

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ – ХЕМИЈСКИ ФАКУЛТЕТ

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Образложење предлога теме докторске дисертације кандидаткиње Јелене Пантовић, мастер биохемичара

Молим Наставно-научно веће Универзитета у Београду – Хемијског факултета да одобри израду докторске дисертације под радним насловом: **„Механизми адаптације бактерије *Salmonella Enteritidis* на масне киселине кратког ланца и њихов утицај на процес инфекције и развој резистенције на антибиотике“**.

1. Научна област: Хемијске науке

1а. Ужа научна област: Биохемија

2. Предмет научног истраживања

Salmonella spp. су међу најчешћим узрочницима болести преносивих храном. На глобалном нивоу, процењено је да нетифусне *Salmonella* spp. изазивају око 78 милиона салмонелоза, при чему су *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) и *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*) одговорне за око 70% случајева. У Европи се годишње пријављује око 90 000 случајева салмонелоза, али процене указују да на сваки пријављени случај постоји у просеку 57 нерегистрованих инфекција, углавном због асимптоматског тока. Узимајући у обзир наведене бројеве као и све учесталију детекцију резистентних сојева на клинички релевантне антибиотике, Светска здравствена организација је прошле године одређене врсте Салмонеле сврстала у приоритетне.

Способност салмонеле да расте и преживи у лумену црева зависи од присуства цревне микробиоте. Успешна инфекција захтева способност Салмонеле да превазиђе заштитне механизме посредоване коменсалним бактеријама црева домаћина. Заштита од патогена се, углавном, заснива на три механизма: I) производњи антимикробних молекула, II) ограничењу хранљивих материја неопходних за метаболизам патогена и III) имунској одбрани посредованој микробиотом.

Микробиота је кључна за варење, апсорпцију супстрата и хомеостазу имунског система. Бактеријски ензими биотрансформишу многе природне протеине, липиде и угљене хидрате у интермедијере или крајње производе који могу модулисати хомеостазу и епителне ћелије црева. Како људима недостају ензими за разградњу несваривих угљених хидрата, ови молекули се анаеробно ферментишу помоћу различитих бактеријских врста. На овај начин настају антимикробни метаболити као што су масне киселине кратког ланца (*eng. short chain fatty acids* – SCFA). Масне киселине кратког ланца су органске киселине, састављене од једног до шест атома угљеника, које имају различите улоге. Најзаступљеније су ацетат, пропионат и бутират које се производе у моларном односу 60:20:20, респективно. Бутират је значајан извор енергије за колоноците и има важну улогу у борби против карцинома тако што стимулише апоптозу ћелија и регулише експресију гена преко хистон деацетилазе. Пропионат је енергетски извор за епителне ћелије и хетапоците јер представља прекурсор за глуконеогенезу. Ацетат се може пренети у периферна ткива где се користи за липогенезу и метаболизам холестерола. Са друге стране, показано је да наведене масне киселине могу утицати на експресију бактеријских гена. Такође, масне киселине могу инхибирати раст Салмонеле снижавањем рН вредности средине. У благо киселим условима, масне киселине доводе до промене интрацелуларне рН зато што њихови протоновани облици лако могу проћи кроз ћелијску мембрану бактерије. На тај начин бактерије нису у могућности да користе кисеоник или анаеробне акцепторе електрона. Међутим, упркос наведеним механизмима заштите, неки бактеријски сојеви успевају да успоставе хроничне инфекције у цревима.

Инфекције *S. Enteritidis* и *S. Typhimurim* се могу клинички манифестовати дијарејом, грозницом, абдоминалним болом, мучнином и повраћањем. Због све већег проблема са ширењем антибиотске резистенције, пацијенти са салмонелозама се не лече антибиотцима осим уколико особе нису имунокомпромитоване. Иако се симптоми повлаче у року од недељу дана, код особа са нетретираном салмонелозом постоји већи ризик за развој хроничне инфекције које могу трајати и по неколико година.

Показано је да различите врсте патогених бактерија формирају биофилмове у организму домаћина, при чему долази до успостављања хроничних или перзистентних инфекција. Биофилмови су заједнице микроорганизама обавијени полимерним матриksom који их штити од различитих фактора из спољашње средине. Истраживања су показала да бактерије

које формирају биофилм производе мање фактора вируленције и токсина што представља адаптивну предност за успостављање хроничне инфекције. Такође, унутар биофилма метаболизам је знатно успоренији док је хоризонтални трансфер гена израженији што омогућава брже преношење стечене резистенције унутар популације. На основу ових података, може се претпоставити да *S. Enteritidis* изазива перзистентне инфекције у гастроинтестиналном тракту формирањем биофилма у лумену колона. Биофилмови могу дати предност адхерентним бактеријама стицањем отпорности на антимикробну активност цревне микрофлоре и имунског система домаћина док дуготрајна перзистенција у цревима може бити одговорна за ремоделовање ткива и потенцијално развој карцинома. Са друге стране, неке хроничне инфекције су асимптоматске па се не могу препознати на време што може имати опасне последице по живот.

3. Основна хипотеза

Основна претпоставка ове докторске дисертације је да успостављање дуготрајне инфекције *S. Enteritidis* захтева адаптацију бактерије на услове унутар црева домаћина. Један од могућих механизма је адаптација на масне киселине кратког ланца. Ове адаптације могу укључивати формирање биофилма и развој резистенције против антимикробних молекула коменсалних бактерија и имунског система домаћина. Наведене адаптације за последицу могу имати промене у бактеријској вируленцији.

4. Циљеви истраживања

Главни циљ истраживања је утврђивање адаптационих (фенотипских) и еволуционих (генотипских) механизма резистенције *S. Enteritidis* на присуство масних киселина кратког ланца као и процена могућих последица ове резистенције по домаћина.

Специфични циљеви истраживања:

1. Генерисање адаптираних сојева *S. Enteritidis* ATCC13076 на масне киселине кратког ланца
2. Фенотипска карактеризација дивљих и адаптираних сојева *S. Enteritidis*
3. Одређивање потенцијала адаптираних сојева да формирају биофилм и развију резистенције на конвенционалне антибиотике
3. Утврђивање генетичке основе адаптација на масне киселине кратког ланца
4. Испитивање утицаја адаптација на експресију бактеријских протеина и њиховог ефекта на интеракције бактерија са ћелијама интестиналног тракта

5. Очекивани резултати

Резултати ове докторске дисертације објасниће молекуларне механизме који омогућавају бактерији *S. Enteritidis* да савлада одбрамбене моћи домаћина и успостави перзистентну или хроничну инфекцију. Карактеризација сојева адаптираних на високе концентрације масних киселина кратког ланца показује на који начин метаболити коменсалних бактерија могу да утичу на вирулентна својства ентеропатогених бактерија. Идентификација генетичких основа адаптација *S. Enteritidis* на антимикробне метаболите коменсала може дати основу за дефинисање потенцијалних дијагностичких маркера перзистентних/хроничних инфекција овом бактеријом. Упоредивањем нивоа експресије протеина, односно активности различитих сигналних путева код ћелија црева инфицираних дивљим и адаптираним сојевима *S. Enteritidis* добиће се увид у потенцијално различите одговоре домаћина на акутну односно хроничну инфекцију салмонелом. Ова сазнања могу допринети унапређењу актуелних или увођењу нових ефикаснијих дијагностичких метода као и терапија за лечење перзистентних/хроничних инфекција гастроинтестиналног тракта.

6. Методе истраживања

Експериментални део докторске тезе биће урађен у Групи за социомикробиологију, ИМГГИ. При реализацији тезе користиће се микробиолошке, молекуларно-биолошке, биохемијске и биоинформатичке методе.

Бактеријски сојеви: Референтни сој одабраног патогена набављен из АТСС колекције.

Микробиолошке методе: Стандардне микробиолошке методе биће коришћене за пресејавање, гајење и чување бактеријских сојева, изоловање чистих култура и одређивање минималне инхибиторне концентрације масних киселина кратког ланца.

Адаптација на појединачне масне киселине и њихову смешу биће развијена излагањем бактерија растућим концентрација киселина током одређеног броја генерација све док се не добију сојеви отпорни на концентрације које су значајно више од физиолошких. Еволуција ће бити рађена у присуству масних киселина као селекционог притиска. Бактерије пресејаване у одсуству масних киселина користиће се за детекцију и разликовање спонтаних мутација.

Брзина раста адаптираних сојева у односу на контроле ће бити одређена упоређивањем криви раста при различитим концентрацијама масних киселина. Покретљивост (пливање и ројење) ће бити одређена тест есејима на полуврстим подлогама. Осетљивост на различите класе антибиотика и друге масне киселине биће праћена стандардним микродилуционим есејем. Формирање биофилма ће бити квантификовано мерењем биомасе биофилма коришћењем кристал виолет боје. Тест есеји на чврстој подлози ће се користити за детектовање осетљивости адаптираних сојева на антимикробне метаболите које производе различити сојеви лактобацилуса. Осетљивост ће бити детектована као зоне просветљења око засејаног соја.

За испитивање ефекта адаптираних сојева *S. Enteritidis* на ћелије црева, монослој конфлуентних здравих ћелија колона и мукус-продукујућих HT29-MTX ћелија, пореклом из аденокарцинома дебелог црева, биће инфициране одабраним адаптираним сојевима и одговарајућим контролама. Наведене ћелијске линије су комерцијално доступне. Цитотоксичност адаптираних сојева/контрола према еукариотским ћелијама биће испитивана помоћу есеја у којем се мери количина ослобођене лактат дехидрогеназе из лизираних ћелија. По завршетку инкубације и провере цитотоксичности, за потребе протеомске анализе, бактеријски и/или хумани ћелијски лизати ће бити припремљени у 8M уреи.

Молекуларно-биолошке методе: Секвенцирање целог генома ће се користити за откривање молекуларних механизма који стоје иза стечених адаптација на масне киселине, а мутације које су одговорне за адаптацију ће бити идентификоване коришћењем биоинформатичких алата дизајнираних за проучавање еволуције микробних генома. Геномска ДНК ће бити екстрахована комерцијално доступним китовима. За припрему библиотека фрагмената који ће бити секвенцирани са краја (*eng.* pair-end library) користиће се одговарајући китови, у зависности од секвенцера друге генерације на ком ће узорци бити секвенцирани (Illumina или BGI/MGI платформа). Након селекције релевантних мутација, њихов ефекат на уочени фенотип ће бити проверен генерисањем мутаната за одабране гене. Флуоресцентна микроскопија ће се користити за визуелизацију инфекција. Флуоресцентно обележени сојеви патогена ће се генерисати векторима који садрже гене за експресију зеленог протеина (GFP).

Биохемијске методе: За испитивање промена у сигналним путевима ћелија колона насталих директном интеракцијом хуманих ћелија са адаптираним сојевима *S. Enteritidis* користиће се нетаргетована LC/MS протеомика. Ћелијски и/или бактеријски протеински лизати ће бити редуковани, карбоксилатовани, трипсинизовани и расољени након чега следи LC/MS анализа Bruker timsTOF Pro масеним спектрометром. Предложена методологија би омогућила ефикасну идентификацију протеина и релативну квантификацију са високим степеном детекције.

Биоинформатичке методе: Геноми ће бити секвенцирани са покривеношћу (дубина секвенцирања) $\geq 100\times$. Квалитет добијених сирових података биће проверен коришћењем FastQC алата, док ће се за уклањање секвенци адаптера користити Trimmomatic или неки други сличан стандардни алат. За анализу мутација користиће се breseq алат (алат командне линије), који у себи интегрише корак склапања целих генома методом мапирања кратких читавања (*eng.* short reads) директно на референтну секвенцу генома. Овај алат ће се користити у тзв. „polymorphism mode“ која омогућава детекцију варијанти (мутације на нивоу једног нуклеотида, инсерције и делеције) у мешовитим популацијама, односно као резултат не генерише консензус геном.

Подаци из протеомике ће бити анализирани коришћењем DIA-NN (*eng.* Data-Independent Acquisition by Neural Network). Референтне секвенце за хумане и бактеријске ћелије из Uniprot базе података ће се користити за генерисање спектралних библиотека. Perseus софтвер ће бити коришћен за идентификацију, импутацију и квантификацију протеина док ће се за сигналне путеве и регулаторне анализе користити јавно доступни алати као што су STRING или Reactome.

7. Списак стручне литературе која ће се користити

- Ehrhardt, K. et al. (2023) Determinants of persistent *Salmonella* infections. *Current Opinion in Immunology*, 82: 102306 <https://doi.org/10.1016/j.coi.2023.102306>
- Gal-Mor, O. (2019) Persistent Infection and Long-Term Carriage of Typhoidal and Nontyphoidal salmonellae. *Clinical Microbiology Reviews*, 32:e00088-18 <https://doi.org/10.1128/cmr.00088-18>
- Luk CH, Valenzuela C, Gil M, Swistak L, Bomme P, ChangY-Y, et al. (2021) *Salmonella* enters a dormant state within human epithelial cells for persistent infection. *PLoS Pathogens* 17(4): e1009550 <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009550>
- Dalile, B., Van Oudenhove, L., Vervliet, B. *et al.* (2019) The role of short-chain fatty acids in microbiota–gut–brain communication. *Nature Review Gastroenterology & Hepatology* **16**, 461–478 <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0157-3>
- van de Hee, Bart et al. (2021) Microbial Regulation of Host Physiology by Short-Chain Fatty Acids. *Trends in Microbiology*, 29, 8, 700-712 <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.02.001>
- Deng, L. et al. (2024) Colonization resistance: the role of gut microbiota in preventing *Salmonella* invasion and infection. *Gut Microbes*, 16(1) <https://doi.org/10.1080/19490976.2024.2424914>
- Calhoun, L.N., Liyanage, R., Lay, J.O. *et al.* (2010) Proteomic analysis of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis following propionate adaptation. *BMC Microbiology* 10, 249 <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-249>