

Praca doktorska

Rola adhezyny FimH fimbrii Typu 1 *S. Gallinarum* i *S. Enteritidis* w zakażeniu heterofili kury domowej

The role of type 1 fimbriae in chicken heterophil infection by *S. Gallinarum* and *S. Enteritidis*

lek. wet. Aleksandra Tabiś

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem:

prof. dr hab. Macieja Ugorskiego

promotor pomocniczy:

dr hab. Krzysztof Grzymajło, prof. UPWr

w Katedrze Biochemii i Biologii Molekularnej

Wydziału Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

STRESZCZENIE

Rola adhezyny FimH fimbrii Typu 1 S. Gallinarum i S. Enteritidis w zakażeniu heterofili kury domowej

Zakażenia pałeczkami *Salmonella* są główną przyczyną zatruc pokarmowych w Polsce i drugą najczęstszą przyczyną zatruc pokarmowych w Europie. Pomimo wysiłków prawnych oraz wzmożonej kontroli weterynaryjnej w dalszym ciągu zoonoza ta stanowi poważny problem. Jako główne źródło zakażenia uznaje się mięso drobiowe oraz jaja. Serowarem stanowiącym najczęstszy czynnik epizootyczny dla ludzi jest *S. Enteritidis*, która jest patogenem niezależnym od gospodarza i jest zdolna do zakażenia wielu gatunków ssaków oraz ptaków. *S. Gallinarum*, patogenna jedynie, dla drobiu, stanowi przyczynę znacznych strat ekonomicznych w hodowli w krajach rozwijających się. Oba patogeny znacznie różnią się przebiegiem zakażenia oraz wywoływanymi objawami. Wykazano, że za pierwszy etap zakażenia, czyli adhezję pałeczek jelitowych do enterocytów, odpowiadają fimbrie typu I. Ostatnie badania pokazały, że w adhezji do, a także inwazyjności pałeczek *S. Enteritidis* wobec komórek nabłonka jelit kury, a także kurzych makrofagów kluczową rolę odgrywają mannozo-zależne fimbrie typu 1 (MST1F- ang. mannose sensitive fimbriae type 1). Natomiast, w przypadku pałeczek *S. Gallinarum*, ich adhezja i inwazyjność względem tych samych komórek, nie była zależna od wytwarzanych przez ten serowar fimbrii typu 1, które określane są mianem fimbrii mannozo-niezależnych (MRT1F- ang. mannose resistant fimbriae type 1). Wykazano również, że fimbrie typu 1 odgrywają istotną rolę w wyższej inwazyjności pałeczek *S. Enteritidis* w porównaniu z *S. Gallinarum* wobec tych komórek. Spośród komórek ważnych z punktu patogenezy zakażeń drobiu przez pałeczki *Salmonella* najmniej uwagi poświęcono do tej pory heterofilom, brak jest również jakichkolwiek informacji dotyczących udziału fimbrii typu 1 w adhezji i inwazyjności pałeczek *S. Enteritidis* i *S. Gallinarum* do tych komórek.

Punktem wyjścia było określenie czy heterofile kury mają na swej powierzchni białka zdolne do specyficznych oddziaływań z adhezynami FimH fimbrii typu 1 zarówno *S. Enteritidis* jak i *S. Gallinarum*. Rekombinowane białko EscFimH wiązało się do dwóch pasm białkowych o pozornych masach cząsteczkowych 160 kDa oraz 120 kDa i oddziaływania te były, zgodnie z oczekiwaniami, hamowane przez 0,2 M D-mannozę. Mannozo-zależne wiązanie białka FimH *S. Enteritidis* obserwowano również w przypadku białek makrofagów (pasma białkowe o p.m.cz. 95 kDa i 120 kDa) i enterocytów kury (pasma białkowe o p.m.cz. 90 kDa i 120 kDa), a także ludzkich neutrofilów (pasma białkowe o p.m.cz. 120 kDa i 160 kDa). Nieaktywny wariant fimbrii typu 1 reprezentowany przez rekombinowane białko GscFimH wiązał się do trzech pasm białkowych o pozornych masach cząsteczkowych 35 kDa, 65 kDa oraz 68 kDa na błonie heterofili i oddziaływania te, znowu zgodnie z oczekiwaniami, nie były hamowane przez 0,2 M D-mannozę. Mannozo-niezależny charakter wiązań obserwowano także w przypadku białek makrofagów

(pasma białkowe o p.m.cz. 62kDa) i enerocytów kury (pasma białkowe o p.m.cz 62kDa). Specyficzność tych oddziaływań potwierdza zastosowanie adhezyny FimH *S. Gallinarum* z mutacją i78^T przywracającą zdolność wiązania struktur cukrowych bogatych w mannozę. Taka adhezyna wiąże się do białek heterofili w analogiczny sposób jak białko FimH *S. Enteritidis* i jest ono hamowane przez D-mannozę. Wykazano, że żaden z badanych wariantów nie posiada potencjalnego receptora na błonie limfocytów B oraz limfocytów T kury domowej. Posługując się metodą obliczeniową funkcjonału gęstości B3LYP, obliczono potencjalne różnice w strukturze trzeciorzędowej białka FimH. Do tego celu wybrano fragmenty łańcuchów aminokwasowych, kluczowe ze względu na zdolność do wiązania reszt „bogatych w mannozę”. Analiza pokazała, iż podstawienie treoniny (FimH *S. Enteritidis*) izoleucyną (FimH *S. Gallinarum*) prowadzi do zmian w geometrii wnętrza domeny lektynowej, głównie w strukturze pierwszorzędowej i sprowadza się do zwiększenia powierzchni tego obszaru białka, a także zwiększenie objętości cząsteczek. Można więc przyjąć, iż izoleucyna może stanowić przeszkodę steryczną przy przyłączaniu potencjalnego receptora. Ponadto pomiędzy obydwoma peptydami istnieje istotna różnica w zmianie rozkładu gęstości elektronowej. Tak duże zmiany związane z polaryzacją cząsteczki, mogą przekładać się na zmianę preferencji względem potencjalnych receptorów, zwłaszcza bogatych w reszty cukrowe.

W testach *in vitro*, z użyciem szczepów bakteryjnych hodowanych w warunkach ekspresji fimbrii typu 1, wskazano wyższą zdolność pałeczki *S. Enteritidis* (MST1F) do adhezji oraz inwazji przez heterofile oraz makrofagi w porównaniu do *S. Gallinarum* (MRT1F). Warty uwagi jest fakt, że do heterofili adheruje 3-krotnie mniej pałeczek *S. Enteritidis* a niżeli do makrofagów HD11. Podobne zjawisko obserwowane jest w przypadku inwazji, gdzie liczba bakterii 2-krotnie zwiększa się w przypadku makrofagów. Niezależnie od fagocyty liczebność *S. Gallinarum* niezmienia się. Z punktu widzenia kolonizacji narządów gospodarza najważniejsza jest przeżywalność pałeczek *Salmonella*. Zdolność do przeżycia obu serowarów po upływie 6h i 24h wynosi blisko 90% w przypadku makrofagów kurzych, a badania te znajdują liczne potwierdzenie w aktualnej literaturze. Przeżywalność bakterii w heterofilach po 6h i 24h dla obu serowarów wyniosła ok. 20%. Na wewnątrzkomórkową przeżywalność pałeczek *Salmonella*, szczególnie komórek fagocytyujących, znaczący wpływ ma odpowiedź obronna komórek gospodarza w postaci produkcji reaktywnych form tlenu i reaktywnych form azotu. Wykazano, że zakażenie *S. Enteritidis* istotnie zwiększa stres oksydacyjny w postaci ROS i RNS w porównaniu do *S. Gallinarum*, zarówno w heterofilach jak i makrofagach HD11. Wydaje się słusznym, stwierdzenie, że niska przeżywalność pałeczek *Salmonella* w heterofilach wiąże się z wyższą produkcją ROS i RNS. Jednakże doświadczalnie pokazano, że wybuch tlenowy oraz produkcja reaktywnych form azotu jest istotnie niższa w porównaniu z makrofagami. Wyjaśnieniem tego zjawiska może być fakt nieposiadania przez heterofile, w przeciwieństwie do neutrofilii ssaczy mieloperoksydazy, enzymu

pełniącego ważną rolę przy indukcji wybuchu tlenowego. Zatem skuteczna neutralizacja patogenów w tym wypadku zapewne zależy od innego mechanizmu bójczego tych komórek .

The role of type 1 fimbriae in chicken heterophil infection by S. Gallinarum and S. Enteritidis

Salmonella infections are the main cause of food born disease in Poland and the second most common cause in Europe. Despite legal efforts and increased veterinary control, this zoonosis continues to be a serious problem. Poultry meat and eggs are considered to be the main source of infection. *S. Enteritidis*, which is a host-independent nontyphoidal pathogen. The disease caused by host-adapted to poultry *S. Gallinarum* in chickens known as fowl typhoid, poses a great threat to the poultry industry mainly in developing countries. Virulence of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars has remained an important and current research problem for many years. It has been shown that the first stage of infection, the adhesion to enterocytes, is mediated by type I fimbriae. Recent studies have shown that fimbriae type 1 plays a key role in adhesion and invasion to chicken macrophages of *S. Enteritidis* (MST1F - mannose sensitive fimbriae type 1). However, in the case of *S. Gallinarum*, their adhesion and invasiveness to the same cells was not dependent on the type 1 fimbriae, which are referred to as mannose-independent fimbriae type 1 (MRT1F). It was also shown that type 1 fimbriae play a significant role in the higher invasiveness of *S. Enteritidis* compared to *S. Gallinarum* to these cells. Among the cells important for the pathogenesis of *Salmonella* infections in poultry, the least attention has been paid to heterophiles, and there is no information on the involvement of type 1 fimbriae in the adhesion and invasiveness of *S. Enteritidis* and *S. Gallinarum* to these cells.

It was important to determine whether chicken heterophiles have specific proteins on their surface capable of binding FimH adhesins of type 1 fimbriae of both *S. Enteritidis* and *S. Gallinarum*. The recombinant EscFimH protein bound to two protein bands with molecular weights of 160 kDa and 120 kDa, and these interactions were inhibited by 0.2 M D-mannose, as expected. Mannose-dependent binding of *S. Enteritidis* FimH protein was also observed in macrophage proteins (95 kDa and 120 kDa protein bands) and chicken enterocytes (90 kDa and 120 kDa protein bands) as well as human neutrophils (120 kDa and 160 kDa protein bands). The inactive fimbriae type 1 represented by the recombinant GscFimH protein bound to three protein bands with molecular weights of 35 kDa, 65 kDa and 68 kDa on the heterophile membrane, and these interactions, as expected, were not inhibited by 0.2 M D- mannose. The mannose-independent nature of the binding was also observed in the case of macrophage proteins (62kDa protein band) and chicken enterocytes (62kDa protein band). The specificity of these interactions is confirmed using *S. Gallinarum* FimH adhesin with the I78T mutation restoring the ability to bind sugar structures rich in mannose. Adhesin with allelic mutation binds to heterophile proteins in an analogous way to the FimH protein of *S. Enteritidis* and is inhibited by D-mannose. It has been shown that none of the tested variants has a putative receptor on the membrane of B lymphocytes and T lymphocytes. *In silico* the analysis of the natural bond orbitals showed that the substitution of threonine (FimH *S. Enteritidis*) with isoleucine (FimH *S. Gallinarum*)

does not lead to disturbance of the secondary structure of protein. The fundamental change occurs in the geometry and the electron density distribution in the binding domain. Replacing the "smaller" threonine amino acid with the "larger" isoleucine increases the surface area of this region of the protein and may be a steric hindrance to the binding of a potential receptor. Large differences related to the polarization of the molecule may translate into a change in preferences for potential receptors, especially those rich in sugar residues.

In vitro tests using bacterial strains cultured under conditions of expression of type 1 fimbriae showed a higher ability of *S. Enteritidis* (MST1F) to adhere to and invade by heterophiles and macrophages compared to *S. Gallinarum* (MRT1F). It is worth noting that 3 times less *S. Enteritidis* bind to heterophiles than to HD11 macrophages. A similar phenomenon is observed in the case of invasion, where the number of bacteria doubles in the case of macrophages. Regardless of the phagocyte, the number of *S. Gallinarum* does not change. For successful organ colonization, survival is an important factor. The survival of both serovars after 6h and 24h is close to 90% in the case of chicken macrophages, and these studies are widely confirmed in the current literature. Survival of bacteria in heterophiles after 6h and 24h for both serovars was about 20%. The intracellular survival of *Salmonella*, especially phagocytic cells, is significantly dependent on production of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). *S. Enteritidis* infection has been shown to significantly increase oxidative stress in the form of ROS and RNS compared to *S. Gallinarum* in both heterophiles and HD11 macrophages. It seems reasonable to conclude that the low survival rate of *Salmonella* in heterophiles is associated with higher production of ROS and RNS. However, it has been experimentally shown that the oxygen burst, and the production of reactive nitrogen species is significantly lower compared to macrophages. The explanation for this phenomenon may be the fact that heterophiles, in contrast to mammalian neutrophils, do not produce myeloperoxidase, an enzyme that plays an important role in the induction of an oxygen burst. Therefore, effective neutralization of pathogens in this case probably depends on another killing mechanism of these cells.