

Lek.wet. Agata Mikołajczyk-Martinez

Rola fimbrii typu 1 w adhezji i inwazji oraz przeżywalności i cytotoksyczności pałeczek *Salmonella Gallinarum* i *Salmonella Enteritidis* wobec kurzych linii komórkowych.

The role of type 1 fimbria in adhesion and invasion as well as the survival and cytotoxicity of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Gallinarum towards chicken cell lines.

Praca wykonana pod kierunkiem

Prof.dr hab. Macieja Ugorskiego

W Katedrze Biochemii i Biologii Molekularnej

Wydziału Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

Spis Treści

Wykaz używanych skrótów	5
1 STRESZCZENIE.....	7
2 WSTĘP	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
2.1 Wprowadzenie	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
2.2 Zakażenia pałeczkami <i>S. Enteritidis</i> i <i>S. Gallinarum</i> u drobiu.....	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
2.3 Czynniki wirulencji pałeczek <i>Salmonella</i>	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
2.3.1 Systemy sekrecyjne i inne białka kodowane przez geny zlokalizowane na SPI	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
2.3.2 Plazmidy wirulencji.....	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
2.3.3 Fimbrie i rzęski	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
2.3.4 Toksyny	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
2.4 Patogeneza zakażeń pałeczkami <i>Salmonella</i>	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
2.5 Cytotoksyczność pałeczek <i>Salmonella</i> względem komórek gospodarza	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
2.6 Fimbrie typu 1 i ich rola w patogenezie zakażeń pałeczkami <i>Salmonella</i>	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
2.6.1 Udział fimbrii typu 1 pałeczek <i>Salmonella</i> w adhezji i inwazji komórek gospodarza	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
3 CEL PRACY	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
4 MATERIAŁY I METODY	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
4.1 Materiały i aparatura	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
4.1.1 Odczynniki chemiczne.....	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
4.1.2 Bufory.....	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
4.1.3 Podłoża mikrobiologiczne	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
4.1.4 Pożywki hodowlane i roztwory stosowane w pracy z komórkami eukariotycznymi	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
4.1.5 Enzymy	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
4.1.6 Gotowe zestawy odczynników.....	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
4.1.7 Standard DNA.....	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
4.1.8 Oligonukleotydy.....	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
4.1.9 Szczepy bakteryjne.....	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
4.1.10 Wektory plazmidowe.....	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.

4.1.11	Linie komórkowe	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
4.1.12	Przeciwciała	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
4.1.13	Programy komputerowe.....	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
4.1.14	Aparatura	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
4.2	Metody	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
4.2.1	Izolacja plazmidowego DNA na małą skalę	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
4.2.2	Izolacja genomowego DNA.....	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
4.2.3	Oznaczanie stężenia DNA	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
4.2.4	Reakcja łańcuchowej polimerazy (PCR).....	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
4.2.5	Reakcja PCR dla pojedynczej kolonii bakterii (ang. <i>colony PCR</i>).....	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
4.2.6	Elektroforeza DNA w żelu agarozowym.....	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
4.2.7	Oczyszczanie DNA po reakcji PCR.....	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
4.2.8	Oznaczanie liczby bakterii metodą turbidymetryczną.....	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
4.2.9	Przygotowanie elektrokompetentnych bakterii i ich elektroporacja.....	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
4.2.9.1	Przygotowanie elektrokompetentnych bakterii w celu ich transformacji wektorem plazmidowym	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
4.2.9.2	Przygotowanie elektrokompetentnych bakterii w celu ich transformacji kasetą DNA	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
4.2.10	Sekwencjonowanie DNA.....	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
4.2.11	Mikroskopia fluorescencyjna	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
4.2.12	Cytometria przepływowa	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
4.2.13	Krzywe wzrostu pałeczek <i>Salmonella</i>	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
4.2.14	Warunki hodowli komórek eukariotycznych.....	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
4.2.15	Zamrażanie i rozmrażanie komórek	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
4.2.16	Ocena żywotności komórek za pomocą błękitu trypanu	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
4.2.17	Test adhezyjny	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
4.2.18	Test inwazyjny	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
4.2.19	Test na przeżywalność bakterii po ich wnikięciu do komórek eukariotycznych ..	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
4.2.20	Test uwalniania dehydrogenazy mleczanowej.....	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
4.2.21	Testy apoptotyczne z użyciem zestawów „FLICA 660 caspase-1 assay” oraz „FILCA 660 caspase-3/7 assay”	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
5	WYNIKI	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
5.1	Otrzymanie mutantów pałeczek <i>S. Enteritidis</i> i <i>S. Gallinarum</i> pozbawionych ekspresji T1F poprzez insercyjną inaktywację genu <i>fimH</i>	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
5.2	Otrzymanie kasety DNA z genem <i>kanR</i>	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.

5.3	Insercyjna inaktywacja genu <i>fimH</i> z wykorzystaniem homologicznej rekombinacji	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
5.4	Charakterystyka fenotypowa i funkcjonalna mutantów pałeczek <i>S. Enteritidis</i> i <i>S. Gallinarum</i> z delecją genu <i>fimH</i>	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
5.4.1	Ocena morfologiczna przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego.....	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
5.4.2	Ocena szybkości wzrostu.....	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
5.4.3	Analiza pałeczek <i>S. Enteritidis</i> i <i>S. Gallinarum</i> typu dzikiego i ich mutantów delecyjnych <i>S. Enteritidis fimH::kan</i> oraz <i>S. Gallinarum fimH::kan</i> pod kątem ekspresji T1F	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
5.5	Adhezja pałeczek <i>S. Enteritidis</i> i <i>S. Gallinarum</i> typu dzikiego oraz mutantów <i>S. Enteritidis fimH::kan</i> i <i>S. Gallinarum fimH::kan</i> do kurzych komórek pochodzenia nabłonkowego i monocytarnego	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
5.6	Inwazja kurzych komórek pochodzenia nabłonkowego i monocytarnego przez pałeczki <i>S. Enteritidis</i> i <i>S. Gallinarum</i> typu dzikiego oraz mutanty <i>S. Enteritidis fimH::kan</i> i <i>S. Gallinarum fimH::kan</i>	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
5.7	Przeżywalność pałeczek <i>S. Enteritidis</i> i <i>S. Gallinarum</i> typu dzikiego oraz mutantów <i>S. Enteritidis fimH::kan</i> i <i>S. Gallinarum fimH::kan</i> w kurzych komórkach pochodzenia nabłonkowego i monocytarnego	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
5.8	Cytotoksyczność pałeczek <i>S. Enteritidis</i> i <i>S. Gallinarum</i> typu dzikiego oraz mutantów <i>S. Enteritidis fimH::kan</i> i <i>S. Gallinarum fimH::kan</i> wobec kurzych komórek pochodzenia nabłonkowego i monocytarnego	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
5.9	Określenie typu śmierci wywołanej w komórkach HD11 kury przez pałeczki <i>S. Enteritidis</i>	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
6	DYSKUSJA	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
7	WNIOSKI	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
8	SPIS LITERATURY	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
	MATERIAŁY UZUPEŁNIAJĄCE:	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.

WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW

CARD – ang. *caspase activation and recruitment domain* (domena aktywująca i rekrutująca kaspazy)

CFU - ang. *colony Forming Unit* (Jednoska tworząca kolonię)

EDTA – kwas etylenodiaminoczteroowy

g – względna siła odśrodkowa

IFN – interferon

IL - interleukina

LPS – lipopolisacharyd

MST1F – ang. *mannoso-sensitive type one fimbriae* (mannozozależne fimbrie typu pierwszego)

MRT1F – ang. *mannoso-sensitive type one fimbriae* (mannozooporne fimbrie typu pierwszego)

NADPH – ang. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (zredukowany fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego)

NEAA - ang. *non essential amino acids* (nie-niezbędne aminokwasy)

NLR – ang. *Nod-like receptors* (receptory podobne do receptorów Nod)

NLRC4 – ang. *NLR family CARD domain-containing protein 4* (białko z rodziny Nod-podobnych receptorów zawierające domenę CARD)

OD - ang. *Optical density* (gęstość optyczna)

PAMP – ang. *pathogen associated molecular patterns* (wzorce molekularne związane z patogenem)

PARP – ang. *poly ADP-ribose polymerase* (polimeraza poli ADP rybozy)

PRR – ang. *pattern recognition receptors* (receptory rozpoznające wzorce molekularne związane z patogenem)

PMA – ang. *phorbol mirystate acetate* (octan mirystynianu forbolu)

RIP – ang. *receptor interacting protein* (rodzina białek oddziałujących z receptorem kinaz serynowo treoninowych)

ROS ang. *reactive oxygen species* (reaktywne formy tlenu)

rpm – ang. *revolts per minute* (obroty na minutę)

SCV – ang. *Salmonella containing vacuols* (pęcherzyki zawierające pałeczki *Salmonella*)

S. Enteritidis – *Salmonella enterica enterica* serowar Enteritidis

S. Gallinarum – *Salmonella enterica enterica* serowar Gallinarum

SNP – ang. *single nucleotide polymorphism* (polimorfizm pojedynczych nukleotydów)

TLR – ang. *Toll-like receptors* (receptory podobne do receptorów Toll)

TNF - ang. *tumor necrosis factor* (czynnik martwicy nowotworów)

TUNEL - ang. *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Mediated d-UTP Nick End-Labeling*

T1F – ang. *type one fimbriae* (fimbrie typu pierwszego)

T3SS SPI-1- ang. *type three secretion system on Salmonella pathogenicity Island one* (system sekrecyjny typu trzeciego, na pierwszej wyspie patogenności *Salmonella*)

T3SS SPI-2 - ang. *type three secretion system on Salmonella pathogenicity Island two* (system sekrecyjny typu trzeciego, na drugiej wyspie patogenności *Salmonella*)

1 STRESZCZENIE

Rola fimbrii typu 1 w adhezji i inwazji oraz przeżywalności i cytotoksyczności pałeczek *Salmonella Gallinarum* i *Salmonella Enteritidis* wobec kurzych linii komórkowych.

Zakażenia pałeczkami *Salmonella* u ludzi, występujące w postaci miejscowego zakażenia jelit, są jednymi z najczęściej występujących odzwierzęcych zatruc pokarmowych, które najczęściej powodowane są przez serowary *Salmonella (S.) Enteritidis* i *S. Typhimurium*. Serowar *S. Gallinarum* z kolei może zakażać tylko drób grzebiący i o ile nie stanowi zagrożenia epidemiologicznego u ludzi, o tyle może powodować znaczne straty ekonomiczne w przypadku zakażenia stad hodowlanych drobiu, a także ze względu na swoje unikatowe cechy stanowi ciekawy model badawczy nad patogenezą tych pałeczek.

Pierwszym etapem patogenezы pałeczek *Salmonella* u ludzi i zwierząt, w tym drobiu jest adhezja do komórek nabłonkowych przewodu pokarmowego. Jednymi z ważniejszych struktur w tym procesie są fimbrie typu 1(T1F), będące włóknikowatymi organellami zewnętrznymi, umożliwiającymi proces adhezji bakterii do komórek gospodarza, przy udziale białka FimH. T1F, w zależności od zdolności bądź jej braku do wiązania mannozy, a co za tym idzie, glikoprotein zawierających ugrupowania bogatomannozowe, dzieli się na: mannozozależne fimbrie typu 1 (MST1F), występujące u większości serowarów, w tym u *S. Enteritidis* oraz mannozooporne fimbrie typu 1 (MRT1F) występujące u nielicznych serowarów, głównie mających zdolność do infekowania jednego gospodarza, m.in. u *S. Gallinarum*. Wielokrotnie pokazywano wpływ MST1F zarówno na adhezję i inwazję do

komórek eukariotycznych jak i na kolonizację przewodu pokarmowego, w której T1F, wiążąc się bezpośrednio do jego nabłonka, miałyby zapobiegać mechanicznemu usunięciu bakterii z przewodu pokarmowego. Niemniej jednak oprócz prac wykazujących wpływ tych struktur we wczesnym etapie patogenezы, są także liczne prace, które ukazują brak różnic bądź zwiększoną zdolność do kolonizacji jelit u szczepów pozbawionych T1F. W przypadku MRT1F i ich roli w adhezji i inwazji do komórek eukariotycznych oraz w przebiegu zakażenia u drobiu danych jest zdecydowanie mniej. Nieliczne prace wykazują ich wpływ w adhezji do kurzych leukocytów a także na ich wirulencję wobec jednodniowych kurcząt.

Drób odgrywa kluczową rolę w łańcuchu zakażeń pałeczkami *Salmonella* u ludzi, a dwoma kluczowymi typami komórek eukariotycznych biorącymi udział zarówno we wczesnej jak i późniejszej patogenezы tych pałeczek, są odpowiednio komórki nabłonka jelit i makrofagi. Jednocześnie pałeczki *S. Enteritidis* i *S. Gallinarum*, pomimo pokrewieństwa filogenetycznego i przynależności do tej samej grupy serologicznej, wykazują odmienny sposób zakażenia tego gatunku, tj. *S. Enteritidis* w większości powoduje miejscowe zapalenie jelit, a *S. Gallinarum* chorobę ogólnoustrojową zwaną tyfusem kur. W związku z powyższym oraz ze względu na to, że brak jest badań *in vitro* na ustalonej kurzej linii komórek nabłonka jelit a ilość danych dotyczących adhezji i inwazji do kurzych makrofagów jest bardzo ograniczona, zdecydowano się na analizę adhezji oraz inwazji pałeczek *S. Enteritidis* i *S. Gallinarum* po zakażeniu linii komórkowych tego gatunku zwierząt: nabłonkowej CHIC – 8E11 oraz makrofagopodobnej HD11. Ponadto, ze względu na to, że przeżywalność bakterii w komórkach i cytotoksyczność, wywoływana przez pałeczki *Salmonella* wobec komórek jest niezbędną strategią w promocji zakażenia oraz to, że wykazano mnogość typów śmierci indukowanej przez te bakterie, postanowiono określić przeżywalność bakterii oraz cytotoksyczność przez nie powodowaną, ze wskazaniem kaspazy, która ma dominujący udział w tym procesie. W tym celu utworzono mutanty delecyjne serowarów *S. Enteritidis* i *S. Gallinarum*, w których przy użyciu systemu rekombinazy faga lambda, zamieniono na drodze homologicznej rekombinacji gen *fimH* na kasetę z opornością kanamycynową. Brak ekspresji białka *FimH* skutkuje brakiem ekspresji T1F. Analiza fenotypowa wykazała, że: (1) utworzone mutanty, w przeciwieństwie do szczepów dzikich, nieekspresjonują T1F; (2) nie ma różnic pomiędzy mutantami i odpowiadającymi im szczepami dzikimi, ani w krzywej wzrostu hodowli bakterii, ani w ich morfologii ocenianej na podstawie obserwacji pod mikroskopem fluorescencyjnym bakterii uprzednio zabarwionych oranżem akrydyny. Wnioskując stąd, że powstałe szczepy niezdolne do ekspresji T1F są odpowiednim modelem

do dalszych badań, przystąpiono do analizy funkcjonalnej. Wykazano, że adhezja i inwazja do kurzych ustalonych linii nabłonka jelit CHIC - 8E11 i makrofagopodobnych HD11, w przypadku serowaru nieograniczonego pod względem gospodarza zachodzi przy udziale MST1F i jest zależna od mannozy, gdyż mutant nieekspresjonujący tych fimbrii oraz szczep dziki inkubowany z 0,2M D-mannozą, wykazywały około 5-krotnie mniejszą adhezję i inwazję do tych komórek. Z drugiej strony, nie odnotowano różnic w powyższych procesach pomiędzy szczepem dzikim *S. Gallinarum* a mutantem nieekspresjonującym MRT1F, co więcej liczba jednostek tworzących kolonie (ang. Colony Forming Units, CFU) tego serowaru była jeszcze mniejsza w stosunku do mutantu *S. Enteritidis* pozbawionego możliwości ekspresji MST1F. Przy badaniu określającym przeżywalność bakterii wewnątrz analizowanych linii komórkowych, CFU wykazały tę samą tendencję co przy testach adhezji i inwazji. Przeżywalność wyrażona jako stosunek bakterii wewnątrz komórek eukariotycznych po 24 godzinach inkubacji do ilości bakterii po 1 godzinie inkubacji, z uwzględnieniem liczby komórek eukariotycznych, jest na porównywalnym poziomie u wszystkich serowarów, bez względu na obecność bądź brak T1F. Różnice natomiast obserwuje się w przeżywalności bakterii w poszczególnych modelach komórkowych, tj. pałeczki *Salmonella* najlepiej przeżywają w komórkach linii HD11 traktowanych LPS, w których jak się okazało dochodzi nawet do namnażania bakterii, a w pozostałych komórkach (nabłonkowych i makrofagopodobnych spoczynkowych oraz makrofagopodobnych traktowanych PMA), przeżywalność jest około 2-3 krotnie mniejsza. Bakterie przeżywając wewnątrz komórek indukują jednocześnie ich śmierć. Od około roku 2000, śmierć wywoływana przez większość serowarów pałeczek *Salmonella* nazywana jest pyroptożą. Jest to prozapalna śmierć komórki, w której udział bierze kaspaza - 1, a do dezintegracji błony komórkowej może dochodzić już po pierwszej godzinie od rozpoczęcia procesu. Sprawdzono, że opisywane serowary nie powodują cytotoksyczności po 24 godzinach inkubacji wobec ustalonej linii komórek nabłonka jelit CHIC – 8E11. W przypadku linii komórek makrofagopodobnych HD11, nie obserwuje się także ich śmierci w wyniku zakażenia serowarem *S. Gallinarum*, bez względu na obecność bądź brak MRT1F. Wywołuje ją natomiast serowar *S. Enteritidis*, przy czym najwyraźniej zaznaczone jest to po traktowaniu komórek LPS. W takim modelu sprawdzono obecność aktywnych kaspaz: propyroptotycznej - 1 i proapoptotycznych - 3 i 7. Tak jak się spodziewano, przy infekcji *S. Enteritidis* dochodziło do aktywacji kaspazy-1, przy nieznacznej aktywności kaspazy-3 i -7, która była na poziomie kontroli negatywnych.

Podsumowując, powyższe badania przybliżyły rolę MST1F oraz MRT1F pochodzących kolejno od pałeczek *S. Enteritidis* i *S. Gallinarum* w adhezji, inwazji oraz przeżywalności i cytotoksyczności oraz wniosły nowe informacje o tych najważniejszych etapach patogenezы wyżej wymienionych serowarów u drobiu, na modelu ustalonych kurzych linii komórkowych.

The role of type 1 fimbria in adhesion and invasion as well as the survival and cytotoxicity of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Gallinarum towards chicken cell lines

Salmonellosis are one of the most frequent zoonotic foodborne diseases, which are most often caused by the serovars *Salmonella* (*S.*) Enteritidis and *S. Typhimurium*. Serovar *S. Gallinarum*, on the other hand, can only infect poultry and, while it is not an epidemiological threat to humans, it can cause significant economic losses cause of infection of poultry flocks. Moreover due to its unique features, it is an interesting research model on the pathogenesis of these bacilli.

The first stage of pathogenesis of *Salmonella* in humans and animals, including poultry, is the colonization of the intestinal tract. One of the structure facilitating this process are type one fimbriae(T1F), proteinaceous filamentous outermembrane structures, that can be used for the cell adhesion process. T1F, depending on the ability to bind mannose, and thus the mannose-rich glycoproteins, can be divided into: (1) mannose-sensitive type 1 fimbriae(MST1F), expressed by *S. Enteritidis* - infecting humans as well as many animals; (2) mannose-resistant type 1 fimbriae (MRT1F), expressed by *S. Gallinarum*, infecting only poultry. The role of MST1F for adhesion and invasion to eukaryotic cells and for colonization of the gastrointestinal tract in which T1F by binding directly to its epithelium, would prevent the mechanical removal of bacteria from the gastrointestinal tract, has been shown many times. However, in addition to studies showing the influence of these structures in the early stage of pathogenesis, there are also numerous studies that show no differences or an increased intestinal colonization capacity in T1F deficient strains. In the case of MRT1F and their role in adhesion and invasion to eukaryotic cells and in the course of infection in

poultry, the data is much less. Few studies show their effect on adhesion to chicken leukocytes and on virulence towards day-old chickens.

Poultry plays a main role in the human *Salmonella* chain of infections, and the two key types of eukaryotic cells involved in both early and late pathogenesis of these bacilli are intestinal epithelial cells and macrophages, respectively. At the same time, *S. Enteritidis* and *S. Gallinarum*, despite their phylogenetic relationship and belonging to the same serological group, show a completely different type of infection of this species. Due to the above and due to the lack of in vitro studies on the established chicken intestinal epithelial cell line and that the amount of data on adhesion and invasion to chicken macrophages is very limited, it was decided to analyze the adhesion, invasion and survival of *S. Enteritidis* and *S. Gallinarum* after infection of chicken cell lines: epithelial CHIC-8E11 and macrophage-like HD11. Moreover, due to the fact that the cytotoxicity caused by *Salmonella* is an essential strategy in the promotion of infection and the multitude of types of cell death induced by these bacteria has been demonstrated, it was decided to determine the cytotoxicity, indicating the caspase that is dominant in this process.

For this purpose, deletion mutants of *S. Enteritidis* and *S. Gallinarum* serovars were created in which the *fimH* gene was converted by homologous recombination into a kanamycin resistance cassette using the lambda phage recombinase system. Lack of expression of the FimH protein results in no expression of T1F. Phenotypic analysis showed that: (1) the created mutants did not express T1F, unlike the wild-type strains; (2) there are no differences between the mutants and the corresponding wild-type strains, neither in the growth curve of bacteria culture, nor in their morphology assessed on the basis of observation of bacteria previously stained with acridine orange under a fluorescence microscope. Concluding that the resulting strains incapable of T1F expression are a suitable model for further research, functional analysis was conducted. Subsequently, it was established that adhesion and invasion to chickens established intestinal epithelial line CHIC - 8E11 and macrophage-like HD11 line, in the case of the unrestricted host serovar, occurs with the participation of MST1F and is mannose-dependent, as the mutant not expressing these fimbriae showed about 10 times less adhesion and invasion into these cells. On the other hand, there were no differences in the above processes between the wild-type strain of *S. Gallinarum* and their mutant not expressing MST1F, moreover, the amount of bacteria was similar, even less to the mutant *S. Enteritidis* unable to express MST1F. In the study determining the survival of bacteria inside the analyzed cell lines, the absolute values of the

number of colony forming units (CFU), showed the same trend as in the adhesion and invasion tests. In contrast, survival expressed as the ratio of bacteria inside macrophages after 24 hours of incubation to the number of bacteria after 1 hour of incubation is comparable for all tested serovars and T1F has no influence on it. The only difference is that all serovars survive 2-3 times better in LPS – stimulated HD11 cell line than rest of cell models. Bacteria surviving inside cells can induce their death at the same time. Since around 2000, one of the death types caused by most *Salmonella* serovars has been called pyroptosis. It is a pro-inflammatory cell death, in which caspase-1 is involved, and the disintegration of the cell membrane occurs already after the first hour of the beginning of the process. It was verified that the described serovars did not cause cytotoxicity after 24 hours of incubation against the chicken intestinal epithelial cell line CHIC-8E11. In the case of the HD11 macrophage-like cell line, death is not observed as a result of *S. Gallinarum* infection, regardless of the presence or absence of MRT1F. On the other hand, it is caused by the *S. Enteritidis* and more significant effect occurs after LPS treatment of cells. In this model, the presence of active caspases was checked: pro-pyroptotic - 1 and pro-apoptotic – 3 and 7. As expected, *S. Enteritidis* infection resulted in activation of caspase-1 with little caspase3 and 7 activity.

Summarizing, the above studies introduced the role of MST1F and MRT1F expressed by respectively *S. Enteritidis* and *S. Gallinarum*, in adhesion, invasion, survival and cytotoxicity towards chicken cell lines and give new insight into main steps of pathogenesis of poultry salmonellosis caused by these serovars on the model of established cell lines.

