CFU/ml wyjściowej zawiesiny bakteryjnej		
	OD <sub>600</sub>	OD <sub>600</sub>	OD <sub>600</sub>	OD <sub>600</sub>	OD <sub>600</sub>	OD <sub>600</sub>
PCM 2817	0,1	0,01	0,001	0,1	0,01	0,001
WT	0,7 ± 0,6	2,3 ± 0,6	8,3 ± 0,6	$1,56 \times 10^8$ $\pm 2,89 \times 10^7$	$1,74 \times 10^7$ $\pm 8,39 \times 10^4$	$1,49 \times 10^6$ $\pm 4,06 \times 10^5$
$\Delta fepE$	0	1,3 ± 1,2	7,3 ± 1,2	$1,65 \times 10^8$ $\pm 8,54 \times 10^7$	$1,70 \times 10^7$ $\pm 1,48 \times 10^6$	$4,04 \times 10^6$ $\pm 1,00 \times 10^6$
$\Delta wzz$	0,3 ± 0,6	4,3 ± 2,1	11 ± 1,7	$1,17 \times 10^8$ $\pm 4,99 \times 10^7$	$1,75 \times 10^7$ $\pm 3,84 \times 10^6$	$2,65 \times 10^6$ $\pm 1,05 \times 10^6$
$\Delta fepE \Delta wzz$	1,3 ± 1,3	4,3 ± 0,5	12,3 ± 1,5	$1,44 \times 10^8$ $\pm 1,61 \times 10^7$	$2,41 \times 10^7$ $\pm 3,76 \times 10^6$	$2,02 \times 10^6$ $\pm 9,73 \times 10^5$
$\Delta wzy$	4,5 ± 1,3	11,25 ± 1,5	11,7 ± 1,7	$1,40 \times 10^8$ $\pm 3,03 \times 10^7$	$5,53 \times 10^7$ $\pm 2,08 \times 10^6$	$4,24 \times 10^6$ $\pm 1,52 \times 10^6$

Tabela 23. Przeżywalność larw po 120 godzinach inkubacji oraz stopień patogenności badanych szczepów *in vivo*.

<i>S. Enteritidis</i> PCM 2817	Przeżywalność [%]			Stopień patogenności <i>in vivo</i>
	OD <sub>600</sub>	OD <sub>600</sub>	OD <sub>600</sub>	
	0,1	0,01	0,001	
WT	7	13	53	bardzo wysoki
$\Delta fepE$	0	7	47	bardzo wysoki
$\Delta wzz$	0	27	73	wysoki
$\Delta fepE \Delta wzz$	7	27	80	wysoki
$\Delta wzy$	33	73	80	średni

W celu wizualizacji przeżywalności larw w czasie sporządzono krzywą z zastosowaniem algorytmu Kaplan-Meiera i oprogramowania GraphPad Prism 9.0 (rycina 46).



Rycina 46. Krzywa przeżywalności larw *Galleria mellonella* w czasie 5 dni po iniekcji zawiesinami *S. Enteritidis* PCM 2817 o wartości CFU/ml  $10^7$ .

Uzyskane wyniki wskazują na zróżnicowany poziom patogenności *in vivo* badanych mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817. Szczep dziki oraz  $\Delta fepE$  określono jako szczep o bardzo wysokim stopniu patogenności *in vivo*. Po 120 godzinach inkubacji przeżywalność larw po iniekcji szczepem dzikim wynosiła 13% a po iniekcji szczepem  $\Delta fepE$  7%.  $\Delta wzz$  oraz  $\Delta fepE \Delta wzz$  zaklasyfikowano jako mutanty o wysokim poziomie patogenności (27% przeżywalności larw po 120 godzinach inkubacji).  $\Delta wzy$  scharakteryzowano jako mutantą o średnim poziomie patogenności *in vivo*, po 5 dniach inkubacji przeżywalność larw wynosiła 73%. W przeprowadzonym eksperymencie kontrolę stanowiła grupa 15 larw nastrzykiwanych buforem PBS. Po 120 godzinach inkubacji przeżywalność larw w grupie kontrolnej wynosiła 100% (rycina 46).

## 8.8 Wpływ rozkładu długości cząsteczek lipopolisacharydu na kształtowanie proteomu błony zewnętrznej

Białka błony zewnętrznej wyizolowano z badanych mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817 o różnym rozkładzie długości części O-swoistej cząsteczek LPS oraz ze szczepu dzikiego. Stężenia wyizolowanych białek OMP przedstawiono w tabeli 24. Trawieniu trypsyną poddano 80 µg mieszaniny białek dla każdej próby, a następnie otrzymane peptydy wyznakowano znacznikami izobarycznymi TMT<sup>TM</sup> (Thermo Scientific) w celu przeprowadzenia względnej oceny ilościowej (metoda 7.10). Mieszaninę wyznakowanych peptydów dla każdego szczepu, w obrębie każdego eksperymentu, poddano frakcjonowaniu z wykorzystaniem aparatu Easy nLC 1000 (Thermo Scientific) oraz poddano analizie spektrometrycznej z wykorzystaniem aparatu LTQ Orbitrap Elite ETD (Thermo Scientific). Podczas analizy zidentyfikowano 673 białka.

Tabela 24. Stężenie OMP wyizolowanych z badanych szczepów *S. Enteritidis* PCM 2817.

<i>S. Enteritidis</i> PCM 2817	Stężenie białek [µg/ml]		
	1 eksperyment	2 eksperyment	3 eksperyment
WT	1352	1600	1522
$\Delta$ <i>fepE</i>	1220	1890	1405
$\Delta$ <i>wzz</i>	1386	1696	1446
$\Delta$ <i>fepE</i> $\Delta$ <i>wzz</i>	1437	1671	1079
$\Delta$ <i>wzy</i>	1374	1546	1518

Zidentyfikowane białka analizowano pod kątem różnic w ich ilości u poszczególnych mutantów o różnej długości części O-swoistej LPS w stosunku do szczepu dzikiego *S. Enteritidis* PCM 2817. Jako kryterium wyboru przyjęto wartość abundancji mniejszą lub równą 0,5 (spadek ilości białka w stosunku do szczepu dzikiego) oraz wartość abundancji większą lub równą 1,5 (wzrost ilości białka w stosunku do szczepu dzikiego).

Przy założonych parametrach przeszukiwania wytypowano 3 białka występujące w mniejszej ilości oraz 4 białka występujące w większej ilości u szczepu  $\Delta$ *fepE* w porównaniu do szczepu dzikiego (Tabela 25).

Tabela 25. Różnice ilościowe w proteomie *S. Enteritidis* PCM 2817  $\Delta$ *fepE*.

Białko	Gen	Wartość
		abundancji $\Delta$ <i>fepE</i> /WT
Elongation factor Ts	<i>tsf</i>	0,390
Transport ATP-binding protein CydC	<i>cydC</i>	0,383
Macrolide export ATP-binding protein MacB	<i>macB</i>	0,300
Ferrichrome porin FhuA	<i>fhuA</i>	2,170
Flagellin	<i>fliC</i>	1,743
Orotate phosphoribosyltransferase	<i>pyrE</i>	1,908
Bifunctional polymyxin resistance protein ArnA	<i>arnA</i>	1,582

Porównując szczep  $\Delta$ *wzz* do szczepu dzikiego wytypowano 3 białka występujące w mniejszej ilości oraz 11 białek występujące w większej ilości (Tabela 26).

Tabela 26. Różnice ilościowe w proteomie *S. Enteritidis* PCM 2817  $\Delta$ *wzz*.

Białko	Gen	Wartość
		abundancji $\Delta$ <i>wzz</i> /WT
LPS O-antigen chain length determinant protein	<i>wzzB</i>	0,347
Macrolide export ATP-binding protein MacB	<i>macB</i>	0,264
Uncharacterized protein	<i>SEENIN0B_03087</i>	0,493
HAMP domain-containing protein	<i>CSU32_04080</i>	1,650
Fimbrial chaperone	<i>focC</i>	1,806
Flagellin	<i>fliC</i>	3,507
Methyl-accepting chemotaxis citrate transducer	<i>tcp</i>	1,756
Bifunctional polymyxin resistance protein ArnA	<i>arnA</i>	1,720
YidC membrane insertion protein	<i>yidC</i>	1,574
Molecular chaperone	<i>A0181_01670</i>	1,673
Translation initiation factor IF-2	<i>infB</i>	1,852
Argininosuccinate lyase	<i>argH</i>	1,609
SsrAB-activated protein	<i>E0W98_07990</i>	1,650
Flagellin	<i>fljB</i>	1,668

Przy założonych parametrach przeszukiwania wytypowano 4 białka występujące w mniejszej ilości u szczepu  $\Delta\text{fepE } \Delta\text{wzz}$  oraz 15 białek występujące w większej ilości u szczepu  $\Delta\text{fepE } \Delta\text{wzz}$  w porównaniu do szczepu dzikiego (Tabela 27).

Tabela 27. Różnice ilościowe w proteomie *S. Enteritidis* PCM 2817  $\Delta\text{fepE } \Delta\text{wzz}$ .

Białko	Gen	Wartość abundancji
		$\Delta\text{fepE } \Delta\text{wzz} / \text{WT}$
Macrolide export ATP-binding protein MacB	<i>macB</i>	0,213
LPS O-antigen chain length determinant protein	<i>wzzB</i>	0,400
Elongation factor Ts	<i>tsf</i>	0,440
Cell division protein FtsA	<i>ftsA</i>	0,371
Thiol:disulfide interchange protein DsbD	<i>dsbD</i>	1,550
Ribosomal RNA small subunit methyltransferase G	<i>rsmG</i>	1,909
YidC membrane insertion protein	<i>yidC</i>	1,933
Methyl-accepting chemotaxis citrate transducer	<i>tcp</i>	1,604
Hrp pili protein HrpA	<i>hrpA</i>	1,522
Heme exporter protein D	<i>ccmD_2</i>	1,526
Glycerophosphodiester phosphodiesterase	<i>DTV46_13565</i>	1,534
Flagellin	<i>fliC</i>	1,835
Fimbrial chaparone	<i>focC</i>	1,924
Ferrichrome porin FhuA	<i>fhuA</i>	1,754
Class I tRNA ligase family protein	<i>AUE24_24885</i>	1,784
Chaperone protein	<i>sigE</i>	1,779
Alkyl hydroperoxide reductase C	<i>ahpC</i>	2,279
50S ribosomal protein L7/L12	<i>rplL</i>	1,642
30S ribosomal protein S14	<i>rpsN</i>	1,575

Porównując szczep  $\Delta wzy$  ze szczepem dzikim wykryto 26 białek, które występowały w większej ilości u szczepu  $\Delta wzy$ . Nie wykryto białek występujących w mniejszej ilości.

Tabela 28. Różnice ilościowe w proteomie *S. Enteritidis* PCM 2817  $\Delta wzy$ .

Białko	Gen	Wartość abundancji
		$\Delta wzy/WT$
Xaa-Pro aminopeptidase	<i>pepP</i>	1,664
Valine--tRNA ligase	<i>valS</i>	1,842
Two-component system response regulator PhoP	<i>phoP</i>	1,587
Thiol:disulfide interchange protein DsbD	<i>dsbD</i>	1,750
Stress response protein ElaB	<i>elaB</i>	1,502
Ribosomal RNA small subunit methyltransferase G	<i>rsmG</i>	2,061
Protein-tyrosine-phosphatase	<i>CQM83_26705</i>	1,776
Phosphotransferase RcsD	<i>rscD</i>	1,815
Pathogenicity island 1 effector protein SipA	<i>D7O28_14205</i>	1,573
YidC membrane insertion protein	<i>yidC</i>	1,641
Molecular chaperone	<i>A0181_01670</i>	1,573
Methyl-accepting chemotaxis citrate transducer	<i>tcp</i>	2,078
HAMP domain-containing protein	<i>CSU32_04080</i>	1,911
FliZ protein	<i>fliZ</i>	1,654
Flagellin	<i>fliC</i>	2,881
Flagellar motor switch protein FliG	<i>fliG</i>	1,511
Fimbrial chaperone	<i>focC</i>	2,053
Fatty acid oxidation complex subunit alpha	<i>fadJ</i>	1,597
Chaperone protein DnaK	<i>dnaK</i>	1,523
CDP-paratose synthase	<i>DT208_24300</i>	1,651
Bifunctional polymyxin resistance protein ArnA	<i>arnA</i>	2,102
ATP synthase subunit beta	<i>atpD</i>	1,838
Argininosuccinate lyase	<i>argH</i>	1,847
Acyl carrier protein	<i>acpP</i>	1,532
50S ribosomal protein L7/L12	<i>rplL</i>	2,921
30S ribosomal protein S18	<i>rpsR</i>	1,586



U wszystkich badanych mutantów zaobserwowano większą abundancję dla białka flagellin w porównaniu do szczepu dzikiego. U 3 z 4 badanych szczepów ( $\Delta wzz$ ,  $\Delta fepE \Delta wzz$  oraz  $\Delta wzy$ ) większą abundancję stwierdzono dla białek: fimbrial chaperone, methyl-accepting chemotaxis citrate transducer oraz Oxal/YidC membrane insertion protein.

Z kolei u wszystkich szczepów za wyjątkiem szczepu  $\Delta fepE \Delta wzz$  nastąpił wzrost abundancji dla białka bifunctional polymixin resistance protein ArnA. U 3 z 4 testowanych szczepów można zaobserwować spadek wartości abundancji białka macrolide export ATP-binding protein MacB.

## 8.9 Wpływ surowicy ludzkiej na kształtowanie proteomu błony zewnętrznej

W celu określenia, jak przedłużone działanie czynników bakteriobójczych surowicy ludzkiej wpływa na proteom błony zewnętrznej, OMP wyizolowano ze szczepu dzikiego *S. diarizonae* PCM 2511 (szczep przed pasażowaniem; pasaż 0) oraz ze szczepu po 9 pasażach w 50% NSL (metoda 7.11). Stężenia wyizolowanych OMP przedstawiono w tabeli 29. Trawieniu trypsyną poddano 100 µg mieszaniny białek dla każdej próby, a następnie peptydy wyznakowano znacznikami izobarycznymi TMT™ (Thermo Scientific) (tabela 8) w celu przeprowadzenia względnej oceny ilościowej (metoda 7.10.11). Mieszaninę wyznakowanych peptydów dla każdego szczepu, poddano frakcjonowaniu oraz analizie techniką spektrometrii mas.

Tabela 29. Stężenie OMP wyizolowanych z badanych szczepów *S. diarizonae* PCM 2511.

Pasaż	Stężenie białek [µg/ml]		
	1 eksperyment	2 eksperyment	3 eksperyment
0	632	563	519
9	667	575	587

Podczas analizy zidentyfikowano 1382 białka. Zidentyfikowane białka analizowano pod kątem różnic w poziomie ich występowania u szczepu *S. diarizonae* PCM 2511 przed oraz po 9 pasażach w 50% NSL. Jako kryterium wyboru przyjęto wartość abundancji mniejszą lub równą 0,5 (spadek ilości białka w stosunku do szczepu dzikiego) oraz wartość abundancji większą lub równą 1,3 (wzrost ilości białka w stosunku do szczepu dzikiego). Przy założonych parametrach przeszukiwania wytypowano 20 białek występujących w mniejszej ilości oraz 197 białek występujących w większej ilości u szczepu po 9 pasażach w 50% NSL w porównaniu do szczepu dzikiego (przed pasażami). W tabeli 30 przedstawiono 10 białek o najniższym poziomie abundancji oraz 30 białek o najwyższym poziomie abundancji w stosunku do szczepu dzikiego. Wśród białek zidentyfikowanych przy założonych parametrach przeszukiwania znalazła się spora część białek cytoplazmatycznych, w związku z czym w parametrach przeszukiwania dodano kryterium identyfikacji białek, których kompartment komórkowy jest związany z błoną. W wyniku przeprowadzonej analizy zidentyfikowano 4 białka występujących w mniejszej ilości oraz 12 białek występujących w większej ilości u szczepu po 9 pasażach w 50% NSL (Tabela 31).

Tabela 30. Różnice ilościowe w proteomie *S. diarizonae* PCM 2511 po 9 pasażach w 50% NSL.

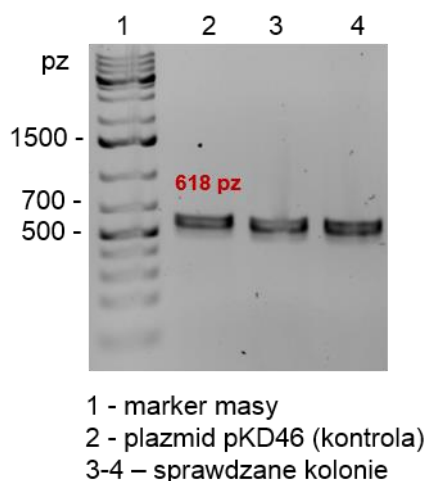
Białko	Gen	Wartość abundancji
		pasaż 0/9
2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate N-succinyltransferase	<i>dapD</i>	0,499
3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase	<i>panP</i>	0,493
Major outer membrane lipoprotein Lpp 1	<i>lpp1</i>	0,486
Propanediol utilization protein PduA	<i>pduA</i>	0,484
Nucleoside-specific channel-forming protein Tsx	<i>tsx</i>	0,482
Outer membrane porin C	<i>ompC</i>	0,472
Glycerophosphodiester phosphodiesterase	<i>glpQ</i>	0,465
S-adenosylmethionine synthase	<i>metK</i>	0,446
Glutamine synthetase	<i>glnA</i>	0,422
Putative aminopeptidase SgcX	<i>sgcX</i>	0,382
Amidophosphoribosyltransferase	<i>purF</i>	3,960
DNA protection during starvation protein	<i>dps</i>	3,425
Nitrogen regulatory protein	<i>ptsN</i>	3,086
Protein YciF	<i>yciF</i>	2,857
5'-methylthioadenosine nucleosidase	<i>mntN</i>	2,647
Mannose-6-phosphate isomerase	<i>manA</i>	2,564
Sugar phosphatase YidA	<i>yidA</i>	2,488
50S ribosomal protein L16	<i>rplP</i>	2,453
Phosphoglycerate kinase	<i>pgk</i>	2,444
6-phosphogluconate dehydrogenase	<i>gnd</i>	2,431
Sugar phosphatase YbiV	<i>ybiV</i>	2,427
UPF0265 protein YeeX	<i>yeeX</i>	2,268
6-phosphogluconolactonase	<i>pgl</i>	2,147
Oligoribonuclease	<i>orn</i>	2,108
Protein/nucleic acid deglycase 3	<i>yajL</i>	2,088
Serine hydroxymethyltransferase	<i>glyA</i>	2,079
Ribose-5-phosphate isomerase A	<i>rpiA</i>	2,071
tRNA (guanine-N(7)-)-methyltransferase	<i>trmB</i>	2,062
30S ribosomal protein S17	<i>rpsQ</i>	2,057

Tryptophan synthase alpha chain	<i>trpA</i>	2,006
Lysine--tRNA ligase	<i>lysS</i>	1,991
ATP synthase subunit alpha	<i>atpA</i>	1,978
3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 1	<i>fabB</i>	1,972
Signal recognition particle receptor FtsY	<i>ftsY</i>	1,959
3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase FabG	<i>fabG</i>	1,954
NAD(P)H dehydrogenase (quinone)	<i>SPAB_02430</i>	1,946
Stringent starvation protein A	<i>sspA</i>	1,943
Uracil phosphoribosyltransferase	<i>upp</i>	1,935
Anti-adapter protein IraP	<i>iraP</i>	1,925
Der GTPase-activating protein YihI	<i>yihI</i>	1,920

Tabela 31. Różnice ilościowe w proteomie *S. diarizonae* PCM 2511 po 9 pasażach w 50% NSL zawężone do białek związanych z błoną.

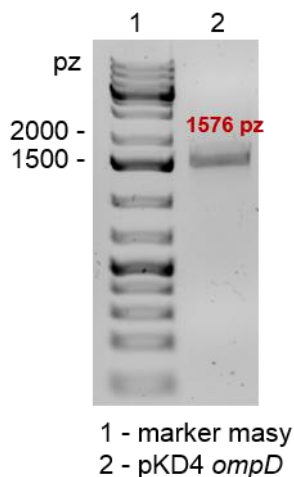
Białko	Gen	Wartość abundancji
		0/9
Glutamine synthetase	<i>glnA</i>	0,422
Major outer membrane lipoprotein Lpp	<i>lppI</i>	0,486
Nucleoside-specific channel-forming protein Tsx	<i>tsx</i>	0,482
Outer membrane porin C	<i>ompC</i>	0,472
Outer membrane protein W	<i>ompW</i>	0,279
PTS system glucose-specific EIIA component	<i>crr</i>	1,381
Maltose/maltodextrin-binding periplasmic protein	<i>malE</i>	1,548
Outer membrane porin protein OmpD	<i>ompD</i>	1,306
ATP synthase subunit alpha	<i>atpA</i>	1,978
Multiphosphoryl transfer protein	<i>fruB</i>	1,494
ATP synthase subunit delta	<i>atpH</i>	1,519
PTS system mannose-specific EIIC component	<i>manY</i>	1,344
Signal recognition particle receptor FtsY	<i>ftsY</i>	1,959
Lipoprotein PrgK	<i>prgK</i>	1,361
Protein translocase subunit SecA	<i>secA</i>	1,832
FAD:protein FMN transferase	<i>apbE</i>	1,487
Glycerol-3-phosphate acyltransferase	<i>plsB</i>	1,441

Na podstawie uzyskanych danych proteomicznych wytypowano białko OmpD, które występowało w większej ilości u szczepu *S. diarizonae* PCM 2511 po 9 pasażach w 50% surowicy ludzkiej w stosunku do szczepu dzikiego, w celu konstrukcji mutantu pozbawionego zdolności produkcji tego białka. Do konstrukcji mutantu białkowego wykorzystano szczep *S. Typhimurium* PCM 2255 oraz system hiper-rekombinacji  $\lambda$  Red. W celu konstrukcji mutantów bakteryjnych w pierwszej kolejności szczep dziki *S. Typhimurium* PCM 2255 transformowano plazmidem pKD46 w celu otrzymania szczepu zdolnego do indukcji hiper-rekombinacji  $\lambda$  Red. Po selekcji szczepu pKD46 pozytywnego, następowała transformacja liniowym fragmentem DNA, której celem było usunięcie genu docelowego *ompD* (metoda 7.5; 7.11). Do doświadczeń użyto DNA plazmidowego wyizolowanego z czystych hodowli szczepów bakteryjnych *E. coli* BW25113 (pKD46), BT340 (pCP20) oraz BW25141(pKD4) użytego we wcześniejszych doświadczeniach. Komórki elektrokompetentne *S. Typhimurium* PCM 2255 transformowano plazmidem pKD46. Potwierdzono obecność plazmidu pKD46 u 2 testowanych kolonii bakteryjnych (rycina 47). Wielkość produktu PCR po amplifikacji fragmentu kodującego kasetę termowrażliwości plazmidu pKD46 z wykorzystaniem starterów repA101tsFW i repA101tsRV wynosi 618 pz (kontrola). Do dalszych eksperymentów wybrano jednego transformanta, który w dalszej części pracy będzie oznaczony jako *S. Typhimurium* PCM 2255/pKD46.



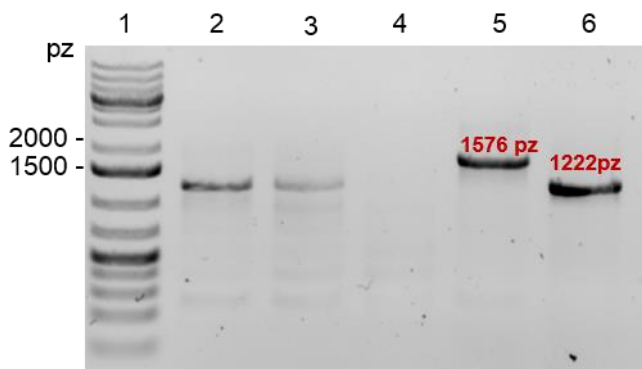
Rycina 47. Elektroforeza w żelu agarozowym potwierdzająca prawidłową transformację szczepu *S. Typhimurium* PCM 2255 plazmidem pKD46.

Rozdział zamplifikowanego produktu PCR utworzony na matrycy plazmidu pKD4, którym transformowano szczep *S. Typhimurium* PCM 2255/pKD46 przedstawiono na rycinie 48. Stężenie otrzymanego produktu PCR dla genu *ompD* po oczyszczeniu wynosiło 355,14 ng/μl ( $A_{260}/A_{280}=1,97$ ).



Rycina 48. Elektroforeza w żelu agarozowym zamplifikowanego produktu PCR do transformacji *S. Typhimurium* PCM 2255/pKD46.

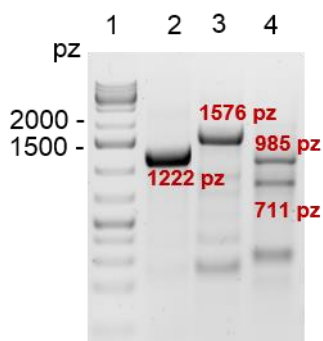
Komórki elektrokompetentne *S. Typhimurium* PCM 2255/pKD46 transformowano przygotowanym produktem PCR dla genu *ompD*. Selekcję pozytywnych kolonii dla mutantu  $\Delta ompD::kan$  przedstawiono na rycinie 48. U 1 z 4 testowanych kolonii kasetę kanamycynowa wbudowała się w miejsce genu docelowego *ompD* (rycina 49, ścieżka 5). Wielkość produktu PCR po amplifikacji dla genu *ompD* wynosi 1222 pz (kontrola). Mutant  $\Delta ompD::kan$  posiada kasetę oporności na kanamycynę w miejscu genu *ompD*. Wielkość produktu PCR dla mutantu  $\Delta ompD::kan$  wynosi 1576 pz. Do dalszych eksperymentów wybrano jednego transformanta, który w dalszej części pracy będzie oznaczony jako *S. Typhimurium* PCM 2255  $\Delta ompD::kan$  ( $\Delta ompD::kan$ ).



1 - marker masy  
 2-5 - sprawdzane kolonie  
 6 - *S. Typhimurium* PCM 2255 WT

Rycina 49. Selekcja pozytywnych klonów *S. Typhimurium* PCM 2255  $\Delta ompD::kan$ .

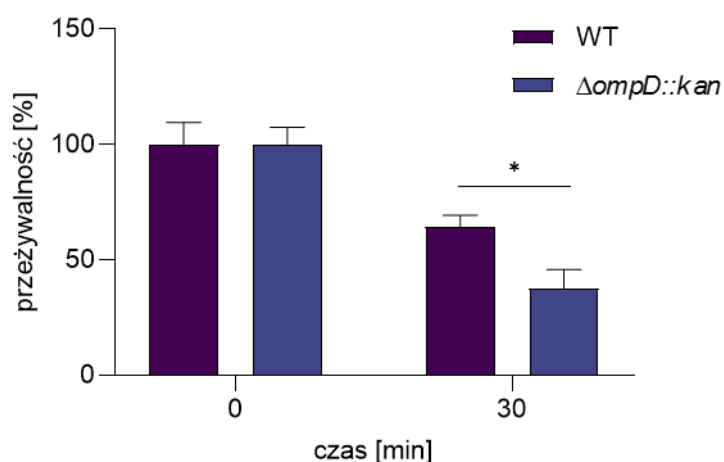
Poprawność zajścia mutacji potwierdzono za pomocą trawienia enzymem restrykcyjnym PstI. W wyniku trawienia enzymem PstI dla mutantu  $\Delta ompD::kan$  otrzymano 2 prążki o wielkości 985 oraz 711 pz (rycina 50). W wyniku trawienia produktu PCR otrzymanego na matrycy szczepu dzikiego otrzymano jeden prążek o wielkości 1222 pz.



1 - marker masy  
 2- *S. Typhimurium* PCM 2255 WT PstI  
 3 -  $\Delta ompD::kan$   
 4 -  $\Delta ompD::kan$  PstI

Rycina 50. Trawienie enzymem PstI produktów PCR dla szczepu *S. Typhimurium* PCM 2255  $\Delta ompD::kan$ .

W celu określenia, czy wytypowane białko OmpD wpływa na przeżywalność bakterii *Salmonella* w surowicy, otrzymany mutant *S. Typhimurium* PCM 2255  $\Delta ompD::kan$  poddano testowi bakteriobójczego działania 50% NSL w ciągu 30 minut inkubacji (metoda 8.5.1). Przeżywalność badanych szczepów w 50% NSL przedstawiono na rycinie 51. Po 30 minutach inkubacji w 50% NSL przeżywalność szczepu dzikiego *S. Typhimurium* PCM 2255 spadła do 65% podczas gdy przeżywalność szczepów  $\Delta ompD::kan$  spadła do 38% (tabela 32).



Rycina 51. Przeżywalność *S. Typhimurium* PCM 2255  $\Delta ompD::kan$  w 50% NSL

Tabela 32. Przeżywalność badanych szczepów *S. Typhimurium* PCM 2255 w czasie 30 minut inkubacji w 50% NSL.

Bakteriobójcza aktywność 50% NSL				
<i>S. Typhimurium</i> PCM 2255	CFU/ml		Przeżywalność komórek [%]	
	T <sub>0</sub>	T <sub>30</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>30</sub>
WT	$7,48 \times 10^6 \pm 1,17 \times 10^6$	$4,78 \times 10^6 \pm 5,62 \times 10^5$	$100 \pm 9$	$65 \pm 5$
$\Delta ompD::kan$	$7,25 \times 10^6 \pm 5,48 \times 10^5$	$2,71 \times 10^6 \pm 5,68 \times 10^5$	$100 \pm 8$	$38 \pm 8$



## 9. DYSKUSJA

Bakterie z rodzaju *Salmonella* są odzwierzęcym patogenem o poważnym znaczeniu dla zdrowia ludzi i zwierząt na całym świecie. Według Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (ang. European Food Safety Authority, EFSA) oraz Europejskiego Centrum ds. Zapobiegania i Kontroli Chorób (ang. European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC) salmonelloza pozostaje drugą, najczęściej zgłaszaną infekcją przewodu pokarmowego u ludzi po kamylobakteriozie. W 2018 roku w Unii Europejskiej bakterie *Salmonella* były przyczyną blisko jednej trzeciej ognisk chorób przenoszonych przez żywność. Słowacja, Hiszpania i Polska były odpowiedzialne za 67% wszystkich ognisk salmonellozy w UE [30]. W Polsce liczba zachorowań wywołanych bakteriami *Salmonella* w ostatnich latach utrzymuje się na poziomie około 9,5 tys. przypadków rocznie (Tabela 2). Jednym z głównych źródeł zakażeń są jaja i drób, w którego produkcji Polska zajmuje czołowe miejsce w UE. Salmonellozy wywołują ogromne straty w rolnictwie i hodowli zwierząt, prowadząc do znacznego obniżenia jakości produktów spożywczych oraz dużych strat materialnych, dlatego też kraje UE wprowadzają krajowe programy zwalczania salmonelloz, które kładą nacisk na poprawę profilaktyki, bioasekuracji oraz eliminacji bakterii *Salmonella* bezpośrednio u źródła zakażenia [166].

Bakterie *Salmonella* charakteryzują się wysoką wirulencją i prowadzą, obok zatruc pokarmowych, również do zakażeń pozajelitowych oraz posocznicy. W Polsce odsetek hospitalizacji dla pacjentów zakażonych bakteriami *Salmonella* wynosi ok. 70% wszystkich stwierdzonych przypadków [25,167–170]. Należy podkreślić, że liczba przypadków zakażeń wywołanych bakteriami *Salmonella* jest najprawdopodobniej wysoce niedoszacowana ze względu na krótki i łagodny przebieg choroby oraz częsty brak hospitalizacji.

Szereg cech predysponuje bakterie *Salmonella* do przeżywania w środowisku surowicy ludzkiej. Istotnym aspektem w procesie ich wirulencji jest generowanie przez nie zmian w strukturach powierzchniowych. Modulacja struktur prowadzi do unikania przez bakterie odpowiedzi ze strony układu immunologicznego człowieka oraz umożliwia bakterii przetrwanie i namnożenie w skrajnie niekorzystnym środowisku. Zjawisko oporności na czynniki bakteriobójcze obecne w surowicy ssaków, występujące wśród bakterii *Salmonella*, jest uwarunkowane kilkoma czynnikami m.in. zmienną długością łańcucha O-swoistego LPS, posiadaniem polisacharydowych otoczek lub fimbrii lub obecnością specyficznych białek błony zewnętrznej. Ze względu na wysoką wirulencję, duże zagrożenie epidemiologiczne oraz wysokie straty materialne związane z rozprzestrzenianiem ognisk salmonellozy, istotne dla

zdrowia publicznego wydaje się być badanie mechanizmów patogenezy oraz funkcji struktur powierzchniowych bakterii *Salmonella* w kontekście mechanizmów ich patogenności.

Jednym z głównych elementów osłon powierzchniowych bakterii Gram-ujemnych, odgrywającym istotną rolę w procesie patogenezy jest LPS [49]. W literaturze opisywanych jest wiele przykładów doświadczeń, w których bakterie *Salmonella* o różnej długości cząsteczki LPS są badane pod kątem oporności na surowicę ludzką. Pawlak i wsp. wykazali, że bakterie *Salmonella* O48 po przedłużonym kontakcie z surowicą nabywają na nią oporność, a zmiana kompozycji łańcuchów O-swoistych na powierzchni komórki bakteryjnej odgrywa znaczącą rolę w tym zjawisku [5]. Również w ramach badań opisanych w niniejszej pracy doktorskiej, w celu otrzymania wariantów szczepu, wyraźnie różniącego się rozkładem typów długościowych LPS (VL-OAg, L-OAg, LMW-OAg) na powierzchni komórki bakteryjnej, dziewięciokrotnie pasażowano szczep *S. diarizonae* PCM 2511 w surowicy ludzkiej. Wykazano, że przeżywalność szczepu *S. diarizonae* PCM 2511 wzrasta pod wpływem przedłużonej presji czynników bakteriobójczych surowicy (rycina 10, tabela 11). Analiza średniej długości cząsteczek lipopolisacharydów, poprzez pomiary proporcji składnika polisacharydu O-swoistego: NeuAc do składnika rdzenia LPS: Kdo (rycina 11) oraz rozkładu proporcji poszczególnych form LPS poprzez rozdział SDS-PAGE cząsteczek LPS wyizolowanych z bakterii po pasażach (rycina 12), nie potwierdziły założonej hipotezy, że długoterminowa presja selekcyjna surowicy może wyodrębnić szczepy różniące się istotnie proporcjami typów długościowych LPS na powierzchni komórki bakteryjnej. W celu bardziej szczegółowej analizy roli różnych typów LPS w mechanizmach patogenności bakterii *Salmonella* skonstruowano mutanty delecyjne, różniące się długością części O-swoistej LPS. Podjęto próby stworzenia mutantów szczepów, różniących się rozkładem typów długościowych LPS, jednak dla żadnego z testowanych szczepów bakterii *Salmonella* O48, pomimo licznych prób, nie udało się otrzymać ani jednego mutantu. Być może napotkane problemy związane są z obecnością kwasu sjałowego w strukturze antygeny O-swoistego, nadającego powierzchni komórki silny ujemny ładunek netto, co z kolei może wpływać na niską efektywność transformacji produktami PCR badanych szczepów.

Większość opublikowanych badań dotyczących udziału LPS w zjawisku generowania oporności na surowicę ludzką u *Salmonella* dotyczyła szczepów *S. Typhimurium* i *S. Minnesota* oraz roli różnych chemotypów LPS w tym zjawisku [112–114,116,117]. Z kolei badania dotyczące wpływu długości części O-swoistej LPS na przeżywalność szczepów w środowisku surowicy koncentrowały się głównie na szczepach *S. Typhimurium* [65,122–125]. Murray i wsp. wykazali, że obecność któregośkolwiek z genów *wzz* lub *fepE* jest wystarczająca

do zapewnienia bakteriom *S. Typhimurium* oporności na działanie układu dopełniacza i zjadliwości w mysim modelu zakażenia. Mutanty z wyłączonym genem *wzz* lub *fepE* nie wykazały wzrostu wrażliwości na działanie 10% surowicy świniki morskiej w porównaniu ze szczepem dzikim, natomiast mutant delecyjny z wyłączonymi genami *wzz* i *fepE* był wysoce podatny na działanie surowicy [65]. W późniejszych badaniach wykazano, że szczep dziki *S. Typhimurium* C5 oraz szczep z wyłączonym genem *fepE* charakteryzował się przeżywalnością na poziomie powyżej 100%. Mutacja w genie *wzz* obniżyła przeżywalność szczepu w 10% surowicy świniki morskiej do poziomu 7% po 2 godzinach inkubacji w stosunku do szczepu dzikiego. Z kolei mutant  $\Delta fepE \Delta wzz$  charakteryzował się przeżywalnością na poziomie 0,3% [125]. Należy podkreślić, że porównanie poszczególnych wyników uzyskanych podczas eksperymentów i brak określenia jednoznacznej roli genów *wzz* i *fepE* w mechanizmach przeżywania w surowicy bakterii *S. Typhimurium* jest utrudnione z uwagi na odmienne procedury eksperymentów m.in. różnice w startowym inokulum bakteryjnym oraz różnice w czasie inkubacji z surowicą [65,125]. Bravo i wsp. w swojej pracy również porównali przeżywalność szczepów dzikich oraz mutantów  $\Delta wzz$  oraz  $\Delta fepE$  szczepów *S. Typhimurium* w 20% surowicy ludzkiej w zależności od fazy wzrostu. Szczep *S. Typhimurium* LT2 oraz jego mutant z wyłączonym genem *wzz* charakteryzował się przeżywalnością na poziomie około 70% po 20 minutach inkubacji w 20% surowicy ludzkiej, niezależnie od fazy wzrostu. Z kolei mutant z wyłączonym genem *fepE* charakteryzował się przeżywalnością w surowicy na poziomie 30% w fazie stacjonarnej i brakiem przeżywalności po 20 minutach inkubacji w 20% surowicy ludzkiej w fazie logarytmicznej. Uzyskane przez Bravo i wsp. wyniki wskazują na istotny udział bardzo długich łańcuchów O-swoistych w ochronie bakterii *S. Typhimurium* przed litycznym działaniem układu dopełniacza. Otrzymane przez Bravo i wsp. dane są sprzeczne z wynikami Murray i wsp. [125], które wskazywały, że kluczowym genem chroniącym serowar *Typhimurium* przed działaniem układu dopełniacza jest gen *wzz*, podczas gdy gen *fepE* w niewielkim stopniu zapewniał bakterii ochronę przed litycznym działaniem układu dopełniacza.

W związku z niejednoznacznymi danymi literaturowymi, w niniejszej pracy doktorskiej podjęto próbę określenia roli długości części O-swoistej lipopolisacharydu u bakterii *S. Enteritidis* w mechanizmach unikania odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Realizowana praca doktorska stanowi część projektu PRELUDIUM 13 pt. „Udział składników błony zewnętrznej szczepów *Salmonella* Enteritidis w generowaniu oporności wobec wrodzonej odpowiedzi immunologicznej gospodarza” (2017/25/N/NZ6/02295) finansowanego z Narodowego Centrum Nauki. Wybór do badań serowaru Enteritidis podyktowany był

problemami przy konstrukcji mutantów delecyjnych z wykorzystaniem bakterii z grupy serologicznej O48, lecz także faktem, że serowar *Enteritidis* należy do najczęściej izolowanych serowarów w praktyce klinicznej w Polsce, stąd niezwykle ważne jest poznawanie i charakterystyka mechanizmów wirulencji właśnie tych bakterii [22,24,30]. W celu bardziej wnikliwej analizy roli VL-OAg, L-OAg oraz LMW-OAg w mechanizmach patogenności bakterii *S. Enteritidis* skonstruowano mutanty delecyjne o skróconej długości części O-swoistej LPS.

Należy podkreślić, że pomiar długości cząsteczek lipopolisacharydu jest trudny ze względu na dużą zmienność strukturalną cząsteczek, istnienie równocześnie kilku typów długościowych LPS w jednej komórce bakteryjnej, tendencję do tworzenia przez cząsteczki LPS agregatów o różnych rozmiarach oraz niejednorodność w uzyskiwanych eksperymentalnie preparatach LPS. W celu lepszej charakterystyki utworzonych mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817 o skróconej długości części O-swoistej LPS ( $\Delta fepE$ ,  $\Delta wzz$ ,  $\Delta fepE \Delta wzz$ ,  $\Delta wzy$ , rycina 23) wykorzystano metodę oceny średniej długości cząsteczek lipopolisacharydu, występujących w danym szczepie bakteryjnym, z wykorzystaniem techniki GLC-MS. Istotą stosowanej metody jest analiza w badanym preparacie proporcji między ilością składnika cukrowego, występującego w powtarzających się podjednostkach części O-swoistej (składnik zależny od długości), a jednym ze składników rdzenia LPS (składnik niezależny od długości). Powyższe podejście stosowano wcześniej dla LPS *E. coli* O111, gdzie mierzono kolorymetrycznie proporcję zawartości kolitozy do Kdo oraz stosując technikę GLC-MS do pomiaru proporcji NeuAc do Kdo w LPS bakterii z grupy *Salmonella* O48 [5,59,171]. W niniejszej pracy oznaczano ilościowo markery chemiczne części O-swoistej: ramnozę oraz tywelozę oraz składniki rdzenia LPS: Kdo i heptozę. Ramnoza występuje powszechnie w świecie bakterii jako składnik antygeny O [172–174], rzęsek oraz fimbrii [175,176]. Z kolei tyweloza występuje tylko u niektórych serowarów *Yersinia pseudotuberculosis* [177], *Y. entomophaga* [178], *S. Enteritidis* oraz *S. Typhi* [173]. Tyweloza jest również składnikiem immunogennej glikoproteiny TSL-1 *Trichinella spiralis* [179]. Małe rozpowszechnienie tywelozy jako składnika strukturalnego w świecie bakterii czyni z niej niewątpliwie interesujący marker chemiczny do szybkiej detekcji bakterii *S. Enteritidis*. Wyniki pomiarów średniej długości części O-swoistej LPS (rycina 29, 30) wykazały, że opracowana metoda może służyć do porównywania szczepów pod względem długości cząsteczek lipopolisacharydu. Różnice w wynikach uzyskanych z pomiaru proporcji markerów cukrowych w całej masie bakteryjnej (rycina 29) oraz w izolowanych preparatach LPS (rycina 30) dla szczepu dzikiego oraz szczepu  $\Delta fepE$  mogą wynikać z zastosowanej metody izolacji cząsteczek LPS. Wykorzystane do

pomiarów preparaty LPS wyizolowano klasyczną metodą wodno-fenolową, która jest zalecana do izolacji LPS ze szczepów gładkich [180]. W celu dodatkowej weryfikacji wyników należałoby wyizolować LPS z badanych mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817 za pomocą metody PCP, zalecanej dla szczepów szorstkich, wykorzystującej eter naftowy, chloroform oraz fenol [181].

Przedstawiona metoda opiera się na jednoczesnej analizie w jednej próbce pięciu markerów cukrowych: Rha, Tyv, Hep, Kdo, MuAc. Uwzględnienie w analizie kwasu muraminowego pozwala dodatkowo na porównanie proporcji ogólnej liczby cząsteczek lipopolisacharydu w komórce pomiędzy poszczególnymi szczepami, przy założeniu, że ilość muraminy w komórce jest stała. Analizowane markery znacznie różnią się od siebie właściwościami chemicznymi: wrażliwością na degradację oraz podatnością na lizę tworzonych wiązań w cząsteczce LPS. Tyweloza i Kdo są łatwo uwalniane podczas reakcji metanolizy, jednak ich metyloglikozydy są wrażliwe na kwaśną degradację, z kolei wydajne uwalnianie MuAc z peptydoglikanu wymaga dłuższej metanolizy w wyższym stężeniu HCl, dodatkowo grupy estrowe w pochodnych MuAc i Kdo są wrażliwe na podwyższone pH, co uniemożliwia powtarzalne zobojętnianie mieszaniny po reakcji.

Opracowana metoda może w przyszłości stanowić podstawę do bardziej szczegółowej analizy proporcji różnych typów LPS (VL-OAg, L-OAg, LMW-OAg) na powierzchni komórki bakteryjnej. Dotychczasowa wiedza w tym zakresie jest niejednoznaczna. Palva i Mäkälä wykazali, że rozkład LPS na powierzchni komórki bakteryjnej *S. Typhimurium* charakteryzuje się niewielką zawartością cząsteczek z 2-18 powtarzającymi się podjednostkami O-swoistymi (LMW-OAg) oraz przeważającą ilością (77%) LPS z 19-34 powtarzającymi się podjednostkami (L-OAg) [182]. Warto zauważyć, że w czasie opublikowania tej pracy nie znano jeszcze formy VL-OAg LPS oraz genu *fepE* odpowiedzialnego za jej tworzenie. Pomimo obecności w elektroforegramach prążków wskazujących na bardzo-długie łańcuchy O-swoiste, autorzy nie wspominają o możliwości występowania LPS z ponad 100 powtarzającymi się podjednostkami O-swoistymi.

W licznych badaniach wykazano, że proporcje poszczególnych form długościowych cząsteczek LPS (tzw. rozkład modalny) na powierzchni komórki bakteryjnej mają istotny wpływ na ochronę przed działaniem układu dopełniacza [7,65,124–126]. Stąd w badaniach prowadzonych w niniejszej pracy określono wpływ długości części O-swoistej LPS bakterii *S. Enteritidis* PCM 2817 na interakcje z układem dopełniacza poprzez: analizę przeżywalności w surowicy ludzkiej uzyskanych mutantów, określenie poziomu aktywacji układu dopełniacza oraz analizę wiązania składników dopełniacza do całych komórek bakteryjnych i/lub

izolowanych typów LPS. Analizę poziomu przeżywalności badanych mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817 przeprowadzono w trzech rodzajach surowicy: w normalnej surowicy ludzkiej, w surowicy ludzkiej z aktywną drogą alternatywną układu dopełniacza oraz w surowicy z aktywną drogą klasyczną i lektynową (tabela 12). Najwyższym poziomem przeżywalności po 120 minutach inkubacji w NSL charakteryzował się szczep  $\Delta$ *fepE* (47%). Dla porównania szczep dziki charakteryzował się przeżywalnością na poziomie 24% a pozostałe mutanty długościowe LPS nie wykazywały wzrostu po 120 minutach inkubacji z NSL (rycina 32, tabela 14). Uzyskany wynik wskazuje na mały udział VL-OAg w ochronie bakterii *S. Enteritidis* przez litycznym działaniem układu dopełniacza, wskazując jednocześnie na duże znaczenie L-OAg. Bravo i wsp., badając przeżywalność mutantów długościowych LPS *S. Enteritidis* PT4 i Di62 w 40% NSL również wykazali, że mutacja w genie *wzz* wpływa na spadek przeżywalności badanych szczepów w surowicy niezależnie od fazy wzrostu. Natomiast mutacja w genie *fepE* tylko w niewielkim stopniu warunkuje oporność na działanie surowicy [7]. Autorzy wykazali również, że szczep  $\Delta$ *fepE* charakteryzował się podobnym poziomem oporności na działanie 40% NSL w fazie stacjonarnej, natomiast był wrażliwy na działanie surowicy w fazie wzrostu logarytmicznego [126]. Natomiast w badaniach przedstawionych w pracy, szczep z wyłączonym genem *fepE* charakteryzował się wyższym poziomem przeżywalności w stosunku do szczepu dzikiego w fazie wzrostu logarytmicznego. Badano również przeżywalność mutantów *S. Enteritidis* w surowicy z aktywną drogą klasyczną i lektynową układu dopełniacza. Wszystkie badane szczepy namnażały się po 60 minutach inkubacji w NSL/KL, wskazując na główny udział drogi alternatywnej w mechanizmach litycznego działania układu dopełniacza względem testowanych bakterii *S. Enteritidis* (rycina 33, tabela 15). Z kolei wyniki uzyskane dla testu z wykorzystaniem surowicy NSL/A są bardzo podobne dla wyników uzyskanych w teście z wykorzystaniem NSL, co dodatkowo potwierdza główny udział drogi alternatywnej w litycznym działaniu układu dopełniacza względem testowanych szczepów (rycina 34, tabela 16) oraz znaczenie L-OAg w tym procesie. Dane literaturowe na temat *S. Typhimurium* początkowo wskazywały na większy udział genu *fepE* a zatem VL-OAg w mechanizmach chroniących bakterię przed litycznym działaniem układu dopełniacza [125], jednak uzyskane w późniejszych eksperymentach wyniki wskazują, że to gen *wzz* ma zasadnicze znaczenie dla oporności bakterii na surowicę ludzką [7,124].

Analiza aktywacji układu dopełniacza przez całe komórki bakteryjne oraz przez izolowane preparaty LPS wykazała, że mutant  $\Delta$ *fepE* charakteryzuje się największą zdolnością do aktywacji układu dopełniacza w porównaniu do szczepu dzikiego. Wraz ze skracaniem długości części O-swoistej LPS następuje spadek aktywacji układu dopełniacza (rycina 36, 37) przez

badane mutanty. Zestawiając powyższe wyniki z wynikami uzyskanymi podczas testu bakteriobójczego działania surowicy ludzkiej można wnioskować, że mutant  $\Delta fepE$  deponuje końcowe produkty kaskady układu dopełniacza na swojej powierzchni, jednak kompleks C5b-9 jest uwalniany z powierzchni komórki, nie doprowadzając do lizy komórki bakteryjnej. Do podobnych wniosków doszli Joiner i wsp., badając mechanizm oporności na działanie surowicy ludzkiej u szczepów gładkich i szorstkich *S. Minnesota*. Autorzy wykazali, że u szczepów opornych na działanie surowicy składniki dopełniacza są odkładane na części polisacharydowej LPS, która tworzy fizyczną barierę oddzielającą je od lipidowej części błony komórkowej [113,114]. Do analizy powyższych danych przydatna byłaby wiedza o proporcjach pomiędzy poszczególnymi typami LPS u poszczególnych mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817. Jeżeli mutacja w genie  $\Delta fepE$  wpływa w większym stopniu na aktywację układu dopełniacza niż mutacja w genie  $\Delta wz$ , można postulować, że kluczowe znaczenie w ochronie bakterii *S. Enteritidis* przed litycznym działaniem układu dopełniacza ma odpowiednia gęstość LPS o długich łańcuchach O-swoistych na powierzchni błony zewnętrznej. Najprawdopodobniej większa gęstość L-OAg LPS mutantu  $\Delta fepE$  stanowi ochronę przed wbudowywaniem kompleksu MAC w błonę komórki bakteryjnej, podczas gdy w przypadku mutantu  $\Delta wz$ , gęstość VL-OAg LPS jest najprawdopodobniej niewystarczająca do ochrony bakterii przed wbudowywaniem C5b-9 w błonę zewnętrzną. Znaczenie L-OAg w mechanizmach ochronnych bakterii *S. Enteritidis* przed litycznym działaniem układu dopełniacza potwierdzono dodatkowo w teście wiązania składnika C3 oraz C9. Zarówno analiza wiązania składnika C3 do izolowanych typów LPS (rycina 39) jak i C9 do całych komórek bakteryjnych (rycina 41) wykazała, że spośród mutantów szczep  $\Delta fepE$  wiąże białka dopełniacza najefektywniej w porównaniu do szczepu dzikiego. Również analiza rozkładu składnika C3 w surowicy po inkubacji z badanymi szczepami *S. Enteritidis* PCM 2817 wykazała, że mutanty z dłuższym repertuarem łańcuchów O-swoistych na powierzchni komórki bakteryjnej (WT,  $\Delta fepE$ ,  $\Delta wz$ ) efektywniej rozkładają białko C3 układu dopełniacza (rycina 40).

Ze względu na ograniczony dostęp modeli badawczych, wiele badań dotyczących roli długości LPS w mechanizmach unikania przez bakterie odpowiedzi ze strony układu immunologicznego gospodarza koncentrowała się na dostępnych chemotypach bakterii *Salmonella* [112–115], w związku z tym w testach często porównywano ze sobą szczep będący mutantem części rdzeniowej LPS (np. chemotyp Ra, Rb) ze szczepem określanym jako gładki, bez charakterystyki typów długościowych LPS występujących na powierzchni komórki bakteryjnej. Ramu i wsp. wykazali, że proteaza PgtE zwiększa oporność bakterii *Salmonella* na surowicę poprzez rozkład białek dopełniacza C3b, C4b oraz C5 [183]. Ze względu na fakt, iż

białko PgtE do pełnej aktywności wymaga szorstkiego typu LPS [184], Ramu i wsp. testowali zdolność białka PgtE do rozkładu składników dopełniacza u szczepu gładkiego *S. Typhimurium* 14028 oraz jego szorstkiego mutantu LPS (14028R). Autorzy wykazali, że u szczepu z szorstkim typem LPS następuje rozkład składników C3b, C4b oraz C5, natomiast szczep wytwarzający gładki LPS nie wykazywał aktywności proteolitycznej [183]. W niniejszej pracy doktorskiej analizowano wpływ długości części O-swoistej badanych mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817 na proteolityczną aktywność białka PgtE względem C3b układu dopełniacza. Wykazano, że szczep o fenotypie SR oraz mutanty  $\Delta wzz$  oraz  $\Delta fepE \Delta wzz$  mają proteolityczną aktywność względem białka C3b (rycina 42). Można więc stwierdzić, że również szczep posiadający jedną podjednostkę O-swoistą oraz szczep posiadający LMW-OAg może wykazywać aktywność proteolityczną względem składników układu dopełniacza. Najbardziej zaskakujący jest wynik pokazujący rozkład składnika C3b przez szczep  $\Delta wzz$ , którego LPS charakteryzuje się obecnością LMW-OAg oraz VL-OAg. Prawdopodobnie ilość VL-OAg na powierzchni komórki jest niewystarczająca do maskowania aktywności białka PgtE. W przeciwieństwie do szczepu  $\Delta wzz$ , szczep  $\Delta fepE$  nie wykazywał aktywności proteolitycznej względem białka C3b. Być może ilość L-OAg, przy wyłączeniu VL-OAg jest wystarczająca, aby hamować aktywność białka PgtE. Uzyskane wyniki potwierdzają jak istotne jest charakteryzowanie typów LPS występujących na powierzchni komórki bakteryjnej ze względu na procesy biologiczne i mechanizmy, w które mogą być pośrednio lub bezpośrednio zaangażowane.

Przetwarzanie i prezentacja antygenów mają kluczowe znaczenie dla rozwoju humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Prezentacja antygeny obejmuje wychwyty antygeny przez komórki prezentujące antygen - APC (ang. antigen presenting cells), do których można zaliczyć m.in. makrofagi oraz komórki dendrytyczne. Komórki APC degradują cząsteczki antygeny białkowego do peptydów, które mogą następnie łączyć się z cząsteczkami głównego układu zgodności tkankowej (ang. major histocompatibility complex – MHC) klasy I lub II. Rozpoznanie kompleksu peptyd-MHC, przy udziale cząsteczek kostymulujących prowadzi do aktywacji limfocytów T CD4+ lub CD8+ i do dalszych etapów odpowiedzi immunologicznej [185]. Wykazano, że na mechanizm procesowania i prezentacji antygenów bakteryjnych komórkom wpływa m.in. żywotność bakterii, dostępność epitopów oraz rodzaj LPS prezentowany na powierzchni komórki bakteryjnej [186]. W niniejszej pracy doktorskiej oceniono wpływ długości części O-swoistej LPS na pochłanianie badanych mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817 przez komórki ssacze. Ze względu na właściwości i charakterystykę do testu wybrano trzy różne linie komórkowe (makrofagi RAW 264.7,



komórki dendrytyczne JAWS II oraz komórki ludzkiego gruczołka okrężnicy Caco-2). Makrofagi charakteryzują się bardzo dobrymi właściwościami fagocytującymi i stanowią pierwszą linię obrony organizmu. Komórki dendrytyczne zaliczane są do najefektywniejszych komórek APC. Z kolei komórki Caco-2 wykazują podobieństwo do ludzkich enterocytów, mają zdolność do tworzenia systemu mikrokosmków na powierzchni komórki oraz produkują specyficzne enzymy, dzięki czemu imitują warunki *in vivo* przewodu pokarmowego [187]. Uzyskane wyniki nie wykazały zależności pomiędzy długością części O-swoistej LPS bakterii *S. Enteritidis* PCM 2817 a stopniem pochłaniania przez komórki JAWS II i Caco-2 (rycina 43, 44). Natomiast w przypadku pochłaniania przez komórki RAW 264.7 wykazano, że wzrost liczby pochłanianych bakterii następuje wraz ze skracaniem długości części O-swoistej ich LPS (rycina 45). Zaprezentowane wyniki pokrywają się z wynikami Murray i wsp., którzy wykazali że u *S. Typhimurium* bardzo długie łańcuchy O-swoiste hamują pochłanianie przez makrofagi [124]. Wzrost ilości pochłanianych bakterii dla szczepów ze skróconą długością części O-swoistej LPS może być związany z eksponowaniem na powierzchni komórki bakteryjnej innych ligandów dla komórek fagocytarnych, jak w przypadku szorstkiego szczepu *E. coli* K12 [188].

Doświadczenia *in vivo* z zastosowaniem zwierząt laboratoryjnych wydają się być niezbędnym elementem przy określaniu stopnia patogenności szczepów bakteryjnych w celu zrozumienia interakcji zachodzących pomiędzy gospodarzem a patogenem. Infekcja organizmu myszy bakteriami *S. Typhimurium* stanowi od lat model badawczy dla duru brzuszego i zapalenia jelita grubego [189,190]. Pomimo iż zastosowanie zwierząt laboratoryjnych pomaga w zrozumieniu patogenezy zakażeń bakteriami *Salmonella*, badania z wykorzystaniem ssaków są często czasochłonne i wymagają kosztownej konfiguracji eksperymentalnej oraz laboratorium odpowiedniej klasy. Ponadto zastosowanie tego typu modeli badawczych wiąże się z istotnymi problemami natury etycznej. Wprowadzenie do badań nad patogennością szczepów bakteryjnych modeli wykorzystujących bezkręgowce pozwala na zmniejszenie kosztów badań oraz minimalizację problemów etycznych. W ramach badań opisanych w niniejszej pracy doktorskiej do określania patogenności *in vivo* badanych szczepów i mutantów *Salmonella* ze zróżnicowaną długością części O-swoistej LPS wykorzystano larwy *Galleria mellonella*. W licznych badaniach potwierdzono, że larwy barciaka większego stanowią dogodny model badawczy do określania stopnia patogenności szczepów bakteryjnych [191–196]. Wybór tego modelu jest podyktowany pewnym podobieństwem odpowiedzi immunologicznej larw do mechanizmów odpornościowych ssaków. Wśród mechanizmów obronnych larw można wymienić m.in. produkcję białek przeciwdrobnoustrojowych oraz

komórek o właściwościach żernych [197,198]. Model larw *Galleria mellonella* jest powszechnie stosowany przy badaniu patogenności bakterii z rodzaju *Salmonella* [199–201]. Bender i wsp. wykazali, że larwy *Galleria mellonella* mogą stanowić alternatywny model zakażenia dla bakterii *S. Typhimurium*. Autorzy wykorzystując powyższy model badawczy wykazali, że struktura LPS wpływa na wirulencję szczepu *S. Typhimurium* NCTC 12023. Przeżywalność larw po iniekcji mutantem z wyłączoną syntezą VL-OAg i L-OAg była wyższa w porównaniu do przeżywalności larw po iniekcji szczepem dzikim [200]. Ponadto autorzy wykazali, że usunięcie całego antygeny O-swoistego jest związana z utratą zjadliwości w modelu infekcyjnym *Galleria mellonella*.

W niniejszej pracy opisano wpływ długości części O-swoistej LPS na patogenność *S. Enteritidis* w modelu barciaka większego. Uzyskane wyniki wykazały, że najwyższą zjadliwością charakteryzował się szczep dziki *S. Enteritidis* PCM 2817 oraz mutant  $\Delta fepE$ , powodując śmiertelność odpowiednio 87% i 93% populacji larw (tabela 23, rycina 46). Zahamowanie produkcji długich łańcuchów O-swoistych (mutant  $\Delta wzz$ ) oraz długich i bardzo długich łańcuchów O-swoistych (mutant  $\Delta fepE \Delta wzz$ ) obniżyło śmiertelność larw do 73%. Najniższym poziomem wirulencji charakteryzował się szczep  $\Delta wzy$ , powodując tylko 27% śmiertelności. Uzyskane wyniki potwierdzają obserwacje Bender i wsp. [200], że struktura LPS może wpływać na patogenność szczepów w modelu infekcyjnym larw *Galleria mellonella*. Ciekawą obserwacją wydaje się być fakt, że wyłączenie syntezy VL-OAg wpływa na wzrost wirulencji bakterii (wzrost śmiertelności larw w testowanym układzie badawczym), być może bakteria produkuje inne struktury na powierzchni błony zewnętrznej, które rekompensują jej brak VL-OAg.

Powyższe obserwacje tj. wzrost śmiertelności larw *G. mellonella* po infekcji szczepem z wyłączoną syntezą VL-OAg LPS ( $\Delta fepE$ ) oraz wzrost aktywności proteolitycznej białka PgtE przy skracaniu części O-swoistej LPS, wskazują na udział dodatkowych czynników w mechanizmach unikania odpowiedzi immunologicznej gospodarza przez testowane bakterie *Salmonella*. W niniejszej pracy doktorskiej sprawdzono, czy skracanie części O-swoistej LPS może wpływać na zmianę białek na powierzchni komórki bakteryjnej, które mogłyby rekompensować bakterii skrócenie części polisacharydowej LPS. W tym celu wyizolowane OMP z badanych mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817 poddano ilościowej analizie za pomocą znaczników izobarycznych z zastosowaniem techniki spektrometrii mas. Przeprowadzona analiza nie wykazała różnic w liczbie zidentyfikowanych białek pomiędzy szczepem dzikim a poszczególnymi mutantami części O-swoistej LPS. Zaobserwowano natomiast zależność pomiędzy skracaniem części O-swoistej LPS a zwiększeniem liczby białek o wyższym

poziomie abundancji w stosunku do szczepu dzikiego, sugerujące konieczność kompensacji słabszej ochrony powierzchni błony zewnętrznej poprzez łańcuchy polisacharydowe. U szczepu z wyłączoną zdolnością do syntezy VL-OAg LPS ( $\Delta_{fepE}$ ) zidentyfikowano 4 białka, u szczepu z wyłączoną zdolnością do syntezy L-OAg LPS ( $\Delta_{wzz}$ ) zidentyfikowano 11 białek, natomiast u szczepu wytwarzającego tylko LMW-OAg LPS ( $\Delta_{fepE} \Delta_{wzz}$ ) zidentyfikowano 15 białek o większym poziomie abundancji w porównaniu do szczepu dzikiego (tabela 25-27). Z kolei u szczepu charakteryzującego się jedną podjednostką O-swoistą zidentyfikowano 26 białek, które występowały w większej ilości w stosunku do szczepu dzikiego (tabela 28). Pomimo użytej do izolacji białek metody izolującej preferencyjnie białka błony zewnętrznej, wśród zidentyfikowanych białek część stanowią białka cytoplazmatyczne. Wśród białek charakteryzujących się wyższym poziomem abundancji w stosunku do szczepu dzikiego można wyróżnić m.in. białka związane z biosyntezą rzęsek (FliC, FliZ, FliG), białka związane z biosyntezą fimbrii (FocC), białka kodujące dwuskładnikowe systemy regulacyjne (PhoP, ArnA), białka związane z odpowiedzią na stres oksydacyjny (ElaB) oraz białka związane z T3SS (HrpA). U wszystkich mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817 wśród białek o wyższym poziomie abundancji w stosunku do szczepu dzikiego zidentyfikowano białko budujące włókno rzęski bakteryjnej – flagelinę (FliC). Dzięki rzęskom bakterie są w stanie reagować na bodźce chemotaktyczne oraz unikać niekorzystnego środowiska. Białko FliC stanowi dobrze scharakteryzowany aktywator odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Flagelina inicjuje silną odpowiedź zapalną poprzez wiązanie receptora TLR 5 (ang. toll like receptor, TLR) [202,203] oraz stymuluje organizm gospodarza do produkcji przeciwciał [204]. Wykazano również, że flagelina, obok endotoksyny może stanowić silny mediator ogólnoustrojowej reakcji zapalnej [205–207]. Crhanova i wsp. wykazali związek pomiędzy poziomem sekrecji białka FliC a strukturą LPS u bakterii *S. Typhimurium*. Autorzy wykazali, że głęboki mutant części rdzeniowej LPS ( $\Delta_{rfaC}$ ) nie wydzieliał białka FliC i charakteryzował się zmniejszoną liczbą rzęsek na powierzchni komórki bakteryjnej, czego konsekwencją była zmniejszona ruchliwość badanego szczepu w stosunku do szczepu dzikiego. Przeprowadzona technika Western-blot analiza poziomu flageliny oraz analiza ekspresji genów dla flageliny techniką mikromacierzy nie wykazała jednak różnic w ilości białka FliC pomiędzy badanymi szczepami [208]. Autorzy wykazali natomiast różnice w rozmieszczeniu flageliny u badanych szczepów *S. Typhimurium*, wskazując na losowe rozmieszczenie białka FliC u mutantu  $\Delta_{rfaC}$  wzdłuż błony cytoplazmatycznej oraz na wyraźne skupienie białka FliC u szczepu dzikiego w przestrzennie rozróżnianych obszarach komórki. Uzyskane przez autorów wyniki wskazują więc na wpływ rodzaju LPS na transport flageliny z komórki [208]. Należałoby poszerzyć panel

badan własnych w celu wyjaśnienia wzrostu abundancji białka FliC u badanych mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817. Być może skrócenie części O-swoistej LPS, obok mutacji w części rdzeniowej, również wpływa na rozmieszczenie białka FliC w obrębie komórki bakteryjnej. W tej pracy u trzech szczepów charakteryzujących się najkrótszym typem LPS w porównaniu do szczepu dzikiego zidentyfikowano białko należące do grupy metylowalnych białek chemotaktycznych (ang. methyl-accepting chemotaxis proteins, MCP). MCP stanowią rodzinę receptorów bakteryjnych, które wykrywają odpowiednie chemoatraktanty w środowisku. Aktywacja receptora następuje w wyniku wiązania liganda, następnie związana z receptorem kinaza fosforyluje regulator odpowiedzi i następuje ruch rzęski [209,210].

Analiza proteomu badanych mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817 o skróconej długości części O-swoistej LPS wykazała również wzrost abundancji u 3 z 4 testowanych mutantów ( $\Delta wzz$ ,  $\Delta fepE \Delta wzz$  oraz  $\Delta wzy$ ) białka opiekuńczego FocC. Geny *foc* są zaangażowane w syntezę fimbrii u *E. coli* i wykazują podobieństwo do genów *fim*, zaangażowanych w syntezę fimbrii u bakterii z rodzaju *Salmonella* [211,212]. Fimbrie mają istotne znaczenie w procesie adhezji bakterii do komórek gospodarza oraz w procesach transferu materiału genetycznego. Podobnie jak w przypadku rzęsek, również w przypadku fimbrii wykazano związek pomiędzy długością LPS a syntezą fimbrii. White i wsp. pokazali, że antygen O utrudnia tworzenie międzykomórkowych fimbrii Tafi u *S. Enteritidis* 3b [213]. Autorzy w doświadczeniach wykorzystali szczep dziki, produkujący gładki typ LPS oraz szczep z mutacją w obrębie genu *galF*, niezdolny do syntezy części O-swoistej LPS. Wyniki te wskazują na konieczność zbadania w przyszłości, czy szczepy wytwarzające LPS o różnej długości części O-swoistej LPS również mogą wpływać na mechanizmy syntezy fimbrii na powierzchni komórek *Salmonella*.

U wszystkich mutantów za wyjątkiem  $\Delta fepE \Delta wzz$  nastąpił wzrost abundancji dwufunkcyjnego białka oporności na polimyksyny ArnA. Polimyksyny zaliczane są do grupy antybiotyków peptydowych i wśród przedstawicieli tej grupy można wymienić m.in. polimyksynę B oraz kolistynę. Mechanizm działania antybiotyków peptydowych opiera się na wiązaniu do ujemnie naładowanych grup fosforanowych w LPS i wypieraniu jonów dwuwartościowych  $Ca^{2+}$  i  $Mg^{2+}$ , czego konsekwencją jest destabilizacja struktury i zmniejszona integralność błony zewnętrznej [214]. Większość zidentyfikowanych mechanizmów oporności na tę grupę antybiotyków u bakterii Gram-ujemnych obejmuje zmiany w strukturze LPS, które polegają na kowalencyjnym przyłączeniu do lipidu A cząsteczek w celu zmiany ładunku błony zewnętrznej [215]. Wśród modyfikacji LPS można wyróżnić m.in. dodanie 4-aminoarabinozy (Ara4N) lub fosfoetanolaminy do rdzenia i regionów lipidu A, acetylację antygeny O czy hydroksylację

kwasów tłuszczowych. Białko ArnA, występujące w większej ilości u badanych mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817 o skróconej długości części O-swoistej LPS, jest kluczowym enzymem zaangażowanym w proces przyłączania Ara4N do lipidu A u bakterii z rodzaju *Salmonella* [49,216]. Hölzer i wsp. wykazali, że u szczepów *S. Typhimurium* z zahamowaną zdolnością do syntezy VL-OAg i/lub L-OAg następował wzrost wrażliwości na polimyksynę w stosunku do szczepu dzikiego [123]. Antygen O stanowi więc ważny czynnik chroniący bakterie *Salmonella* przed działaniem antybiotyków peptydowych. Białko ArnA wchodzi w skład dwuskładnikowego systemu regulacyjnego PmrA-PmrB, który razem z PhoP-PhoQ stanowią główne systemy zaangażowane w regulowanie procesu wirulencji u bakterii *Salmonella*. Wykazano, że geny *wzz* oraz *fepE* są bezpośrednio regulowane przez system PmrA-PmrB [79,217]. W odpowiedzi na stesy środowiskowe następuje aktywacja regulatora PmrA oraz indukcja genu odpowiedzialnego za regulację długości części O-swoistej LPS, w konsekwencji bakteria jest w stanie modulować długość LPS i dodatkowo chronić się przed mechanizmami obronnymi gospodarza. Identyfikacja białka należącego do dwuskładnikowego systemu regulacyjnego PmrA-PmrB u badanych mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817 o skróconej długości części O swoistej LPS może stanowić przesłankę, że w wyniku wyłączenia któregoś z genów kodującego syntezę jednego typu LPS (*wzz* i/lub *fepE*), bakteria indukuje zwiększoną ekspresję drugiego genu kodującego inny typ LPS. Taki mechanizm tłumaczyłby zmiany w intensywności barwienia poszczególnych typów LPS na elektroforegramach przy porównywaniu mutantów długościowych LPS i szczepów dzikich. Mutacja w obrębie genu  $\Delta fepE$  wpływa na wzrost intensywności (zwiększenie liczby cząsteczek) w obszarze L-OAg, natomiast mutacja  $\Delta fepE \Delta wzz$  wpływa na wzrost intensywności w obszarze LMW-OAg (rycina 23). U 3 z 4 badanych mutantów ( $\Delta wzz$ ,  $\Delta fepE \Delta wzz$  oraz  $\Delta wzy$ ) nastąpił wzrost abundancji białka YidC, którego główną funkcją jest insercja białek do błony cytoplazmatycznej [218]. Price i wsp. wykazali, że delecja genu *yidC* u *E. coli* wpływa na spadek ekspresji genów odpowiedzialnych za transport LPS z cytoplazmy do przestrzeni peryplazmatycznej [219].

Podsumowując, uzyskane wyniki z analizy proteomicznej mutantów o skróconej długości części O-swoistej LPS wskazują, że zmiana w składzie lipopolisacharydów błony *S. Enteritidis* moduluje syntezę szeregu białek, będących zarówno aktywnymi składnikami osłon zewnętrznych jak i białek cytoplazmatycznych.

W niniejszej pracy doktorskiej opisano również wpływ surowicy ludzkiej na kształtowanie proteomu błony zewnętrznej bakterii. Z wcześniejszych wyników Pawlak i wsp. [7] wynika, że wystawienie szczepów *Salmonella* O48 na przedłużoną ekspozycję na surowicę ludzką wpływa

na średnią długość powstającego antygeny O. Z kolei Bugla i wsp. wykazali, że długość części O-swoistej LPS nie jest wystarczającym czynnikiem, chroniącym bakterie *Salmonella* O48 przed litycznym działaniem układu dopełniacza [171]. Przetrwanie szczepów *Salmonella* w niekorzystnych warunkach środowiska związane jest z możliwościami adaptacyjnymi tych bakterii. Obok lipopolisacharydu również białka błony zewnętrznej mogą odgrywać ważną rolę w ochronie bakterii przed bakteriobójczą aktywnością surowicy. Opierając się na wcześniejszych obserwacjach, w ramach badań prowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej sprawdzono, czy oprócz zmian w obrębie długości LPS można również zaobserwować zmiany w kompozycji białek błony zewnętrznej po poddaniu bakterii długotrwałej ekspozycji na surowicę. Dotychczas odkryto kilka białek błony zewnętrznej warunkujących oporność na działanie surowicy u szczepów *Salmonella*: TraT, Rck, PagC, PgtE [6,183,220–222]. Dudek i wsp., porównując proteomy błony zewnętrznej szczepów *S. Enteritidis* wrażliwych i opornych na działanie 75% NSL wykazali, że białko PgtE było obecne w większej ilości u szczepów opornych, podczas gdy białko OmpA występowało w większej ilości u szczepów wrażliwych na działanie surowicy ludzkiej [6]. Analizując proteom *S. diarizonae* PCM 2511 po 9 pasażach w surowicy ludzkiej, sprawdzono czy wśród zidentyfikowanych białek występują białka już opisane w literaturze jako białka zaangażowane w mechanizmy oporności bakterii *Salmonella* na surowicę. Wśród zidentyfikowanych białek zmierzone wartości abundancji dla PgtE oraz PagC, nie wykazywały istotnej różnicy pomiędzy szczepem przed oraz po 9 pasażach w 50% NSL. W analizowanym proteomie nie zidentyfikowano białek Rck oraz TraT. Ondari i wsp. badając poziom ekspresji genów *S. Typhimurium* ST313 po trzech godzinach inkubacji z surowicą również nie wykazali różnic w poziomie ekspresji genów kodujących białka Rck, TraT i PgtE. Po kontakcie bakterii z surowicą autorzy odnotowali różnice głównie w ekspresji genów zaangażowanych w wychwyty składników odżywczych, pobieranie i asymilację żelaza oraz dla genów zaangażowanych w syntezę polisacharydów zewnątrzkomórkowych [223]. Przeprowadzona analiza proteomiczna dla *S. diarizonae* PCM 2511 po 9 dniach pasażowania w surowicy wykazała wzrost abundancji 197 białek oraz spadek abundancji 20 białek w porównaniu do szczepu przed pasażowaniem. Wśród 30 białek o największym wzroście abundancji w stosunku do szczepu dzikiego zidentyfikowano m.in. białka związane z odpowiedzią na stres środowiskowy (Dps, YciF, IraP) (tabela 30). Kluczową rolę w ochronie bakterii przed stresem środowiskowym pełnią alternatywne czynniki sigma, których zadaniem polega na regulacji ekspresji regulonów, których produkty genowe mają za zadanie przystosować komórkę bakteryjną do niekorzystnych warunków środowiska. Wykazano, że białko IraP zwiększa

stabilność czynnika sigma RpoS, podczas niedoboru fosforanu i magnezu [224]. Białko Dbs zwiększa przeżywalność bakterii w warunkach niedoboru składników odżywczych, szoku cieplnym, stresie oksydacyjnym oraz nadmiernej ekspozycji na żelazo [225]. Z kolei zwiększoną ekspresję dla genów *yciF* obserwuje się u *S. Typhimurium* przy ekspozycji bakterii na środowisko żółci [226]. Ponadto wyniki badań Ray i wsp. wskazują na udział białka YciF w regulacji poryn błony zewnętrznej i przepuszczalności komórki [226].

Wśród białek o wyższym poziomie abundancji po 9 pasażach w 50% NLS można również wyróżnić białka związane z syntezą kwasów tłuszczowych (FabB, FabG) (Tabela 30). Bakterie są w stanie regulować skład błony komórkowej w odpowiedzi na stres środowiskowy w celu optymalizacji płynności błony oraz związanych z nią funkcji [227]. Wykazano, że na zmianę składu kwasów tłuszczowych w błonie może wpływać m.in. temperatura, pH oraz osmolarność [228–230]. Hines i wsp. wykazali, że bakterie mogą wbudowywać kwasy tłuszczowe pochodzące z surowicy do własnych lipidów [231]. Pomimo zastosowanej w eksperymentach metody izolacji opisywanej w literaturze jako metoda izolująca preferencyjnie białka błony zewnętrznej, w uzyskanych wynikach odnotowano dużą liczbę białek cytoplazmatycznych. Zawężenie parametrów wyszukiwania pozwoliło na wytypowanie białek, których lokalizacja komórkowa jest związana z błoną (tabela 31). Wśród białek o wyższej abundancji po 9 pasażach w surowicy zidentyfikowano m.in. porynę błony zewnętrznej – OmpD, z kolei wśród białek o niższym poziomie abundancji w stosunku do szczepu przed pasażami zidentyfikowano białka OmpC oraz OmpW. Białko OmpD jest poryną występującą w największej ilości w błonie zewnętrznej [232]. Ipinza i wsp. wykazali, że szczep  $\Delta ompD$  charakteryzował się zwiększoną zdolnością do inwazji makrofagów oraz większą przeżywalnością w modelu mysim w porównaniu do szczepu z funkcjonalnym białkiem [233]. Z kolei Ondari i wsp. wykazali wzrost ekspresji genu *ompD* u szczepów *S. Typhimurium* opornych na surowicę ST313 w porównaniu do szczepów wrażliwych [223]. W niniejszej pracy wykazano, że mutacja w obrębie genu *ompD* ma wpływ na przeżywalność szczepów *S. Typhimurium* w surowicy (rycina 51). Szczep *S. Typhimurium* PCM 2255  $\Delta ompD$  charakteryzował się spadkiem przeżywalności do 38% po 30 minutach inkubacji z 50%NSL, podczas gdy przeżywalność szczepu dzikiego wynosiła 65% (tabela 32).

Dotychczas wykazano udział kilku OMP w mechanizmach chroniących bakterie przed litycznym działaniem surowicy. Ekspresja białka OmpA została powiązana z opornością na surowicę u *E. coli* K12 [234]. Białko OmpA hamuje kaskadę układu dopełniacza poprzez wiązanie białka C4bp [235]. Z kolei białko OmpC jest silnym antygenem rozpoznawanym przez przeciwciała klasy IgG, co sprzyja odkładaniu składnika C1q i aktywacji układu

dopełniacza na drodze klasycznej. Liu i wsp. wykazali, że utrata białka OmpC wpływa na wzrost przeżywalności szczepów w surowicy, dzięki zmniejszonej aktywacji drogi klasycznej układu dopełniacza [236]. Zmniejszenie ekspresji niektórych genów kodujących białka błony zewnętrznej może mieć więc korzystny wpływ na przeżywalność bakterii w stresującym środowisku. Miajlovic i wsp. wykazali spadek ekspresji genów dla kilku poryn błony zewnętrznej: *ompC*, *ompF*, *ompN*, and *nmpC* (*ompD*) u *E. coli* po inkubacji z surowicą [237]. Z kolei Li i wsp. wykazali, że delecja genu *ompW* wpływa na spadek przeżywalności szczepów *E. coli* K12 w surowicy [238]. W niniejszej pracy analizując proteom *S. diarizoane* PCM 2511 po 9 pasażach w 50% NSL wśród białek o obniżonej wartości abundancji w stosunku do szczepu przed pasażowaniem zidentyfikowano m.in. białko OmpC oraz OmpW (tabela 31). Nie zaobserwowano natomiast spadku abundancji białka OmpD. Ondari i wsp. badając transkryptom szczepów *S. Typhiumrium* ST313 po kontakcie z surowicą nie wykazali różnic w poziomie ekspresji genów odpowiedzialnych za biosyntezę LPS. Autorzy wykazali natomiast różnicę w poziomie ekspresji genu *fepE* u szczepów opornych na surowicę ludzką w porównaniu do szczepów wrażliwych [223]. W obecnej pracy nie wykazano istotnych różnic w poziomie abundancji białka Wzz oraz FepE dla szczepu po 9 pasażach w 50% NSL w porównaniu do szczepu dzikiego. Wynik ten koreluje z pomiarem średniej długości LPS (rycina 11) dla badanego szczepu *S. diarizoane* PCM 2511, gdzie nie wykazano istotnych różnic w zawartości NeuAc/Kdo pomiędzy 1. i 9. pasażem. Przeprowadzone analiza proteomu bakterii *Salmonella* O48 poddanych długoterminowej presji surowicy wskazuje na zdolności adaptacyjne bakterii do niesprzyjającego środowiska. Zastosowane w niniejszej pracy podejście, obejmujące analizę proteomu błony zewnętrznej szczepów poddanych presji surowicy ludzkiej, daje podstawę do dalszej analizy białek niezbędnych bakterii *Salmonella* do przeżycia w surowicy. Należy jednak podkreślić, że uzyskane dane proteomiczne wymagają dodatkowej weryfikacji; podobnie jak w przypadku większości wysokowydajnych systemów oznaczeń, również w przypadku analizy ilościowej peptydów, opartej na znacznikach izobarycznych, pewne zjawiska jak np. ko-izolacja i ko-fragmentacja wyznakowanych peptydów, mogą bezpośrednio wpływać na oznaczenia ilościowe.

Wyniki ujęte w niniejszej rozprawie doktorskiej przyniosły nowe obserwacje na temat udziału struktur powierzchniowych w mechanizmach unikania odpowiedzi immunologicznej przez bakterie z rodzaju *Salmonella*. Szczegółowo scharakteryzowano wpływ długości części O-swoistej LPS na interakcje z układem dopełniacza oraz na pochłanianie bakterii przez komórki ssacze. Określono również wpływ długości części O-swoistej LPS na modelową patogenność *in vivo* z wykorzystaniem larw *Galleria mellonella*. Dodatkowo,



w zaprezentowanej pracy po raz pierwszy scharakteryzowano wpływ długości części O-swoistej LPS na kształtowanie proteomu błony zewnętrznej bakterii *Salmonella*. Uzyskane wyniki dostarczając cennych informacji zrodziły także wiele kolejnych pytań, na które odpowiedzi dostarczyć muszą przyszłe badania.

## 10. WNIOSKI

1. Pasażowanie w 50% NSL prowadzi do wzrostu przeżywalności bakterii *S. diarizonae* PCM 2511 w surowicy, ale nie pozwala na otrzymanie wariantu szczepu wyraźnie różniącego się rozkładem typów długościowych LPS (VL-OAg, L-OAg, LMW-OAg) na powierzchni komórki bakteryjnej.
2. Opracowana metoda pomiaru średniej długości części O-swoistej LPS z wykorzystaniem GLC-MS pozwala na porównywanie mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817 różniących się rozkładem typów długościowych LPS. Dodatkowo, zaprezentowana metoda może stanowić w przyszłości podstawę do bardziej wnikliwej analizy proporcji pomiędzy różnymi typami długościowymi LPS (VL-OAg, L-OAg, LMW-OAg) występującymi na powierzchni komórki bakteryjnej.
3. Badane mutanty *S. Enteritidis* PCM 2817 o skróconej części O-swoistej LPS charakteryzują się zróżnicowanym poziomem wrażliwości na bakteriobójcze działanie surowicy. Potwierdzono główny udział drogi alternatywnej w litycznym działaniu układu dopełniacza względem testowanych mutantów.
4. L-OAg ma kluczowe znaczenie w ochronie bakterii *S. Enteritidis* PCM 2817 przed litycznym działaniem układu dopełniacza.
5. Mutanty *S. Enteritidis* PCM 2817  $\Delta wzz$ ,  $\Delta fepE \Delta wzz$  oraz  $\Delta wzy$  wykazują proteolityczną aktywność względem białka C3b układu dopełniacza.
6. Skracanie części O-swoistej LPS zwiększa stopień pochłaniania bakterii *S. Enteritidis* PCM 2817 przez linię komórkową mysich makrofagów RAW 264.7.
7. Mutanty *S. Enteritidis* PCM 2817 o skróconej części O-swoistej LPS charakteryzują się zróżnicowaną patogennością badaną *in vivo* na modelu larw *Galleria mellonella*, a uzyskane wyniki korelują z ich opornością na 50% NSL.
8. Skracanie części O-swoistej LPS moduluje skład białkowy badanych mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817.
9. Pasażowanie w 50% NSL wpływa na zmiany w proteomie bakterii *S. diarizonae* PCM 2511, co może wskazywać na zdolności adaptacyjne bakterii do niesprzyjającego środowiska.

## 11. LITERATURA

1. Bugla-Płoskońska, G.; Rybka, J.; Futoma-Kołoch, B.; Cisowska, A.; Gamian, A.; Doroszkiewicz, W. Sialic Acid-Containing Lipopolysaccharides of *Salmonella* O48 Strains--Potential Role in Camouflage and Susceptibility to the Bactericidal Effect of Normal Human Serum. *Microb. Ecol.* 2010, *59*, 601–613, doi:10.1007/s00248-009-9600-2.
2. Futoma-Kołoch, B.; Godlewska, U.; Guz-Regner, K.; Dorotkiewicz-Jach, A.; Klaus, E.; Rybka, J.; Bugla-Płoskońska, G. Presumable Role of Outer Membrane Proteins of *Salmonella* Containing Sialylated Lipopolysaccharides Serovar Ngozi, Sv. Isaszeg and Subspecies Arizonae in Determining Susceptibility to Human Serum. *Gut Pathog.* 2015, *7*, 18, doi:10.1186/s13099-015-0066-0.
3. Bugla-Płoskońska, G.; Korzeniowska-Kowal, A.; Guz-Regner, K. Reptiles as a Source of *Salmonella* O48--Clinically Important Bacteria for Children: The Relationship between Resistance to Normal Cord Serum and Outer Membrane Protein Patterns. *Microb. Ecol.* 2011, *61*, 41–51, doi:10.1007/s00248-010-9677-7.
4. Bugla-Płoskońska, G.; Kiersnowski, A.; Futoma-Kołoch, B.; Doroszkiewicz, W. Killing of Gram-Negative Bacteria with Normal Human Serum and Normal Bovine Serum: Use of Lysozyme and Complement Proteins in the Death of *Salmonella* Strains O48. *Microb. Ecol.* 2009, *58*, 276–289, doi:10.1007/s00248-009-9503-2.
5. Pawlak, A.; Rybka, J.; Dudek, B.; Krzyżewska, E.; Rybka, W.; Kędziora, A.; Klaus, E.; Bugla-Płoskońska, G. *Salmonella* O48 Serum Resistance Is Connected with the Elongation of the Lipopolysaccharide O-Antigen Containing Sialic Acid. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, *18*, doi:10.3390/ijms18102022.
6. Dudek, B.; Krzyżewska, E.; Kapczyńska, K.; Rybka, J.; Pawlak, A.; Korzekwa, K.; Klaus, E.; Bugla-Płoskońska, G. Proteomic Analysis of Outer Membrane Proteins from *Salmonella* Enteritidis Strains with Different Sensitivity to Human Serum. *PLOS ONE* 2016, *11*, e0164069, doi:10.1371/journal.pone.0164069.
7. Bravo, D.; Silva, C.; Carter, J.A.; Hoare, A.; Alvarez, S.A.; Blondel, C.J.; Zaldívar, M.; Valvano, M.A.; Contreras, I. Growth-Phase Regulation of Lipopolysaccharide O-Antigen Chain Length Influences Serum Resistance in Serovars of *Salmonella*. *J. Med. Microbiol.* 2008, *57*, 938–946, doi:10.1099/jmm.0.47848-0.

8. Silva, C.; Maloy, S.; Calva, E. One Health and Food-Borne Disease: *Salmonella* Transmission between Humans, Animals, and Plants. *Microbiol. Spectr.* 2014, 2, doi:10.1128/microbiolspec.OH-0020-2013.
9. 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. *Front. Life Sci.* 2015, 8, 284–293, doi:10.1080/21553769.2015.1051243.
10. Popoff, M.Y.; Bockemühl, J.; Gheesling, L.L. Supplement 2002 (No. 46) to the Kauffmann-White Scheme. *Res. Microbiol.* 2004, 155, 568–570, doi:10.1016/j.resmic.2004.04.005.
11. Guibourdenche, M.; Roggentin, P.; Mikoleit, M.; Fields, P.I.; Bockemühl, J.; Grimont, P.A.D.; Weill, F.-X. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor Scheme. *Res. Microbiol.* 2010, 161, 26–29, doi:10.1016/j.resmic.2009.10.002.
12. Pui, C.F.; Wong, W.C.; Chai, L.C.; Nillian, E.; Ghazali, F.M.; Cheah, Y.K.; Nakaguchi, Y.; Nishibuchi, M.; Radu, S. Simultaneous Detection of *Salmonella* Spp., *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium in Sliced Fruits Using Multiplex PCR. *Food Control* 2011, 22, 337–342, doi:10.1016/j.foodcont.2010.05.021.
13. Thielman, N.M.; Guerrant, R.L. Acute Infectious Diarrhea. *N. Engl. J. Med.* 2004, 350, 38–47, doi:10.1056/NEJMcp031534.
14. Patel, T.A.; Armstrong, M.; Morris-Jones, S.D.; Wright, S.G.; Doherty, T. Imported Enteric Fever: Case Series from the Hospital for Tropical Diseases, London, United Kingdom. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2010, 82, 1121–1126, doi:10.4269/ajtmh.2010.10-0007.
15. Parry, C.M.; Hien, T.T.; Dougan, G.; White, N.J.; Farrar, J.J. Typhoid Fever. *N. Engl. J. Med.* 2002, 347, 1770–1782, doi:10.1056/NEJMra020201.
16. de Jong, H.K.; Parry, C.M.; van der Poll, T.; Wiersinga, W.J. Host-Pathogen Interaction in Invasive Salmonellosis. *PLoS Pathog.* 2012, 8, e1002933, doi:10.1371/journal.ppat.1002933.
17. Scallan, E.; Hoekstra, R.M.; Angulo, F.J.; Tauxe, R.V.; Widdowson, M.-A.; Roy, S.L.; Jones, J.L.; Griffin, P.M. Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* 2011, 17, 7–15, doi:10.3201/eid1701.P11101.
18. Majowicz, S.E.; Musto, J.; Scallan, E.; Angulo, F.J.; Kirk, M.; O’Brien, S.J.; Jones, T.F.; Fazil, A.; Hoekstra, R.M.; International Collaboration on Enteric Disease “Burden of

- Illness” Studies The Global Burden of Nontyphoidal *Salmonella* Gastroenteritis. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 2010, 50, 882–889, doi:10.1086/650733.
19. Shimoni, Z.; Pitlik, S.; Leibovici, L.; Samra, Z.; Konigsberger, H.; Drucker, M.; Agmon, V.; Ashkenazi, S.; Weinberger, M. Nontyphoid *Salmonella* Bacteremia: Age-Related Differences in Clinical Presentation, Bacteriology, and Outcome. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 1999, 28, 822–827, doi:10.1086/515186.
  20. Arii, J.; Tanabe, Y.; Miyake, M.; Mukai, T.; Matsuzaki, M.; Niinomi, N.; Watanabe, H.; Yokota, Y.; Kohno, Y.; Noda, M. Clinical and Pathologic Characteristics of Nontyphoidal *Salmonella* Encephalopathy. *Neurology* 2002, 58, 1641–1645, doi:10.1212/wnl.58.11.1641.
  21. CDC - Global Health Available online: <https://www.cdc.gov/globalhealth/index.html> (dostęp 13 styczeń 2021).
  22. Galanis, E.; Wong, D.M.A.L.F.; Patrick, M.E.; Binsztein, N.; Cieslik, A.; Chalermchaikit, T.; Aidara-Kane, A.; Ellis, A.; Angulo, F.J.; Wegener, H.C. Web-Based Surveillance and Global *Salmonella* Distribution, 2000–2002 - Volume 12, Number 3—March 2006 - Emerging Infectious Diseases Journal - CDC., doi:10.3201/eid1203.050854.
  23. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-Borne Outbreaks in 2017. *EFSA J.* 2018, 16, e05500, doi:10.2903/j.efsa.2018.5500.
  24. Milczarek, M.; Czarkowski, M.P.; Sadkowska-Todys, M. Salmonellosis in Poland in 2015 and 2016. *Przegl. Epidemiol.* 2019, 419–431, doi:10.32394/pe.72.4.17.
  25. Czarkowski M., Niewęłowska, Szmulik-Misiurek L, Zbrzeźniak J. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce w 2019 roku. Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego. 2019, 188. [http://wwwold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/2019/Ch\\_2019.pdf](http://wwwold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/2019/Ch_2019.pdf) (dostęp 13 marca 2021)
  26. Hardy, A. *Salmonella*: A Continuing Problem. *Postgrad. Med. J.* 2004, 80, 541–545, doi:10.1136/pgmj.2003.016584.
  27. Crump, J.A.; Luby, S.P.; Mintz, E.D. The Global Burden of Typhoid Fever. *Bull. World Health Organ.* 2004, 82, 346–353.
  28. Hendriksen, R.S.; Vieira, A.R.; Karlslose, S.; Lo Fo Wong, D.M.A.; Jensen, A.B.; Wegener, H.C.; Aarestrup, F.M. Global Monitoring of *Salmonella* Serovar Distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: Results of Quality Assured Laboratories from 2001 to 2007. *Foodborne Pathog. Dis.* 2011, 8, 887–900, doi:10.1089/fpd.2010.0787.

29. V. T. Nair, D.; Venkitanarayanan, K.; Kollanoor Johny, A. Antibiotic-Resistant *Salmonella* in the Food Supply and the Potential Role of Antibiotic Alternatives for Control. *Foods* 2018, 7, doi:10.3390/foods7100167.
30. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in Zoonotic and Indicator Bacteria from Humans, Animals and Food in 2017 Available online: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/european-union-summary-report-antimicrobial-resistance-zoonotic-and-indicator-5> (dostęp 13 styczeń 2021).
31. McClelland, M.; Sanderson, K.E.; Spieth, J.; Clifton, S.W.; Latreille, P.; Courtney, L.; Porwollik, S.; Ali, J.; Dante, M.; Du, F.; et al. Complete Genome Sequence of *Salmonella Enterica* Serovar Typhimurium LT2. *Nature* 2001, 413, 852–856, doi:10.1038/35101614.
32. Dos Santos, A.M.P.; Ferrari, R.G.; Conte-Junior, C.A. Virulence Factors in *Salmonella* Typhimurium: The Sagacity of a Bacterium. *Curr. Microbiol.* 2019, 76, 762–773, doi:10.1007/s00284-018-1510-4.
33. Fàbrega, A.; Vila, J. *Salmonella Enterica* Serovar Typhimurium Skills to Succeed in the Host: Virulence and Regulation. *Clin. Microbiol. Rev.* 2013, 26, 308–341, doi:10.1128/CMR.00066-12.
34. Lambert, G.P. Stress-Induced Gastrointestinal Barrier Dysfunction and Its Inflammatory Effects. *J. Anim. Sci.* 2009, 87, E101-108, doi:10.2527/jas.2008-1339.
35. Dorsey, C.W.; Laarakker, M.C.; Humphries, A.D.; Weening, E.H.; Bäumlér, A.J. *Salmonella Enterica* Serotype Typhimurium MisL Is an Intestinal Colonization Factor That Binds Fibronectin. *Mol. Microbiol.* 2005, 57, 196–211, doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04666.x.
36. Gerlach, R.G.; Jäckel, D.; Stecher, B.; Wagner, C.; Lupas, A.; Hardt, W.-D.; Hensel, M. *Salmonella* Pathogenicity Island 4 Encodes a Giant Non-Fimbrial Adhesin and the Cognate Type 1 Secretion System. *Cell. Microbiol.* 2007, 9, 1834–1850, doi:10.1111/j.1462-5822.2007.00919.x.
37. Latasa, C.; Roux, A.; Toledo-Arana, A.; Ghigo, J.-M.; Gamazo, C.; Penadés, J.R.; Lasa, I. BapA, a Large Secreted Protein Required for Biofilm Formation and Host Colonization of *Salmonella Enterica* Serovar Enteritidis. *Mol. Microbiol.* 2005, 58, 1322–1339, doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04907.x.
38. Stecher, B.; Hapfelmeier, S.; Müller, C.; Kremer, M.; Stallmach, T.; Hardt, W.-D. Flagella and Chemotaxis Are Required for Efficient Induction of *Salmonella Enterica* Serovar

- Typhimurium Colitis in Streptomycin-Pretreated Mice. *Infect. Immun.* 2004, 72, 4138–4150, doi:10.1128/IAI.72.7.4138-4150.2004.
39. Patel, J.C.; Galán, J.E. Differential Activation and Function of Rho GTPases during *Salmonella*–Host Cell Interactions. *J. Cell Biol.* 2006, 175, 453–463, doi:10.1083/jcb.200605144.
  40. Zhou, D.; Mooseker, M.S.; Galán, J.E. Role of the *S. Typhimurium* Actin-Binding Protein SipA in Bacterial Internalization. *Science* 1999, 283, 2092–2095, doi:10.1126/science.283.5410.2092.
  41. Fu, Y.; Galán, J.E. A *Salmonella* Protein Antagonizes Rac-1 and Cdc42 to Mediate Host-Cell Recovery after Bacterial Invasion. *Nature* 1999, 401, 293–297, doi:10.1038/45829.
  42. Haneda, T.; Ishii, Y.; Shimizu, H.; Ohshima, K.; Iida, N.; Danbara, H.; Okada, N. *Salmonella* Type III Effector SpvC, a Phosphothreonine Lyase, Contributes to Reduction in Inflammatory Response during Intestinal Phase of Infection. *Cell. Microbiol.* 2012, 14, 485–499, doi:10.1111/j.1462-5822.2011.01733.x.
  43. Steele-Mortimer, O. The *Salmonella*-Containing Vacuole – Moving with the Times. *Curr. Opin. Microbiol.* 2008, 11, 38–45, doi:10.1016/j.mib.2008.01.002.
  44. Shotland, Y.; Krämer, H.; Groisman, E.A. The *Salmonella* SpiC Protein Targets the Mammalian Hook3 Protein Function to Alter Cellular Trafficking. *Mol. Microbiol.* 2003, 49, 1565–1576, doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03668.x.
  45. Lodowska, J.; Wolny, D.; Weglarz, L.; Dzierzewicz, Z. The Structural Diversity of Lipid A from Gram-Negative Bacteria. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 2007, 61, 106–121.
  46. Holst, O.; Ulmer, A.J.; Brade, H.; Flad, H.D.; Rietschel, E.T. Biochemistry and Cell Biology of Bacterial Endotoxins. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1996, 16, 83–104, doi:10.1111/j.1574-695X.1996.tb00126.x.
  47. Raetz, C.R. Bacterial Endotoxins: Extraordinary Lipids That Activate Eucaryotic Signal Transduction. *J. Bacteriol.* 1993, 175, 5745–5753.
  48. Wyckoff, T.J.; Lin, S.; Cotter, R.J.; Dotson, G.D.; Raetz, C.R. Hydrocarbon Rulers in UDP-N-Acetylglucosamine Acyltransferases. *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 32369–32372, doi:10.1074/jbc.273.49.32369.
  49. Raetz, C.R.H.; Whitfield, C. Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 2002, 71, 635–700, doi:10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414.

50. Krzyżewska, E.; Rybka, J. Biosynthesis of Lipopolysaccharides with Different Length of the O-Specific Region as a Virulence Factor of Gram-Negative Bacteria. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 2018, *72*, 573–586, doi:10.5604/01.3001.0012.1735.
51. Gunn, J.S.; Lim, K.B.; Krueger, J.; Kim, K.; Guo, L.; Hackett, M.; Miller, S.I. PmrA-PmrB-Regulated Genes Necessary for 4-Aminoarabinose Lipid A Modification and Polymyxin Resistance. *Mol. Microbiol.* 1998, *27*, 1171–1182, doi:10.1046/j.1365-2958.1998.00757.x.
52. Guo, L.; Lim, K.B.; Poduje, C.M.; Daniel, M.; Gunn, J.S.; Hackett, M.; Miller, S.I. Lipid A Acylation and Bacterial Resistance against Vertebrate Antimicrobial Peptides. *Cell* 1998, *95*, 189–198, doi:10.1016/s0092-8674(00)81750-x.
53. Needham, B.D.; Trent, M.S. Fortifying the Barrier: The Impact of Lipid A Remodelling on Bacterial Pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* 2013, *11*, 467–481, doi:10.1038/nrmicro3047.
54. Kong, Q.; Six, D.A.; Liu, Q.; Gu, L.; Wang, S.; Alamuri, P.; Raetz, C.R.H.; Curtiss, R. Phosphate Groups of Lipid A Are Essential for *Salmonella Enterica* Serovar Typhimurium Virulence and Affect Innate and Adaptive Immunity. *Infect. Immun.* 2012, *80*, 3215–3224, doi:10.1128/IAI.00123-12.
55. Raetz, C.R.H.; Reynolds, C.M.; Trent, M.S.; Bishop, R.E. Lipid A Modification Systems in Gram-Negative Bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 2007, *76*, 295–329, doi:10.1146/annurev.biochem.76.010307.145803.
56. Trent, M.S.; Pabich, W.; Raetz, C.R.; Miller, S.I. A PhoP/PhoQ-Induced Lipase (PagL) That Catalyzes 3-O-Deacylation of Lipid A Precursors in Membranes of *Salmonella* Typhimurium. *J. Biol. Chem.* 2001, *276*, 9083–9092, doi:10.1074/jbc.M010730200.
57. Kaszowska, M. Chemical Structure and Biosynthesis of Lipopolysaccharide--Important Component of the Cell Envelope of Gram-Negative Bacteria. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 2004, *58*, 333–342.
58. Samuel, G.; Reeves, P. Biosynthesis of O-Antigens: Genes and Pathways Involved in Nucleotide Sugar Precursor Synthesis and O-Antigen Assembly. *Carbohydr. Res.* 2003, *338*, 2503–2519, doi:10.1016/j.carres.2003.07.009.
59. Goldman, R.C.; Joiner, K.; Leive, L. Serum-Resistant Mutants of *Escherichia Coli* O111 Contain Increased Lipopolysaccharide, Lack an O Antigen-Containing Capsule, and Cover More of Their Lipid A Core with O Antigen. *J. Bacteriol.* 1984, *159*, 877–882.



60. Jann, B.; Reske, K.; Jann, K. Heterogeneity of Lipopolysaccharides. Analysis of Polysaccharide Chain Lengths by Sodium Dodecylsulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Eur. J. Biochem.* 1975, 60, 239–246, doi:10.1111/j.1432-1033.1975.tb20996.x.
61. Switzer, R.C.; Merrill, C.R.; Shifrin, S. A Highly Sensitive Silver Stain for Detecting Proteins and Peptides in Polyacrylamide Gels. *Anal. Biochem.* 1979, 98, 231–237, doi:10.1016/0003-2697(79)90732-2.
62. Batchelor, R.A.; Haraguchi, G.E.; Hull, R.A.; Hull, S.I. Regulation by a Novel Protein of the Bimodal Distribution of Lipopolysaccharide in the Outer Membrane of *Escherichia Coli*. *J. Bacteriol.* 1991, 173, 5699–5704, doi:10.1128/jb.173.18.5699-5704.1991.
63. Bastin, D.A.; Stevenson, G.; Brown, P.K.; Haase, A.; Reeves, P.R. Repeat Unit Polysaccharides of Bacteria: A Model for Polymerization Resembling That of Ribosomes and Fatty Acid Synthetase, with a Novel Mechanism for Determining Chain Length. *Mol. Microbiol.* 1993, 7, 725–734, doi:10.1111/j.1365-2958.1993.tb01163.x.
64. Stevenson, G.; Kessler, A.; Reeves, P.R. A Plasmid-Borne O-Antigen Chain Length Determinant and Its Relationship to Other Chain Length Determinants. *FEMS Microbiol. Lett.* 1995, 125, 23–30, doi:10.1111/j.1574-6968.1995.tb07330.x.
65. Murray, G.L.; Attridge, S.R.; Morona, R. Regulation of *Salmonella* Typhimurium Lipopolysaccharide O Antigen Chain Length Is Required for Virulence; Identification of *FepE* as a Second *Wzz*. *Mol. Microbiol.* 2003, 47, 1395–1406, doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03383.x.
66. Ozenberger, B.A.; Nahlik, M.S.; McIntosh, M.A. Genetic Organization of Multiple *Fep* Genes Encoding Ferric Enterobactin Transport Functions in *Escherichia Coli*. *J. Bacteriol.* 1987, 169, 3638–3646.
67. Parkhill, J.; Dougan, G.; James, K.D.; Thomson, N.R.; Pickard, D.; Wain, J.; Churcher, C.; Mungall, K.L.; Bentley, S.D.; Holden, M.T.; et al. Complete Genome Sequence of a Multiple Drug Resistant *Salmonella Enterica* Serovar Typhi CT18. *Nature* 2001, 413, 848–852, doi:10.1038/35101607.
68. Schmitt, M.P.; Payne, S.M. Genetics and Regulation of Enterobactin Genes in *Shigella Flexneri*. *J. Bacteriol.* 1988, 170, 5579–5587, doi:10.1128/jb.170.12.5579-5587.1988.
69. Batchelor, R.A.; Alifano, P.; Biffali, E.; Hull, S.I.; Hull, R.A. Nucleotide Sequences of the Genes Regulating O-Polysaccharide Antigen Chain Length (*Rol*) from *Escherichia Coli*

- and *Salmonella* Typhimurium: Protein Homology and Functional Complementation. *J. Bacteriol.* 1992, *174*, 5228–5236, doi:10.1128/jb.174.16.5228-5236.1992.
70. Morona, R.; Van Den Bosch, L.; Daniels, C. Evaluation of Wzz/MPA1/MPA2 Proteins Based on the Presence of Coiled-Coil Regions. *Microbiol. Read. Engl.* 2000, *146* ( Pt 1), 1–4, doi:10.1099/00221287-146-1-1.
  71. Cuthbertson, L.; Kos, V.; Whitfield, C. ABC Transporters Involved in Export of Cell Surface Glycoconjugates. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 2010, *74*, 341–362, doi:10.1128/MMBR.00009-10.
  72. Morona, R.; van den Bosch, L.; Manning, P.A. Molecular, Genetic, and Topological Characterization of O-Antigen Chain Length Regulation in *Shigella Flexneri*. *J. Bacteriol.* 1995, *177*, 1059–1068, doi:10.1128/jb.177.4.1059-1068.1995.
  73. Tocilj, A.; Munger, C.; Proteau, A.; Morona, R.; Purins, L.; Ajamian, E.; Wagner, J.; Papadopoulos, M.; Van Den Bosch, L.; Rubinstein, J.L.; et al. Bacterial Polysaccharide Co-Polymerases Share a Common Framework for Control of Polymer Length. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2008, *15*, 130–138, doi:10.1038/nsmb.1374.
  74. Carter, J.A.; Jiménez, J.C.; Zaldívar, M.; Álvarez, S.A.; Marolda, C.L.; Valvano, M.A.; Contreras, I. The Cellular Level of O-Antigen Polymerase *Wzy* Determines Chain Length Regulation by *WzzB* and *WzzpHS-2* in *Shigella Flexneri* 2a. *Microbiol. Read. Engl.* 2009, *155*, 3260–3269, doi:10.1099/mic.0.028944-0.
  75. Woodward, R.; Yi, W.; Li, L.; Zhao, G.; Eguchi, H.; Sridhar, P.R.; Guo, H.; Song, J.K.; Motari, E.; Cai, L.; et al. In Vitro Bacterial Polysaccharide Biosynthesis: Defining the Functions of *Wzy* and *Wzz*. *Nat. Chem. Biol.* 2010, *6*, 418–423, doi:10.1038/nchembio.351.
  76. Kalynychn, S.; Valvano, M.A.; Cygler, M. Polysaccharide Co-Polymerases: The Enigmatic Conductors of the O-Antigen Assembly Orchestra. *Protein Eng. Des. Sel. PEDS* 2012, *25*, 797–802, doi:10.1093/protein/gzs075.
  77. King, J.D.; Berry, S.; Clarke, B.R.; Morris, R.J.; Whitfield, C. Lipopolysaccharide O Antigen Size Distribution is Determined by a Chain Extension Complex of Variable Stoichiometry in *Escherichia Coli* O9a. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014, *111*, 6407–6412, doi:10.1073/pnas.1400814111.
  78. McConnell, M.; Wright, A. Variation in the Structure and Bacteriophage-Inactivating Capacity of *Salmonella* Anatum Lipopolysaccharide as a Function of Growth Temperature. *J. Bacteriol.* 1979, *137*, 746–751.

79. Delgado, M.A.; Mouslim, C.; Groisman, E.A. The PmrA/PmrB and RcsC/YojN/RcsB Systems Control Expression of the *Salmonella* O-Antigen Chain Length Determinant. *Mol. Microbiol.* 2006, *60*, 39–50, doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05069.x.
80. Silva-Valenzuela, C.A.; Velásquez, F.; Peñailillo, J.; Garcias-Papayani, H.; Fernández, P.; Tobar, P.; Contreras, I.; Santiviago, C.A.; Álvarez, S.A. O-Antigen Chain-Length Distribution in *Salmonella Enterica* Serovar Enteritidis is Regulated by Oxygen Availability. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2016, *477*, 563–567, doi:10.1016/j.bbrc.2016.06.074.
81. Greif, D.; Wesner, D.; Regtmeier, J.; Anselmetti, D. High Resolution Imaging of Surface Patterns of Single Bacterial Cells. *Ultramicroscopy* 2010, *110*, 1290–1296, doi:10.1016/j.ultramic.2010.06.004.
82. Hitchcock, P.J.; Brown, T.M. Morphological Heterogeneity among *Salmonella* Lipopolysaccharide Chemotypes in Silver-Stained Polyacrylamide Gels. *J. Bacteriol.* 1983, *154*, 269–277.
83. Tsai, C.M.; Frasch, C.E. A Sensitive Silver Stain for Detecting Lipopolysaccharides in Polyacrylamide Gels. *Anal. Biochem.* 1982, *119*, 115–119, doi:10.1016/0003-2697(82)90673-x.
84. Crawford, R.W.; Wangdi, T.; Spees, A.M.; Xavier, M.N.; Tsolis, R.M.; Bäumlner, A.J. Loss of Very-Long O-Antigen Chains Optimizes Capsule-Mediated Immune Evasion by *Salmonella Enterica* Serovar Typhi. *mBio* 2013, *4*, doi:10.1128/mBio.00232-13.
85. Whitfield, C.; Amor, P.A.; Köplin, R. Modulation of the Surface Architecture of Gram-Negative Bacteria by the Action of Surface Polymer:Lipid A-Core Ligase and by Determinants of Polymer Chain Length. *Mol. Microbiol.* 1997, *23*, 629–638, doi:10.1046/j.1365-2958.1997.2571614.x.
86. Hagelueken, G.; Clarke, B.R.; Huang, H.; Tuukkanen, A.; Danciu, I.; Svergun, D.I.; Hussain, R.; Liu, H.; Whitfield, C.; Naismith, J.H. A Coiled-Coil Domain Acts as a Molecular Ruler to Regulate O-Antigen Chain Length in Lipopolysaccharide. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2015, *22*, 50–56, doi:10.1038/nsmb.2935.
87. Rahman, M.M.; Guard-Petter, J.; Carlson, R.W. A Virulent Isolate of *Salmonella* Enteritidis Produces a *Salmonella* Typhi-like Lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.* 1997, *179*, 2126–2131.

88. Peterson, A.A.; McGroarty, E.J. High-Molecular-Weight Components in Lipopolysaccharides of *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Minnesota, and *Escherichia Coli*. *J. Bacteriol.* 1985, *162*, 738–745, doi:10.1128/JB.162.2.738-745.1985.
89. Kocsis, B.; Makszin, L.; Kilár, A.; Péterfi, Z.; Kilár, F. Capillary Electrophoresis Chips for Fingerprinting Endotoxin Chemotypes and Subclasses. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 2017, *1600*, 151–165, doi:10.1007/978-1-4939-6958-6\_15.
90. Thibault, P.; Richards, J.C. Applications of Combined Capillary Electrophoresis-Electrospray Mass Spectrometry in the Characterization of Short-Chain Lipopolysaccharides. *Haemophilus Influenzae*. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 2000, *145*, 327–344, doi:10.1385/1-59259-052-7:327.
91. Peterson, A.A.; Haug, A.; McGroarty, E.J. Physical Properties of Short- and Long-O-Antigen-Containing Fractions of Lipopolysaccharide from *Escherichia Coli* 0111:B4. *J. Bacteriol.* 1986, *165*, 116–122.
92. Zarnowiec, P.; Mizera, A.; Chrapek, M.; Urbaniak, M.; Kaca, W. Chemometric Analysis of Attenuated Total Reflectance Infrared Spectra of *Proteus Mirabilis* Strains with Defined Structures of LPS. *Innate Immun.* 2016, *22*, 325–335, doi:10.1177/1753425916647470.
93. Lopes, J.; Inniss, W.E. Electron Microscopic Study of Lipopolysaccharide from an Avian Strain of *Escherichia Coli* O18. *J. Bacteriol.* 1970, *103*, 238–243.
94. Fujimoto, S.; Meno, Y.; Horikawa, K. Heterogeneity in Expression of Lipopolysaccharide and Major Outer-Membrane Proteins by Strains of *Escherichia Coli* O157 with Different H-Serotypes. *Microbiol. Immunol.* 1998, *42*, 527–531, doi:10.1111/j.1348-0421.1998.tb02320.x.
95. Harvey, D.J. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Carbohydrates. *Mass Spectrom. Rev.* 1999, *18*, 349–450, doi:10.1002/1098-2787
96. Caroff, M.; Deprun, C.; Karibian, D. 252Cf Plasma Desorption Mass Spectrometry Applied to the Analysis of Underivatized Rough-Type Endotoxin Preparations. *J. Biol. Chem.* 1993, *268*, 12321–12324.
97. Helleur, R.J.; Thibault, P.; Banoub, J.H.; Shaw, D.H. Pyrolysis–Desorption Chemical Ionization and High-Energy Tandem Mass Spectrometry of the O-Specific Antigen of *Yersinia Ruckeri*. *Org. Mass Spectrom.* 1992, *27*, 967–973, doi:10.1002/oms.1210270907.

98. Therisod, H.; Labas, V.; Caroff, M. Direct Microextraction and Analysis of Rough-Type Lipopolysaccharides by Combined Thin-Layer Chromatography and MALDI Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 2001, 73, 3804–3807, doi:10.1021/ac010313s.
99. Jachymek, W.; Petersson, C.; Helander, A.; Kenne, L.; Lugowski, C.; Niedziela, T. Structural Studies of the O-Specific Chain and a Core Hexasaccharide of *Hafnia Alvei* Strain 1192 Lipopolysaccharide. *Carbohydr. Res.* 1995, 269, 125–138, doi:10.1016/0008-6215(94)00348-j.
100. Zarrouk, H.; Karibian, D.; Godard, I.; Perry, M.B.; Caroff, M. Use of Mass Spectrometry to Compare Three O-Chain-Linked and Free Lipopolysaccharide Cores: Differences Found in *Bordetella Parapertussis*. *J. Endotoxin Res.* 1997, 4, 453–458, doi:10.1177/096805199700400609.
101. Aussel, L.; Chaby, R.; Blay, K.L.; Kelly, J.; Thibault, P.; Perry, M.B.; Caroff, M. Chemical and Serological Characterization of the *Bordetella Hinzii* Lipopolysaccharides 1. *FEBS Lett.* 2000, 485, 40–46, doi:10.1016/S0014-5793(00)02181-5.
102. Sturiale, L.; Garozzo, D.; Silipo, A.; Lanzetta, R.; Parrilli, M.; Molinaro, A. New Conditions for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Native Bacterial R-Type Lipopolysaccharides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2005, 19, 1829–1834, doi:10.1002/rcm.1994.
103. Sturiale, L.; Palmigiano, A.; Silipo, A.; Knirel, Y.A.; Anisimov, A.P.; Lanzetta, R.; Parrilli, M.; Molinaro, A.; Garozzo, D. Reflectron MALDI TOF and MALDI TOF/TOF Mass Spectrometry Reveal Novel Structural Details of Native Lipooligosaccharides. *J. Mass Spectrom.* 2011, 46, 1135–1142, doi:10.1002/jms.2000.
104. Lindner, B. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry of Lipopolysaccharides. In *Bacterial Toxins: Methods and Protocols*; Holst, O., Ed.; Methods in Molecular Biology, Humana Press: Totowa, NJ, 2000; 311–325 ISBN 978-1-59259-052-0.
105. Klos, A.; Tenner, A.J.; Johswich, K.-O.; Ager, R.R.; Reis, E.S.; Köhl, J. The Role of the Anaphylatoxins in Health and Disease. *Mol. Immunol.* 2009, 46, 2753–2766, doi:10.1016/j.molimm.2009.04.027.
106. Aksamit, R.R.; Falk, W.; Leonard, E.J. Chemotaxis by Mouse Macrophage Cell Lines. *J. Immunol.* 1981, 126, 2194–2199.

107. Ehrenguber, M.U.; Geiser, T.; Deranleau, D.A. Activation of Human Neutrophils by C3a and C5A. Comparison of the Effects on Shape Changes, Chemotaxis, Secretion, and Respiratory Burst. *FEBS Lett.* 1994, *346*, 181–184, doi:10.1016/0014-5793(94)00463-3.
108. Merle, N.S.; Church, S.E.; Fremeaux-Bacchi, V.; Roumenina, L.T. Complement System Part I – Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Front. Immunol.* 2015, *6*, doi:10.3389/fimmu.2015.00262.
109. Nesargikar, P.N.; Spiller, B.; Chavez, R. The Complement System: History, Pathways, Cascade and Inhibitors. *Eur. J. Microbiol. Immunol.* 2012, *2*, 103–111, doi:10.1556/EuJMI.2.2012.2.2.
110. Law, S.K.; Lichtenberg, N.A.; Levine, R.P. Evidence for an Ester Linkage between the Labile Binding Site of C3b and Receptive Surfaces. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 1979, *123*, 1388–1394.
111. Law, S.K.; Levine, R.P. Interaction between the Third Complement Protein and Cell Surface Macromolecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1977, *74*, 2701–2705, doi:10.1073/pnas.74.7.2701.
112. Bjornson, A.B.; Bjornson, H.S. Activation of Complement by Opportunist Pathogens and Chemotypes of *Salmonella* Minnesota. *Infect. Immun.* 1977, *16*, 748–753.
113. Joiner, K.; Hammer, C.; Brown, E.; Cole, R.; Frank, M. Studies on the Mechanism of Bacterial Resistance to Complement-Mediated Killing. I. Terminal Complement Components Are Deposited and Released from *Salmonella* Minnesota S218 without Causing Bacterial Death. *J. Exp. Med.* 1982, *155*, 797–808.
114. Joiner, K.A.; Hammer, C.H.; Brown, E.J.; Frank, M.M. Studies on the Mechanism of Bacterial Resistance to Complement-Mediated Killing. II. C8 and C9 Release C5b67 from the Surface of *Salmonella* Minnesota S218 Because the Terminal Complex Does Not Insert into the Bacterial Outer Membrane. *J. Exp. Med.* 1982, *155*, 809–819, doi:10.1084/jem.155.3.809.
115. Nevola, J.J.; Stocker, B.A.; Laux, D.C.; Cohen, P.S. Colonization of the Mouse Intestine by an Avirulent *Salmonella* Typhimurium Strain and Its Lipopolysaccharide-Defective Mutants. *Infect. Immun.* 1985, *50*, 152–159.
116. Grossman, N.; Schmetz, M.A.; Foulds, J.; Klima, E.N.; Jimenez-Lucho, V.E.; Leive, L.L.; Joiner, K.A.; Jimenez, V. Lipopolysaccharide Size and Distribution Determine Serum Resistance in *Salmonella* Montevideo. *J. Bacteriol.* 1987, *169*, 856–863, doi:10.1128/jb.169.2.856-863.1987.

117. Joiner, K.A.; Grossman, N.; Schmetz, M.; Leive, L. C3 Binds Preferentially to Long-Chain Lipopolysaccharide during Alternative Pathway Activation by *Salmonella* Montevideo. *J. Immunol.* 1986, *136*, 710–715.
118. Tomás, J.M.; Ciurana, B.; Benedí, V.J.; Juárez, A. Role of Lipopolysaccharide and Complement in Susceptibility of *Escherichia Coli* and *Salmonella* Typhimurium to Non-Immune Serum. *J. Gen. Microbiol.* 1988, *134*, 1009–1016, doi:10.1099/00221287-134-4-1009.
119. Liang-Takasaki, C.J.; Grossman, N.; Leive, L. *Salmonellae* Activate Complement Differentially via the Alternative Pathway Depending on the Structure of Their Lipopolysaccharide O-Antigen. *J. Immunol.* 1983, *130*, 1867–1870.
120. Grossman, N.; Leive, L. Complement Activation via the Alternative Pathway by Purified *Salmonella* Lipopolysaccharide Is Affected by Its Structure but Not Its O-Antigen Length. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 1984, *132*, 376–385.
121. Grossman, N.; Svenson, S.B.; Leive, L.; Lindberg, A.A. *Salmonella* O Antigen-Specific Oligosaccharide-Octyl Conjugates Activate Complement via the Alternative Pathway at Different Rates Depending on the Structure of the O Antigen. *Mol. Immunol.* 1990, *27*, 859–865, doi:10.1016/0161-5890(90)90152-p.
122. Crawford, R.W.; Kestra, A.M.; Winter, S.E.; Xavier, M.N.; Tsolis, R.M.; Tolstikov, V.; Bäumlér, A.J. Very Long O-Antigen Chains Enhance Fitness during *Salmonella*-Induced Colitis by Increasing Bile Resistance. *PLoS Pathog.* 2012, *8*, doi:10.1371/journal.ppat.1002918.
123. Hölzer, S.U.; Schlumberger, M.C.; Jäckel, D.; Hensel, M. Effect of the O-Antigen Length of Lipopolysaccharide on the Functions of Type III Secretion Systems in *Salmonella* Enterica. *Infect. Immun.* 2009, *77*, 5458–5470, doi:10.1128/IAI.00871-09.
124. Murray, G.L.; Attridge, S.R.; Morona, R. Altering the Length of the Lipopolysaccharide O Antigen Has an Impact on the Interaction of *Salmonella* Enterica Serovar Typhimurium with Macrophages and Complement. *J. Bacteriol.* 2006, *188*, 2735–2739, doi:10.1128/JB.188.7.2735-2739.2006.
125. Murray, G.L.; Attridge, S.R.; Morona, R. Inducible Serum Resistance in *Salmonella* Typhimurium Is Dependent on Wzz(*FepE*)-Regulated Very Long O Antigen Chains. *Microbes Infect.* 2005, *7*, 1296–1304, doi:10.1016/j.micinf.2005.04.015.
126. Hoare, A.; Bittner, M.; Carter, J.; Alvarez, S.; Zaldívar, M.; Bravo, D.; Valvano, M.A.; Contreras, I. The Outer Core Lipopolysaccharide of *Salmonella* Enterica Serovar Typhi

- Is Required for Bacterial Entry into Epithelial Cells. *Infect. Immun.* 2006, 74, 1555–1564, doi:10.1128/IAI.74.3.1555-1564.2006.
127. Ryan, M.P.; O'Dwyer, J.; Adley, C.C. Evaluation of the Complex Nomenclature of the Clinically and Veterinary Significant Pathogen *Salmonella*. *BioMed Res. Int.* 2017, 2017, 3782182, doi:10.1155/2017/3782182.
  128. Raffatellu, M.; Chessa, D.; Wilson, R.P.; Tükel, Ç.; Akçelik, M.; Bäumler, A.J. Capsule-Mediated Immune Evasion: A New Hypothesis Explaining Aspects of Typhoid Fever Pathogenesis. *Infect. Immun.* 2006, 74, 19–27, doi:10.1128/IAI.74.1.19-27.2006.
  129. Looney, R.J.; Steigbigel, R.T. Role of the Vi Antigen of *Salmonella* Typhi in Resistance to Host Defense in Vitro. *J. Lab. Clin. Med.* 1986, 108, 506–516.
  130. Hashimoto, Y.; Li, N.; Yokoyama, H.; Ezaki, T. Complete Nucleotide Sequence and Molecular Characterization of ViaB Region Encoding Vi Antigen in *Salmonella* Typhi. *J. Bacteriol.* 1993, 175, 4456–4465, doi:10.1128/jb.175.14.4456-4465.1993.
  131. Wilson, R.P.; Winter, S.E.; Spees, A.M.; Winter, M.G.; Nishimori, J.H.; Sanchez, J.F.; Nuccio, S.-P.; Crawford, R.W.; Tükel, Ç.; Bäumler, A.J. The Vi Capsular Polysaccharide Prevents Complement Receptor 3-Mediated Clearance of *Salmonella Enterica* Serotype Typhi. *Infect. Immun.* 2011, 79, 830–837, doi:10.1128/IAI.00961-10.
  132. Freudenberger Catanzaro, K.C.; Inzana, T.J. The Francisella Tularensis Polysaccharides: What Is the Real Capsule? *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 2020, 84, doi:10.1128/MMBR.00065-19.
  133. Marshall, J.M.; Gunn, J.S. The O-Antigen Capsule of *Salmonella Enterica* Serovar Typhimurium Facilitates Serum Resistance and Surface Expression of FliC. *Infect. Immun.* 2015, 83, 3946–3959, doi:10.1128/IAI.00634-15.
  134. Patrick, S.; Houston, S.; Thacker, Z.; Blakely, G.W. Mutational Analysis of Genes Implicated in LPS and Capsular Polysaccharide Biosynthesis in the Opportunistic Pathogen *Bacteroides Fragilis*. *Microbiol. Read. Engl.* 2009, 155, 1039–1049, doi:10.1099/mic.0.025361-0.
  135. Caboni, M.; Pédrón, T.; Rossi, O.; Goulding, D.; Pickard, D.; Citiulo, F.; MacLennan, C.A.; Dougan, G.; Thomson, N.R.; Saul, A.; et al. An O Antigen Capsule Modulates Bacterial Pathogenesis in *Shigella Sonnei*. *PLoS Pathog.* 2015, 11, e1004749, doi:10.1371/journal.ppat.1004749.



136. Barak, J.D.; Jahn, C.E.; Gibson, D.L.; Charkowski, A.O. The Role of Cellulose and O-Antigen Capsule in the Colonization of Plants by *Salmonella Enterica*. *Mol. Plant-Microbe Interactioonn*, 2007, 20, 1083–1091, doi:10.1094/MPMI-20-9-1083.
137. Crawford, R.W.; Gibson, D.L.; Kay, W.W.; Gunn, J.S. Identification of a Bile-Induced Exopolysaccharide Required for *Salmonella* Biofilm Formation on Gallstone Surfaces. *Infect. Immun.* 2008, 76, 5341–5349, doi:10.1128/IAI.00786-08.
138. Strid, M.A.; Dalby, T.; Mølbak, K.; Krogfelt, K.A. Kinetics of the Human Antibody Response against *Salmonella Enterica* Serovars Enteritidis and Typhimurium Determined by Lipopolysaccharide Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Clin. Vaccine Immunol. CVI* 2007, 14, 741–747, doi:10.1128/CVI.00192-06.
139. Eidinger, D.; Bello, E.; Mates, A. The Heterocytotoxicity of Human Serum. I. Activation of the Alternative Complement Pathway by Heterologous Target Cells. *Cell. Immunol.* 1977, 29, 174–186, doi:10.1016/0008-8749(77)90286-6.
140. Fine, D.P.; Marney, S.R.; Colley, D.G.; Sergent, J.S.; Des Prez, R.M. C3 Shunt Activation in Human Serum Chelated with EGTA. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 1972, 109, 807–809.
141. Rybka, J.; Gamian, A. Determination of Endotoxin by the Measurement of the Acetylated Methyl Glycoside Derivative of Kdo with Gas-Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Microbiol. Methods* 2006, 64, 171–184, doi:10.1016/j.mimet.2005.04.029.
142. Yi, E.C.; Hackett, M. Rapid Isolation Method for Lipopolysaccharide and Lipid A from Gram-Negative Bacteria. *The Analyst* 2000, 125, 651–656, doi:10.1039/b000368i.
143. Laemmli, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227, 680–685, doi:10.1038/227680a0.
144. Fomsgaard, A.; Freudenberg, M.A.; Galanos, C. Modification of the Silver Staining Technique to Detect Lipopolysaccharide in Polyacrylamide Gels. *J. Clin. Microbiol.* 1990, 28, 2627–2631.
145. Poteete, A. What Makes the Bacteriophage  $\lambda$  Red System Useful for Genetic Engineering: Molecular Mechanism and Biological Function. *FEMS Microbiol. Lett.* 2001, 201, 9–14, doi:10.1016/S0378-1097(01)00242-7.
146. Datsenko, K.A.; Wanner, B.L. One-Step Inactivation of Chromosomal Genes in *Escherichia Coli* K-12 Using PCR Products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000, 97, 6640–6645, doi:10.1073/pnas.120163297.

147. Katashkina, J.I.; Hara, Y.; Golubeva, L.I.; Andreeva, I.G.; Kuvaeva, T.M.; Mashko, S.V. Use of the  $\lambda$  Red-Recombineering Method for Genetic Engineering of *Pantoea Ananatis*. *BMC Mol. Biol.* 2009, *10*, 34, doi:10.1186/1471-2199-10-34.
148. Lesic, B.; Rahme, L.G. Use of the Lambda Red Recombinase System to Rapidly Generate Mutants in *Pseudomonas Aeruginosa*. *BMC Mol. Biol.* 2008, *9*, 20, doi:10.1186/1471-2199-9-20.
149. Karlinsey, J.E. Lambda-Red Genetic Engineering in *Salmonella Enterica* Serovar Typhimurium. *Methods Enzymol.* 2007, *421*, 199–209, doi:10.1016/S0076-6879(06)21016-4.
150. Czarniak, F.; Hensel, M. Red-Mediated Recombineering of *Salmonella Enterica* Genomes. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 2015, *1225*, 63–79, doi:10.1007/978-1-4939-1625-2\_4.
151. Westphal, O., Jann, K., 1965. Bacterial lipopolysaccharide-extraction with phenol water and further application of procedure. *Methods in Carbohydrate Chemistry* 5, 83–91.
152. Moskovich, O.; Fishelson, Z. Quantification of Complement C5b-9 Binding to Cells by Flow Cytometry. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 2014, *1100*, 103–108, doi:10.1007/978-1-62703-724-2\_8.
153. Lähteenmäki, K.; Kyllönen, P.; Partanen, L.; Korhonen, T.K. Antiprotease Inactivation by *Salmonella Enterica* Released from Infected Macrophages. *Cell. Microbiol.* 2005, *7*, 529–538, doi:10.1111/j.1462-5822.2004.00483.x.
154. Klein, J. Homology Between Immune Responses in Vertebrates and Invertebrates: Does It Exist? *Scand. J. Immunol.* 1997, *46*, 558–564, doi:10.1046/j.1365-3083.1997.d01-164.x.
155. Klein J. Homology between immune responses in vertebrates and invertebrates: does it exist? *Scand J Immunol.* 1997, *46*(6):558-64. doi: 10.1046/j.1365-3083.1997.d01-164.x.
156. Wojda, I. Immunity of the Greater Wax Moth *Galleria Mellonella*. *Insect Sci.* 2017, *24*, 342–357, doi:10.1111/1744-7917.12325.
157. Hernandez, R.J.; Hesse, E.; Dowling, A.J.; Coyle, N.M.; Feil, E.J.; Gaze, W.H.; Vos, M. Using the Wax Moth Larva *Galleria Mellonella* Infection Model to Detect Emerging Bacterial Pathogens. *PeerJ* 2019, *6*, doi:10.7717/peerj.6150.
158. Lacharme-Lora, L.; Owen, S.V.; Blundell, R.; Canals, R.; Wenner, N.; Perez-Sepulveda, B.; Fong, W.Y.; Gilroy, R.; Wigley, P.; Hinton, J.C.D. The Use of Chicken and Insect

- Infection Models to Assess the Virulence of African *Salmonella* Typhimurium ST313. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2019, 13, doi:10.1371/journal.pntd.0007540.
159. Guerrieri, C.G.; Pereira, M.F.; Galdino, A.C.M.; Santos, A.L.S. dos; Elias, W.P.; Schuenck, R.P.; Spano, L.C. Typical and Atypical Enteroaggregative *Escherichia Coli* Are Both Virulent in the *Galleria Mellonella* Model. *Front. Microbiol.* 2019, 10, doi:10.3389/fmicb.2019.01791.
160. Miles, A.A.; Misra, S.S.; Irwin, J.O. The Estimation of the Bactericidal Power of the Blood. *J. Hyg.* 1938, 38, 732.
161. Thein, M.; Sauer, G.; Paramasivam, N.; Grin, I.; Linke, D. Efficient Subfractionation of Gram-Negative Bacteria for Proteomics Studies. *J. Proteome Res.* 2010, 9, 6135–6147, doi:10.1021/pr1002438.
162. Wiśniewski, J.R.; Zougman, A.; Nagaraj, N.; Mann, M. Universal Sample Preparation Method for Proteome Analysis. *Nat. Methods* 2009, 6, 359–362, doi:10.1038/nmeth.1322.
163. Instrukcja do znaczników izobarycznych, TMT Mass Tagging Kits and Reagents, Thermo Scientific, MAN0011639\_TMT\_Mass\_Tagging\_Reag\_UG.pdf (dostęp 22 marca 2021)
164. Bednarz-Misa, I.; Serek, P.; Dudek, B.; Pawlak, A.; Bugla-Płoskońska, G.; Gamian, A. Application of Zwitterionic Detergent to the Solubilization of *Klebsiella Pneumoniae* Outer Membrane Proteins for Two-Dimensional Gel Electrophoresis. *J. Microbiol. Methods* 2014, 107, 74–79, doi:10.1016/j.mimet.2014.09.004.
165. Murphy, T.F.; Bartos, L.C. Surface-Exposed and Antigenically Conserved Determinants of Outer Membrane Proteins of *Branhamella Catarrhalis*. *Infect. Immun.* 1989, 57, 2938–2941, doi:10.1128/IAI.57.10.2938-2941.1989.
166. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z Dnia 24 Stycznia 2020 r. w Sprawie Wprowadzenia Krajowego Programu Zwalczania Niektórych Serotypów *Salmonella* w Stadach Brojlerów Gatunku Kura (*Gallus Gallus*) Na Lata 2020-2022 <https://isap.sejm.gov.pl/isap.nsf/DocDetails.xsp?id=WDU20200000202> (dostęp 7 stycznia 2021)
167. Czarkowski M., Cielebąg E., Staszewska-Jakubik E. Kondej B. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce w 2014 roku. Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego. 2015, 185. [http://wwwold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/2014/Ch\\_2014.pdf](http://wwwold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/2014/Ch_2014.pdf)

168. Czarkowski M., Cielebąg E., Staszewska-Jakubik E. Kondej B. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce w 2016 roku. Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego. 2017, 186. [http://wwwold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/2016/Ch\\_2016.pdf](http://wwwold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/2016/Ch_2016.pdf)
169. Czarkowski M., Cielebąg E., Staszewska-Jakubik E. Kondej B. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce w 2017 roku. Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego. 2018, 188. [http://wwwold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/2017/Ch\\_2017.pdf](http://wwwold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/2017/Ch_2017.pdf)
170. Czarkowski M., Cielebąg E., Kondej B., Sadłocha A. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce w 2018 roku. Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego. 2019, 188. [http://wwwold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/2018/Ch\\_2018.pdf](http://wwwold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/2018/Ch_2018.pdf)
171. Bugła-Płoskońska, G.; Rybka, J.; Futoma-Kołoch, B.; Cisowska, A.; Gamian, A.; Doroszkiewicz, W. Sialic Acid-Containing Lipopolysaccharides of *Salmonella* O48 Strains--Potential Role in Camouflage and Susceptibility to the Bactericidal Effect of Normal Human Serum. *Microb. Ecol.* 2010, *59*, 601–613, doi:10.1007/s00248-009-9600-2.
172. Stenutz, R.; Weintraub, A.; Widmalm, G. The Structures of *Escherichia Coli* O-Polysaccharide Antigens. *FEMS Microbiol. Rev.* 2006, *30*, 382–403, doi:10.1111/j.1574-6976.2006.00016.x.
173. Liu, B.; Knirel, Y.A.; Feng, L.; Perepelov, A.V.; Senchenkova, S.N.; Reeves, P.R.; Wang, L. Structural Diversity in *Salmonella* O Antigens and Its Genetic Basis. *FEMS Microbiol. Rev.* 2014, *38*, 56–89, doi:10.1111/1574-6976.12034.
174. Liu, B.; Knirel, Y.A.; Feng, L.; Perepelov, A.V.; Senchenkova, S.N.; Wang, Q.; Reeves, P.R.; Wang, L. Structure and Genetics of *Shigella* O Antigens. *FEMS Microbiol. Rev.* 2008, *32*, 627–653, doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00114.x.
175. Guerry, P.; Ewing, C.P.; Schirm, M.; Lorenzo, M.; Kelly, J.; Pattarini, D.; Majam, G.; Thibault, P.; Logan, S. Changes in Flagellin Glycosylation Affect *Campylobacter* Autoagglutination and Virulence. *Mol. Microbiol.* 2006, *60*, 299–311, doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05100.x.
176. Takeuchi, K.; Taguchi, F.; Inagaki, Y.; Toyoda, K.; Shiraishi, T.; Ichinose, Y. Flagellin Glycosylation Island in *Pseudomonas Syringae* Pv. *Glycinea* and Its Role in Host Specificity. *J. Bacteriol.* 2003, *185*, 6658–6665, doi:10.1128/JB.185.22.6658-6665.2003.
177. Kondakova, A.N.; Bystrova, O.V.; Shaikhutdinova, R.Z.; Ivanov, S.A.; Dentovskaya, S.V.; Shashkov, A.S.; Knirel, Y.A.; Anisimov, A.P. Structure of the O-Antigen of *Yersinia*

- Pseudotuberculosis* O:4a Revised. *Carbohydr. Res.* 2009, 344, 531–534, doi:10.1016/j.carres.2008.12.010.
178. Sizova, O.V.; Kondakova, A.N.; Shashkov, A.S.; Knirel, Y.A.; Shaikhutdinova, R.Z.; Ivanov, S.A.; Platonov, M.E.; Hurst, M.R.H.; Dentovskaya, S.V. Structure and Gene Cluster of a Tyvelose-Containing O-Polysaccharide of an Entomopathogenic Bacterium *Yersinia Entomophaga* MH96T Related to *Yersinia Pseudotuberculosis*. *Carbohydr. Res.* 2017, 445, 93–97, doi:10.1016/j.carres.2017.04.013.
179. Goyal, P.K.; Wheatcroft, J.; Wakelin, D. Tyvelose and Protective Responses to the Intestinal Stages of *Trichinella Spiralis*. *Parasitol. Int.* 2002, 51, 91–98, doi:10.1016/S1383-5769(02)00002-8.
180. Darveau, R.P.; Hancock, R.E. Procedure for Isolation of Bacterial Lipopolysaccharides from Both Smooth and Rough *Pseudomonas Aeruginosa* and *Salmonella* Typhimurium Strains. *J. Bacteriol.* 1983, 155, 831–838.
181. Galanos, C.; Lüderitz, O.; Westphal, O. A New Method for the Extraction of R Lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem.* 1969, 9, 245–249, doi:https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1969.tb00601.x.
182. Palva, E.T.; Mäkelä, P.H. Lipopolysaccharide Heterogeneity in *Salmonella* Typhimurium Analyzed by Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Eur. J. Biochem.* 1980, 107, 137–143, doi:10.1111/j.1432-1033.1980.tb04634.x.
183. Ramu, P.; Tanskanen, R.; Holmberg, M.; Lähteenmäki, K.; Korhonen, T.K.; Meri, S. The Surface Protease PgtE of *Salmonella Enterica* Affects Complement Activity by Proteolytically Cleaving C3b, C4b and C5. *FEBS Lett.* 2007, 581, 1716–1720, doi:10.1016/j.febslet.2007.03.049.
184. Kukkonen, M.; Suomalainen, M.; Kyllönen, P.; Lähteenmäki, K.; Lång, H.; Virkola, R.; Helander, I.M.; Holst, O.; Korhonen, T.K. Lack of O-Antigen Is Essential for Plasminogen Activation by *Yersinia Pestis* and *Salmonella Enterica*. *Mol. Microbiol.* 2004, 51, 215–225, doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03817.x.
185. Schuijs, M.J.; Hammad, H.; Lambrecht, B.N. Professional and “Amateur” Antigen-Presenting Cells In Type 2 Immunity. *Trends Immunol.* 2019, 40, 22–34, doi:10.1016/j.it.2018.11.001.
186. Wick, M.J.; Harding, C.V.; Normark, S.J.; Pfeifer, J.D. Parameters That Influence the Efficiency of Processing Antigenic Epitopes Expressed in *Salmonella* Typhimurium. *Infect. Immun.* 1994, 62, 4542–4548.

187. Finlay, B.B.; Falkow, S. *Salmonella* Interactions with Polarized Human Intestinal Caco-2 Epithelial Cells. *J. Infect. Dis.* 1990, *162*, 1096–1106, doi:10.1093/infdis/162.5.1096.
188. Klena, J.; Zhang, P.; Schwartz, O.; Hull, S.; Chen, T. The Core Lipopolysaccharide of *Escherichia Coli* Is a Ligand for the Dendritic-Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule Nonintegrin CD209 Receptor. *J. Bacteriol.* 2005, *187*, 1710–1715, doi:10.1128/JB.187.5.1710-1715.2005.
189. Barthel, M.; Hapfelmeier, S.; Quintanilla-Martínez, L.; Kremer, M.; Rohde, M.; Hogardt, M.; Pfeffer, K.; Rüssmann, H.; Hardt, W.-D. Pretreatment of Mice with Streptomycin Provides a *Salmonella Enterica* Serovar Typhimurium Colitis Model That Allows Analysis of Both Pathogen and Host. *Infect. Immun.* 2003, *71*, 2839–2858, doi:10.1128/iai.71.5.2839-2858.2003.
190. Palmer, A.D.; Slauch, J.M. Mechanisms of *Salmonella* Pathogenesis in Animal Models. *Hum. Ecol. Risk Assess. HERA* 2017, *23*, 1877–1892, doi:10.1080/10807039.2017.1353903.
191. Insua, J.L.; Llobet, E.; Moranta, D.; Pérez-Gutiérrez, C.; Tomás, A.; Garmendia, J.; Bengoechea, J.A. Modeling *Klebsiella Pneumoniae* Pathogenesis by Infection of the Wax Moth *Galleria Mellonella*. *Infect. Immun.* 2013, *81*, 3552–3565, doi:10.1128/IAI.00391-13.
192. Andrejko, M.; Zdybicka-Barabas, A.; Cytryńska, M. Diverse Effects of *Galleria Mellonella* Infection with Entomopathogenic and Clinical Strains of *Pseudomonas Aeruginosa*. *J. Invertebr. Pathol.* 2014, *115*, 14–25, doi:10.1016/j.jip.2013.10.006.
193. Koch, G.; Nadal-Jimenez, P.; Cool, R.H.; Quax, W.J. Assessing *Pseudomonas* Virulence with Nonmammalian Host: *Galleria Mellonella*. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 2014, *1149*, 681–688, doi:10.1007/978-1-4939-0473-0\_52.
194. Jønsson, R.; Struve, C.; Jenssen, H.; Krogfelt, K.A. The Wax Moth *Galleria Mellonella* as a Novel Model System to Study Enteroaggregative *Escherichia Coli* Pathogenesis. *Virulence* 2017, *8*, 1894–1899, doi:10.1080/21505594.2016.1256537.
195. Ciesielczuk, H.; Betts, J.; Phee, L.; Doumith, M.; Hope, R.; Woodford, N.; Wareham, D.W. Comparative Virulence of Urinary and Bloodstream Isolates of Extra-Intestinal Pathogenic *Escherichia Coli* in a *Galleria Mellonella* Model. *Virulence* 2015, *6*, 145–151, doi:10.4161/21505594.2014.988095.

196. Kay, S.; Edwards, J.; Brown, J.; Dixon, R. *Galleria Mellonella* Infection Model Identifies Both High and Low Lethality of *Clostridium Perfringens* Toxigenic Strains and Their Response to Antimicrobials. *Front. Microbiol.* 2019, *10*, doi:10.3389/fmicb.2019.01281.
197. Wojda, I.; Vertyporokh, L. Układ odpornościowy owadów w obronie integralności organizmu. *Kosmos* 2017, *66*, 541–551.
198. Kavanagh, K.; Reeves, E.P. Exploiting the Potential of Insects for in Vivo Pathogenicity Testing of Microbial Pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 2004, *28*, 101–112, doi:10.1016/j.femsre.2003.09.002.
199. Viegas, S.C.; Mil-Homens, D.; Fialho, A.M.; Arraiano, C.M. The Virulence of *Salmonella Enterica* Serovar Typhimurium in the Insect Model *Galleria Mellonella* Is Impaired by Mutations in RNase E and RNase III. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013, *79*, 6124–6133, doi:10.1128/AEM.02044-13.
200. Bender, J.K.; Wille, T.; Blank, K.; Lange, A.; Gerlach, R.G. LPS Structure and PhoQ Activity Are Important for *Salmonella* Typhimurium Virulence in the *Galleria Mellonella* Infection Model. *PLoS ONE* 2013, *8*, doi:10.1371/journal.pone.0073287.
201. Luiz de Freitas, L.; Pereira da Silva, F.; Fernandes, K.M.; Carneiro, D.G.; Licursi de Oliveira, L.; Martins, G.F.; Dantas Vanetti, M.C. The Virulence of *Salmonella* Enteritidis in *Galleria Mellonella* Is Improved by N-Dodecanoyl-Homoserine Lactone. *Microb. Pathog.* 2021, 104730, doi:10.1016/j.micpath.2021.104730.
202. Gewirtz, A.T.; Simon, P.O.; Schmitt, C.K.; Taylor, L.J.; Hagedorn, C.H.; O'Brien, A.D.; Neish, A.S.; Madara, J.L. *Salmonella* Typhimurium Translocates Flagellin across Intestinal Epithelia, Inducing a Proinflammatory Response. *J. Clin. Invest.* 2001, *107*, 99–109, doi:10.1172/JCI10501.
203. Tallant, T.; Deb, A.; Kar, N.; Lupica, J.; de Veer, M.J.; DiDonato, J.A. Flagellin Acting via TLR5 Is the Major Activator of Key Signaling Pathways Leading to NF-Kappa B and Proinflammatory Gene Program Activation in Intestinal Epithelial Cells. *BMC Microbiol.* 2004, *4*, 33, doi:10.1186/1471-2180-4-33.
204. Strindelius, L.; Filler, M.; Sjöholm, I. Mucosal Immunization with Purified Flagellin from *Salmonella* Induces Systemic and Mucosal Immune Responses in C3H/HeJ Mice. *Vaccine* 2004, *22*, 3797–3808, doi:10.1016/j.vaccine.2003.12.035.
205. Liaudet, L.; Szabó, C.; Evgenov, O.V.; Murthy, K.G.; Pacher, P.; Virág, L.; Mabley, J.G.; Marton, A.; Soriano, F.G.; Kirov, M.Y.; et al. Flagellin from Gram-Negative Bacteria Is

- a Potent Mediator of Acute Pulmonary Inflammation in Sepsis. *Shock Augusta Ga* 2003, 19, 131–137, doi:10.1097/00024382-200302000-00008.
206. Eaves-Pyles, T.; Murthy, K.; Liaudet, L.; Virág, L.; Ross, G.; Soriano, F.G.; Szabó, C.; Salzman, A.L. Flagellin, a Novel Mediator of *Salmonella*-Induced Epithelial Activation and Systemic Inflammation: I Kappa B Alpha Degradation, Induction of Nitric Oxide Synthase, Induction of Proinflammatory Mediators, and Cardiovascular Dysfunction. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2001, 166, 1248–1260, doi:10.4049/jimmunol.166.2.1248.
207. Liaudet, L.; Murthy, K.G.K.; Mabley, J.G.; Pacher, P.; Soriano, F.G.; Salzman, A.L.; Szabó, C. Comparison of Inflammation, Organ Damage, and Oxidant Stress Induced by *Salmonella Enterica* Serovar Muenchen Flagellin and Serovar Enteritidis Lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 2002, 70, 192–198, doi:10.1128/iai.70.1.192-198.2002.
208. Crhanova, M.; Malcova, M.; Mazgajova, M.; Karasova, D.; Sebkova, A.; Fucikova, A.; Bortlicek, Z.; Pilousova, L.; Kyrova, K.; Dekanova, M.; et al. LPS Structure Influences Protein Secretion in *Salmonella Enterica*. *Vet. Microbiol.* 2011, 152, 131–137, doi:10.1016/j.vetmic.2011.04.018.
209. Wadhams, G.H.; Armitage, J.P. Making Sense of It All: Bacterial Chemotaxis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004, 5, 1024–1037, doi:10.1038/nrm1524.
210. Yamamoto, K.; Imae, Y. Cloning and Characterization of the *Salmonella* Typhimurium-Specific Chemoreceptor Tcp for Taxis to Citrate and from Phenol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1993, 90, 217–221.
211. Werneburg, G.T.; Thanassi, D.G. Pili Assembled by the Chaperone/Usher Pathway in *Escherichia Coli* and *Salmonella*. *EcoSal Plus* 2018, 8, doi:10.1128/ecosalplus.ESP-0007-2017.
212. Kolenda, R.; Ugorski, M.; Grzymajlo, K. Everything You Always Wanted to Know About *Salmonella* Type 1 Fimbriae, but Were Afraid to Ask. *Front. Microbiol.* 2019, 10, doi:10.3389/fmicb.2019.01017.
213. White, A.P.; Gibson, D.L.; Collinson, S.K.; Banser, P.A.; Kay, W.W. Extracellular Polysaccharides Associated with Thin Aggregative Fimbriae of *Salmonella Enterica* Serovar Enteritidis. *J. Bacteriol.* 2003, 185, 5398–5407, doi:10.1128/JB.185.18.5398-5407.2003.
214. Hancock, R.E. Peptide Antibiotics. *The Lancet* 1997, 349, 418–422, doi:10.1016/S0140-6736(97)80051-7.



215. Gunn, J.S. Bacterial Modification of LPS and Resistance to Antimicrobial Peptides. *J. Endotoxin Res.* 2001, 7, 57–62.
216. Gatzeva-Topalova, P.Z.; May, A.P.; Sousa, M.C. Structure and Mechanism of ArnA: Conformational Change Implies Ordered Dehydrogenase Mechanism in Key Enzyme for Polymyxin Resistance. *Struct. Lond. Engl.* 1993 2005, 13, 929–942, doi:10.1016/j.str.2005.03.018.
217. Pescaretti, M. de las M.; López, F.E.; Morero, R.D.; Delgado, M.A.Y. 2011 The PmrA/PmrB Regulatory System Controls the Expression of the WzzfepE Gene Involved in the O-Antigen Synthesis of *Salmonella Enterica* Serovar Typhimurium. *Microbiology* 157, 2515–2521, doi:10.1099/mic.0.050088-0.
218. Wang, P.; Dalbey, R.E. Inserting Membrane Proteins: The YidC/Oxa1/Alb3 Machinery in Bacteria, Mitochondria, and Chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 2011, 1808, 866–875, doi:10.1016/j.bbamem.2010.08.014.
219. Price, C.E.; Otto, A.; Fusetti, F.; Becher, D.; Hecker, M.; Driessen, A.J.M. Differential Effect of YidC Depletion on the Membrane Proteome of *Escherichia Coli* under Aerobic and Anaerobic Growth Conditions. *Proteomics* 2010, 10, 3235–3247, doi:10.1002/pmic.201000284.
220. Pramoonjago, P.; Kaneko, M.; Kinoshita, T.; Ohtsubo, E.; Takeda, J.; Hong, K.S.; Inagi, R.; Inoue, K. Role of TraT Protein, an Anticomplementary Protein Produced in *Escherichia Coli* by R100 Factor, in Serum Resistance. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 1992, 148, 827–836.
221. Cirillo, D.M.; Heffernan, E.J.; Wu, L.; Harwood, J.; Fierer, J.; Guiney, D.G. Identification of a Domain in Rck, a Product of the *Salmonella* Typhimurium Virulence Plasmid, Required for Both Serum Resistance and Cell Invasion. *Infect. Immun.* 1996, 64, 2019–2023.
222. Nishio, M.; Okada, N.; Miki, T.; Haneda, T.; Danbara, H. Identification of the Outer-Membrane Protein PagC Required for the Serum Resistance Phenotype in *Salmonella Enterica* Serovar Choleraesuis. *Microbiol. Read. Engl.* 2005, 151, 863–873, doi:10.1099/mic.0.27654-0.
223. Ondari, E.M.; Klemm, E.J.; Msefula, C.L.; El Ghany, M.A.; Heath, J.N.; Pickard, D.J.; Barquist, L.; Dougan, G.; Kingsley, R.A.; MacLennan, C.A. Rapid Transcriptional Responses to Serum Exposure Are Associated with Sensitivity and Resistance to

- Antibody-Mediated Complement Killing in Invasive *Salmonella* Typhimurium ST313. *Wellcome Open Res.* 2019, 4, 74, doi:10.12688/wellcomeopenres.15059.1.
224. Bougdour, A.; Wickner, S.; Gottesman, S. Modulating RssB Activity: IraP, a Novel Regulator of  $\Sigma$ S Stability in *Escherichia Coli*. *Genes Dev.* 2006, 20, 884–897, doi:10.1101/gad.1400306.
225. Karas, V.O.; Westerlaken, I.; Meyer, A.S. The DNA-Binding Protein from Starved Cells (Dps) Utilizes Dual Functions To Defend Cells against Multiple Stresses. *J. Bacteriol.* 2015, 197, 3206–3215, doi:10.1128/JB.00475-15.
226. Ray, S.; Da Costa, R.; Das, M.; Nandi, D. Interplay of Cold Shock Protein E with an Uncharacterized Protein, YciF, Lowers Porin Expression and Enhances Bile Resistance in *Salmonella* Typhimurium. *J. Biol. Chem.* 2019, 294, 9084–9099, doi:10.1074/jbc.RA119.008209.
227. Zhang, Y.-M.; Rock, C.O. Membrane Lipid Homeostasis in Bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 2008, 6, 222–233, doi:10.1038/nrmicro1839.
228. Suutari, M.; Laakso, S. Microbial Fatty Acids and Thermal Adaptation. *Crit. Rev. Microbiol.* 1994, 20, 285–328, doi:10.3109/10408419409113560.
229. Alvarez-Ordóñez, A.; Fernández, A.; López, M.; Arenas, R.; Bernardo, A. Modifications in Membrane Fatty Acid Composition of *Salmonella* Typhimurium in Response to Growth Conditions and Their Effect on Heat Resistance. *Int. J. Food Microbiol.* 2008, 123, 212–219, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.01.015.
230. Guillot, A.; Obis, D.; Mistou, M.Y. Fatty Acid Membrane Composition and Activation of Glycine-Betaine Transport in *Lactococcus Lactis* Subjected to Osmotic Stress. *Int. J. Food Microbiol.* 2000, 55, 47–51, doi:10.1016/s0168-1605(00)00193-8.
231. Hines, K.M.; Alvarado, G.; Chen, X.; Gatto, C.; Pokorny, A.; Alonzo, F.; Wilkinson, B.J.; Xu, L. Lipidomic and Ultrastructural Characterization of the Cell Envelope of *Staphylococcus Aureus* Grown in the Presence of Human Serum. *mSphere* 2020, 5, doi:10.1128/mSphere.00339-20.
232. Santiviago, C.A.; Toro, C.S.; Hidalgo, A.A.; Youderian, P.; Mora, G.C. Global Regulation of the *Salmonella Enterica* Serovar Typhimurium Major Porin, OmpD. *J. Bacteriol.* 2003, 185, 5901–5905, doi:10.1128/JB.185.19.5901-5905.2003.
233. Ipinza, F.; Collao, B.; Monsalva, D.; Bustamante, V.H.; Luraschi, R.; Alegría-Arcos, M.; Almonacid, D.E.; Aguayo, D.; Calderón, I.L.; Gil, F.; et al. Participation of the *Salmonella*

- OmpD Porin in the Infection of RAW264.7 Macrophages and BALB/c Mice. *PLoS ONE* 2014, 9, doi:10.1371/journal.pone.0111062.
234. Weiser, J.N.; Gotschlich, E.C. Outer Membrane Protein A (OmpA) Contributes to Serum Resistance and Pathogenicity of *Escherichia Coli* K-1. *Infect. Immun.* 1991, 59, 2252–2258, doi:10.1128/IAI.59.7.2252-2258.1991.
235. Bacterial Self-Defence: How *Escherichia Coli* Evades Serum Killing - PubMed Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24617921/> (accessed on 23 April 2021).
236. Liu, Y.-F.; Yan, J.-J.; Lei, H.-Y.; Teng, C.-H.; Wang, M.-C.; Tseng, C.-C.; Wu, J.-J. Loss of Outer Membrane Protein C in *Escherichia Coli* Contributes to Both Antibiotic Resistance and Escaping Antibody-Dependent Bactericidal Activity. *Infect. Immun.* 2012, 80, 1815–1822, doi:10.1128/IAI.06395-11.
237. Miajlovic, H.; Cooke, N.M.; Moran, G.P.; Rogers, T.R.F.; Smith, S.G. Response of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia Coli* to Human Serum Reveals a Protective Role for Rcs-Regulated Exopolysaccharide Colanic Acid. *Infect. Immun.* 2014, 82, 298–305, doi:10.1128/IAI.00800-13.
238. Li, W.; Wen, L.; Li, C.; Chen, R.; Ye, Z.; Zhao, J.; Pan, J. Contribution of the Outer Membrane Protein OmpW in *Escherichia Coli* to Complement Resistance from Binding to Factor H. *Microb. Pathog.* 2016, 98, 57–62, doi:10.1016/j.micpath.2016.06.024.

## 12. SPIS RYCIN

Rycina 1. Ogólna budowa lipopolisacharydu. ....	24
Rycina 2. Struktura podjednostki antygeny O szczepów <i>S. Enteritidis</i> oraz <i>S. Typhimurium</i> . ....	25
Rycina 3. Metabolizm składnika C3 układu dopełniacza. ....	30
Rycina 4. Schemat aktywacji układu dopełniacza. ....	31
Rycina 5. Chemotypy lipopolisacharydu bakterii z rodzaju <i>Salmonella</i> . ....	33
Rycina 6. Schemat mutantów długościowych części O-swoistej LPS. ....	37
Rycina 7. Schemat działania systemu $\lambda$ Red. ....	52
Rycina 8. Marker masy 1kb Plus DNA Ladder. ....	56
Rycina 9. Struktura znacznika TMT <sup>TM</sup> . ....	76
Rycina 10. Przeżywalność szczepu <i>S. diarizonae</i> PCM 2511 podczas 9 kolejnych pasaży w 50% NSL. ....	82
Rycina 11. Analiza zawartości NeuAc/Kdo <i>S. diarizonae</i> PCM 2511 podczas 9 kolejnych pasaży w 50% NSL. ....	84
Rycina 12. Rozdział SDS-PAGE LPS <i>S. diarizonae</i> PCM 2511 po 9 pasażach w 50% NSL. ....	85
Rycina 13. Elektroforeza w żelu agarozowym potwierdzająca prawidłową transformację szczepu <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817 plazmidem pKD46. ....	86
Rycina 14. Elektroforeza w żelu agarozowym zamplifikowanych produktów PCR przygotowanych do transformacji <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817/pKD46. ....	87
Rycina 15. Selekcja pozytywnych klonów <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817 $\Delta$ <i>fepE::kan</i> . ....	88
Rycina 16. Selekcja pozytywnych klonów <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817 $\Delta$ <i>wzz::kan</i> . ....	88
Rycina 17. Selekcja pozytywnych klonów <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817 $\Delta$ <i>wzy::kan</i> . ....	89
Rycina 18. Selekcja pozytywnych klonów <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817 $\Delta$ <i>fepE::kan</i> $\Delta$ <i>wzz</i> . ....	90
Rycina 19. Rozdział elektroforetyczny pozytywnych klonów <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817 $\Delta$ <i>fepE::FRT</i> . ....	90
Rycina 20. Rozdział elektroforetyczny pozytywnych klonów <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817 $\Delta$ <i>wzz::FRT</i> . ....	91
Rycina 21. Rozdział elektroforetyczny pozytywnych klonów <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817 $\Delta$ <i>fepE::FRT</i> $\Delta$ <i>wzz::FRT</i> . ....	91
Rycina 22. Rozdział elektroforetyczny pozytywnych klonów <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817 <i>wzy::FRT</i> . ....	92
Rycina 23. Rozdział SDS-PAGE cząsteczek LPS badanych mutantów <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817. ....	93

Rycina 24. Przykładowy chromatogram z rozdziału pochodnych cukrowych dla całych komórek bakteryjnych <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817.....	94
Rycina 25. Widma masowe i struktura acetylowanych metyloglikozydów Tyv, Rha i Hep... 95	
Rycina 26. Widma masowe i struktura pochodnych Kdo i MuAc.....	96
Rycina 27. Porównanie proporcji monosacharydów Tyv, Rha, Hep, Kdo w całych komórkach bakteryjnych oraz izolowanych preparatach LPS mutantów <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817. ....	97
Rycina 28. Porównanie proporcji monosacharydów Hep, MuAc oraz Kdo w całych komórkach bakteryjnych mutantów <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817.....	98
Rycina 29. Analiza GLC-MS zawartości Tyv, Rha, Hep i Kdo w całych komórkach bakteryjnych mutantów <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817 .....	99
Rycina 30. Analiza GLC-MS zawartości Tyv, Rha i Hep w LPS badanych mutantów <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817.....	100
Rycina 31. Poziom przeciwciał anty <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817 w próbkach surowicy. ....	101
Rycina 32. Przeżywalność badanych mutantów <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817 w 50% NSL. ....	103
Rycina 33. Przeżywalność badanych mutantów <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817 w 50% NSL/KL. ....	104
Rycina 34. Przeżywalność badanych mutantów <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817 w 50% NSL/A. ..	105
Rycina 35. Przeżywalność badanych mutantów <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817 w 50% ITS.....	109
Rycina 36. Poziom aktywacji układu dopełniacza przez badane mutanty <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817.....	111
Rycina 37. Poziom aktywacji układu dopełniacza na drodze alternatywnej przez różne typy LPS wyizolowane z bakterii <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817.....	112
Rycina 38. Poziom wiązania składnika C3 układu dopełniacza przez badane mutanty <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817.....	113
Rycina 39. Poziom wiązania składnika C3 układu dopełniacza przez różne typy LPS wyizolowane z badanych mutantów <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817. ....	115
Rycina 40. Inaktywacja składnika C3 w surowicy przez testowane mutanty <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817.....	116
Rycina 41. Wiązanie białka C9 układu dopełniacza do badanych mutantów <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817.....	117
Rycina 42. Proteolityczna aktywność białka PgtE u badanych mutantów <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817.....	118
Rycina 43. Pobieranie bakterii <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817 przez komórki dendrytyczne JAWSII. ....	119
Rycina 44. Pobieranie bakterii <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817 przez komórki Caco-2. ....	120

Rycina 45. Pobieranie bakterii <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817 przez komórki RAW 264.7.....	120
Rycina 46. Krzywa przeżywalności larw <i>Galleria mellonella</i> w czasie 5 dni po iniekcji zawiesinami <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817 o wartości CFU/ml $10^7$ .....	123
Rycina 47. Elektroforeza w żelu agarozowym potwierdzająca prawidłową transformację szczepu <i>S. Typhimurium</i> PCM 2255 plazmidem pKD46. ....	133
Rycina 48. Elektroforeza w żelu agarozowym zamplifikowanego produktu PCR do transformacji <i>S. Typhimurium</i> PCM 2255/pKD46. ....	134
Rycina 49. Selekcja pozytywnych klonów <i>S. Typhimurium</i> PCM 2255 $\Delta ompD::kan$ . ....	135
Rycina 50. Trawienie enzymem PstI produktów PCR dla szczepu <i>S. Typhimurium</i> PCM 2255 $\Delta ompD::kan$ . ....	135
Rycina 51. Przeżywalność <i>S. Typhimurium</i> PCM 2255 $\Delta ompD::kan$ w 50% NSL .....	136

### 13. SPIS TABEL

Tabela 1. Podział systematyczny rodzaju <i>Salmonella</i> .	17
Tabela 2. Salmonellozy w Polsce w latach 2015-2019.	19
Tabela 3. Charakterystyka genotypowa szczepów pochodzących z Coli Genetic Stock Center, wykorzystanych do konstrukcji mutantów <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817 o różnej długości części O-swoistej LPS.	41
Tabela 4. Skład i warunki reakcji PCR potwierdzającej czy zaszła transformacja plazmidem pKD46.	55
Tabela 5. Startery użyte do konstrukcji mutantów <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817 o skróconej długości części O-swoistej LPS.	57
Tabela 6. Skład i warunki reakcji PCR użytej do przygotowania liniowych fragmentów DNA do konstrukcji mutantów <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817 o skróconej długości części O-swoistej LPS.	58
Tabela 7. Znaczniki TMT użyte do znakowania peptydów badanych mutantów <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817.	76
Tabela 8. Znaczniki TMT użyte do znakowania peptydów <i>S. diarizonae</i> PCM 2511 przed i po pasażowaniu w 50% NSL.	79
Tabela 9. Startery użyte do konstrukcji mutantów białkowych <i>S. Typhimurium</i> PCM 2255.	80
Tabela 10. Skład i warunki reakcji PCR użytej do przygotowania liniowych fragmentów DNA do konstrukcji mutantów białkowych <i>S. Typhimurium</i> PCM 2255.	81
Tabela 11. Przeżywalność szczepu <i>S. diarizonae</i> PCM 2511 podczas pasażowania w 50% NSL.	83
Tabela 12. Charakterystyka używanych typów surowicy.	102
Tabela 13. Skala oceny przeżywalności badanych mutantów <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817 w 50% surowicy.	103
Tabela 14. Przeżywalność badanych mutantów <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817 w czasie 120 minut inkubacji w 50% NSL.	106
Tabela 15. Przeżywalność badanych mutantów <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817 w czasie 120 minut inkubacji w 50% NSL/KL.	107
Tabela 16. Przeżywalność badanych mutantów <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817 w czasie 120 minut inkubacji w 50% NSL/A.	108
Tabela 17. Przeżywalność badanych mutantów <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817 w czasie 120 minut inkubacji w 50% ITS.	109

Tabela 18. Normalizacja wartości MFI dla C5b-9 pozytywnych komórek <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817.....	110
Tabela 19. Poziom aktywacji układu dopełniacza na drodze alternatywnej przez różne typy LPS wyizolowane z bakterii <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817. ....	112
Tabela 20. Normalizacja wartości MFI dla C3d pozytywnych komórek <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817.....	113
Tabela 21. Poziom wiązania składnika C3 układu dopełniacza na drodze alternatywnej przez różne typy LPS wyizolowane z <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817.....	114
Tabela 22. Liczba larw żywych po 120 minutach inkubacji oraz wartości CFU/ml inokulum bakteryjnego.....	122
Tabela 23. Przeżywalność larw po 120 godzinach inkubacji oraz stopień patogenności badanych szczepów <i>in vivo</i> . ....	123
Tabela 24. Stężenie OMP wyizolowanych z badanych szczepów <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817. ....	125
Tabela 25. Różnice ilościowe w proteomie <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817 $\Delta$ <i>fepE</i> . ....	126
Tabela 26. Różnice ilościowe w proteomie <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817 $\Delta$ <i>wzz</i> . ....	126
Tabela 27. Różnice ilościowe w proteomie <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817 $\Delta$ <i>fepE</i> $\Delta$ <i>wzz</i> . ....	127
Tabela 28. Różnice ilościowe w proteomie <i>S. Enteritidis</i> PCM 2817 $\Delta$ <i>wzy</i> . ....	128
Tabela 29. Stężenie OMP wyizolowanych z badanych szczepów <i>S. diarizonae</i> PCM 2511. ....	130
Tabela 30. Różnice ilościowe w proteomie <i>S. diarizonae</i> PCM 2511 po 9 pasażach w 50% NSL. ....	131
Tabela 31. Różnice ilościowe w proteomie <i>S. diarizonae</i> PCM 2511 po 9 pasażach w 50% NSL zawężone do białek związanych z błoną. ....	132
Tabela 32. Przeżywalność badanych szczepów <i>S. Typhimurium</i> PCM 2255 w czasie 30 minut inkubacji w 50% NSL. ....	136



## 14. DOROBEK NAUKOWY

### PUBLIKACJE

1. Dudek B., Książczyk M., **Krzyżewska E.**, Rogala K., Kuczkowski M., Woźniak-Biel A., Korzekwa K., Korzeniowska-Kowal A., Ratajszczak R., Wieliczko A., Rybka J., Bugła-Płoskońska G. Comparison of the phylogenetic analysis of PFGE profiles and the characteristic of virulence genes in clinical and reptile associated *Salmonella* strains. *BMC Vet Res.* 2019 Sep 2;15(1):312.
2. Kędziora A., Speruda M., **Krzyżewska E.**, Rybka J., Łukowiak A., Bugła-Płoskońska G. Similarities and differences between silver ions and silver in nanoforms as antibacterial agents. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19(2).
3. Futoma-Kołoch, B., Dudek, B., Kapczyńska, K., **Krzyżewska E.**, Wańczyk, M., Korzekwa, K., Rybka, J., Klaus, E., Bugła-Płoskońska, G. Relationship of Triamine-Biocide tolerance of *Salmonella enterica* serovar Senftenberg to antimicrobial susceptibility, serum resistance and outer membrane proteins. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18(7).
4. Pawlak A., Rybka J., Dudek B., **Krzyżewska E.**, Rybka W., Kędziora A., Klaus E., Bugła-Płoskońska G. *Salmonella* O48 Serum Resistance is Connected with the Elongation of the Lipopolysaccharide O-Antigen Containing Sialic Acid. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18(10).
5. Dudek B., **Krzyżewska E.**, Kapczyńska K., Rybka J., Pawlak A., Korzekwa K., Klaus E., Bugła-Płoskońska G. Proteomic analysis of outer membrane proteins from *Salmonella* Enteritidis strains with different sensitivity to human serum. *PLoS One.* 2016 Oct; 3;11(10).
6. Kędziora A., **Krzyżewska E.**, Dudek B., Bugła-Płoskońska G. Udział białek błony zewnętrznej we wrażliwości bakterii na nanosrebro. *Postepy Hig Med Dosw.* 2016 Jun 13;70(0):610-7.
7. Książczyk M., **Krzyżewska E.**, Futoma-Kołoch B., Bugła-Płoskońska G. Oddziaływanie związków dezynfekcyjnych na komórki bakteryjne w kontekście bezpieczeństwa higieny i zdrowia publicznego. *Postepy Hig Med Dosw.* 2015 Sep 20;69:1042-55.
8. **Krzyżewska E.**, Książczyk M., Kędziora A., Futoma-Kołoch B., Bugła-Płoskońska G. Modyfikacje struktur komórkowych mikroorganizmów wywoływane działaniem biocydów. *Postep. Mikrobiol.*, 2015; 54: 380-391.

9. **Krzyżewska E.**, Speruda M., Dudek B., Kędziora A., Bugła-Płoskońska G. Zmiany w kompozycji białek błony zewnętrznej szczepów *Escherichia coli* wywołane działaniem nanokompozytów srebra. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 69: 239 – 249

## **UDZIAŁ W REALIZACJI PROJEKTÓW BADAWCZYCH**

1. Udział składników błony zewnętrznej szczepów *Salmonella* Enteritidis w generowaniu oporności wobec wrodzonej odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Preludium 13 2017/25/N/NZ6/02295, Narodowe Centrum Nauki, 2018-2021  
Rola w projekcie: kierownik
2. Baza Informacji Naukowych Wspierających Innowacyjne Terapie – BINWIT POPC.02.03.01-00-0053/18, Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, 2018-2021  
Rola w projekcie: wykonawca projektu
3. Projekt: KNOW nr grantu 519-1-4-1-136 Uzyskanie mutantów *wzz* i *wzzFepE* szczepów *Salmonella* O48 oraz ich wstępna charakterystyka strukturalna i immunologiczna. Krajowy Naukowy Ośrodek Wiodący (KNOW) na lata 2014-2018 dla Wrocławskiego Centrum Biotechnologii, 2015-2016  
Rola w projekcie: wykonawca projektu

## **STAŻE NAUKOWE**

1. 02.09.2019-02.03.2020 Department of Bacteriology and Immunology, Haartman Institute, Immunobiology Research Program, University of Helsinki, Helsinki, Finlandia. Wyjazd w ramach programu W. Iwanowskiej, Narodowa Agencja Wymiany Akademickiej
2. 04.03.2019-02.09.2019 Laboratorium Spektrometrii Mas, Sieć Badawcza Łukasiewicz - PORT - Polski Ośrodek Rozwoju Technologii, Wrocław, Polska.