

## Streszczenie

Rosnąca częstość występowania wielolekoopornych bakterii Gram-ujemnych, takich jak *Salmonella*, podkreśla konieczność zrozumienia mechanizmów oporności, będących podstawą do opracowania skutecznych metod zapobiegania i leczenia salmonellozy. Bakterie te wykorzystują szereg mechanizmów, w tym modyfikacje w obrębie osłon komórkowych, aby przeciwdziałać terapiom antybiotykowym i zwiększyć efektywność infekcji. W tym kontekście, błony bakteryjne, będące miejscem zakotwiczenia różnorodnych białek, odgrywają kluczową rolę. Jednym z takich białek o wysokim potencjale badawczym jest SanA, związane z opornością na wankomycynę i potencjalnie uczestniczące w początkowych fazach infekcji.

W ramach pracy doktorskiej przeprowadzono kompleksową analizę właściwości i funkcji biologicznej SanA. Celem było zrozumienie, jak SanA wpływa na charakterystykę błon *Salmonella*, skutkując w fenotypie oporności bakterii na stresory środowiskowe. W tym celu wykorzystano szereg testów funkcjonalnych z użyciem mutantu z delecją *ΔsanA*, aby ocenić cechy błon takie jak ładunek, hydrofobowość i przepuszczalność. Przeprowadzono również rozległą analizę fenotypową z udziałem 240 ksenobiotyków. W ramach projektu analizie poddano także poziom ekspresji SanA i jego lokalizację subkomórkową, wykorzystując techniki takie jak pomiar aktywności lucyferazy w konstrukcie fuzyjnym oraz frakcjonowanie i immunoblotting. Ponadto, na podstawie rezultatów testów inwazyjnych, wykorzystano system reporterowy, celem zbadania korelacji SanA z Wyspą Patogenności Typu I (SPI-1).

Wykazano, iż SanA jest białkiem błony wewnętrznej, którego brak skutkuje zwiększoną przepuszczalnością błony, jej hydrofilowością i dodatnim ładunkiem, co powoduje zmienioną oporność na antybiotyki, których celem działania są osłony bakteryjne. Delecja *sanA* związana jest również z podwyższonym poziomem replikacji *Salmonella* w makrofagach, sugerując zmniejszoną wrażliwość na składowe układu immunologicznego gospodarza. Ponadto wykazano, że mutacja ta w bakteriach we wczesnej fazie stacjonarnej wzrostu, znacznie zwiększa ich inwazyjność, częściowo korelując z nadekspresją SPI-1, która z kolei zależna jest od dostępności składników odżywczych.

Podsumowując, niniejsze badania podkreślają znaczenie SanA w regulowaniu odpowiedzi *Salmonella* na stres środowiskowy. Obejmuje to kluczową rolę w inwazji, namnażaniu w organizmie gospodarza oraz oporności na ksenobiotyki, co podkreśla znaczenie białek błony wewnętrznej w zrozumieniu złożoności procesu patogenezy pałeczek *Salmonella*.

## Abstract

The increasing prevalence of multidrug-resistant Gram-negative bacteria, such as *Salmonella*, underscores the urgent need for deeper insights into their survival and resistance strategies, aiding in the development of effective prevention and treatment of salmonellosis. These bacteria deploy various mechanisms, including the modification of their membranes composition, to counteract antibiotic treatments and enhance interaction with the host. In this context, the bacterial envelope, embedded with various proteins, plays a pivotal role. One of such molecules with considerable research potential is SanA, which is associated with vancomycin resistance and potentially involved in the initial phases of infection.

In this study, a comprehensive analysis of SanA's properties and biological functions was conducted. The aim was to understand how SanA influences the *Salmonella* membrane, affecting the bacterium's resistance to environmental stressors, including the harsh conditions within host. A  $\Delta sanA$  deletion mutant was employed to assess the effects of SanA on membrane properties, including charge, hydrophobicity, and permeability, through a range of assays. An extensive phenotypic analysis involving 240 xenobiotics was performed to gain deeper insight into SanA's biological role. The study also delved into SanA's expression pattern and its subcellular localization, utilizing techniques such as luciferase activity measurement in a transcriptional fusion and fractionation followed by immunoblotting. In addition, following invasion assays, a newly-created reporter system was utilized to investigate the relationship between SanA and a key virulence factor, *Salmonella* Pathogenicity Island I (SPI-1).

The findings demonstrate that SanA is an inner membrane protein which absence increases membrane permeability, hydrophilicity, and positive charge, leading to heightened resistance against envelope-targeting antibiotics. This genetic alteration also correlates with increased replication rates in primary macrophages, suggesting a potential evasion of immune system defenses. Invasion assays revealed that the deletion of *sanA* in early stationary phase bacteria significantly boosts their invasiveness, partially due to upregulated SPI-1 expression, which is modulated in a nutrient availability-dependent manner.

In conclusion, our research highlights the importance of SanA in regulating *Salmonella*'s response to environmental stress. This includes playing a crucial role in the pathogen's entry, survival within the host, and xenobiotic resistance, thus underlining the significance of inner membrane proteins in understanding the complexities of *Salmonella* pathogenicity.