

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

WYDZIAŁ MEDYCyny WETERYNARYJNEJ

Marcjanna Wimonć

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

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem:

prof. dr hab. Macieja Ugorskiego

Katedra Biochemii i Biologii Molekularnej

Promotor pomocniczy:

dr Rafał Kolenda

Katedra Biochemii i Biologii Molekularnej

Wrocław 2022

Streszczenie

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

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

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

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

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

Abstract

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

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

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

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