

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Molekulární biologie a biochemie organismů

Studijní obor: Speciální chemicko-biologické obory



**Paulína Mathéová**

Heterogenita expresie faktorov virulencie baktérií rodu *Salmonella*

Heterogeneity of expression of virulence factors of *Salmonella*

Bakalárska práca

Školiteľ: RNDr. Ondřej Černý, Ph.D.

Praha 2021

**Prehlásenie:**

Prehlasujem, že som záverečnú prácu spracovala samostatne, a že som uviedla všetky použité informačné zdroje a literatúru. Táto práca ani jej podstatná časť nebola predložená k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

V Prahe, 5.5.2021

.....

Podpis

Chcela by som sa poďakovať školiteľovi mojej bakalárskej práce RNDr. Ondřejovi Černému, Ph.D. za jeho cenné rady, ochotu pri konzultáciách a hlavne za trpezlivosť a čas, ktorý mi pri príprave bakalárskej práce venoval.

## Abstrakt

Vznik fenotypovo heterogénnych jedincov v rámci izogénnej bakteriálnej populácie sa považuje za významnú adaptáciu na prostredie v hostiteľskom organizme. Umožňuje prežitie niektorých bakteriálnych subpopulácií pod rôznorodým tlakom hostiteľského imunitného systému, vznik „deľby práce“ a kooperáciu medzi jednotlivými baktériami. Baktérie rodu *Salmonella* sú významným patogénom ľudí, aj hospodárskych zvierat. Veľká časť kľúčových faktorov virulencie baktérií rodu *Salmonella* je heterogénne exprimovaná. Fenotypová diverzita jednotlivých baktérií tak umožňuje určitým jedincom uniknúť imunitnému systému hostiteľa a zabezpečiť zachovanie genofondu do ďalších generácií. V prípade, keď zmena podmienok spôsobí úplné vymiznutie časti populácie *Salmonely* z prostredia, dokážu zvyšní jedinci, po prekonaní nepriaznivých podmienok, obnoviť veľkosť populácie a aj fenotypovú diverzitu. Táto práca zhrňa poznatky o heterogenite v expresii faktorov virulencie *Salmonely* a vlastnosti jednotlivých subpopulácií v rôznych environmentálnych podmienkach.

**Kľúčové slová:** *Salmonella*, heterogenita, faktory virulencie, zaistenie stávky, deľba práce, bakteriálne subpopulácie.

## Abstract

The emergence of phenotypically heterogeneous individuals within an isogenic bacterial population is considered to be an important adaptation to the host environment. It allows survival of some bacterial subpopulations under diverse stress conditions caused by the host immune system, the emergence of a "division of labor" and cooperation between individual bacteria. Bacteria of the genus *Salmonella* are important pathogens in humans and livestock. Many of the key virulence factors of *Salmonella* are heterogeneously expressed. The phenotypic diversity of individual bacteria allows certain individuals to escape the host's immune system and ensure that the gene pool is preserved to future generations. In case when change in conditions causes complete extinction of part of the *Salmonella* population from the environment, the remaining individuals are able to restore the size of the population and phenotypic diversity, after overcoming unfavourable conditions. This work summarises the knowledge about heterogeneity of expression of virulence factors of *Salmonella* and the characteristics of individual subpopulations in different environmental conditions.

**Keywords:** *Salmonella*, heterogeneity, virulence factors, bet-hedging, division-of-labor, bacterial subpopulations.

# Obsah

Zoznam použitých skratiek .....	i
Úvod .....	1
1 Baktérie rodu <i>Salmonella</i> .....	2
1.1 Biofilm .....	3
1.2 Bičíky .....	4
1.3 Fimbrie .....	4
1.4 Ostrov patogenity 1 .....	4
1.5 Ostrov patogenity 2 .....	5
1.6 Plazmid podporujúci virulenciu .....	5
1.7 LPS .....	5
2 Biofilm .....	6
3 Bičíky .....	7
3.1 FljB verzus FliC .....	8
3.2 Heterogenita v expresii FliC .....	9
4 Fimbrie .....	12
4.1 Lpf .....	12
4.2 Pef .....	13
4.3 Fim .....	13
4.4 Std .....	14
4.5 Stk .....	14
5 Ostrov patogenity 1 (SPI-1) .....	15
5.1 Heterogenita expresie SPI-1 z pohľadu evolučných stratégií .....	15
5.2 Heterogenita expresie SPI-1 po vstupe do bunky .....	16
6 Ostrov patogenity 2 (SPI-2) .....	19
6.1 SPI-2 a tvorba perzisterov .....	20
6.2 SPI-2 a <i>spv</i> .....	21

7 Lipopolysacharidy (LPS) .....	22
7.1 Expresia pod vplyvom Wzz proteínov .....	22
7.2 Vplyv heterogénnej expresie <i>gtrABC</i> na O antigén .....	23
7.3 Vplyv heterogénnej expresie <i>opvAB</i> na O antigén.....	24
Záver.....	26
Literatúra .....	27

## Zoznam použitých skratiek

Dam	DNA adenín metyltransferáza	DNA adenine methyltransferase
D3	doména 3 flagelínu	domain 3 flagelin
Il-1 $\beta$	interleukín 1-beta	Interleukin 1-beta
Il-4ra	receptor interleukín 4	interleukin 4 receptor
iNTS	invazívne netýfusové sérovary <i>Salmonely</i>	invasive non-typhoidal <i>Salmonella</i>
LPS	lipopolysacharid	lipopolysacharide
MAPK	mitogénom aktivovaná proteínkináza	mitogen-activated protein kinase
NF- $\kappa$ B	nukleárny faktor kappa B	nuclear factor kappa B
Obr.	obrázok	figure
OBS	oblasť viažuca OxyR	OxyR binding site
(p)ppGpp	guanozín (penta) tetrafosfát	guanosine (penta) tetraphosphate
pSLT	plzmid virulencie	virulence plasmid
SCV	vakuola obsahujúca <i>Salmonelu</i>	<i>Salmonella</i> containing vacuole
SPI-1	ostrov patogenity 1	<i>Salmonella</i> pathogenicity island-1
SPI-2	ostrov patogenity 2	<i>Salmonella</i> pathogenicity island-2
TA	toxín/antitoxín	toxin/antitoxin
TLR-4	receptor podobný toll - 4	toll-like receptor 4
TLR-5	receptor podobný toll - 5	toll-like receptor 5
TNF	faktor nádorovej nekrózy	tumor necrosis factor
T3SS	sekrečný systém typu 3	type 3 secretion systeme
WHO	svetová zdravotnícka organizácia	world health organisation



# Úvod

Heterogénna expresia faktorov virulencie je v izogénnej bakteriálnej populácii veľmi dôležitá z hľadiska interakcií medzi patogénom a hostiteľom (Ackermann et al., 2008). Heterogenita umožňuje vznik kooperatívnej virulencie a dá sa vysvetliť dvomi evolučnými stratégiami, konkrétne stratégiou zaistenia stávky (angl. „bet-hedging“) a stratégiou del’by práce (angl. „division of labor“). Bimodálnou expresiou, ktorej prejavy vykazujú prvky stratégie zaistenia stávky baktérie zvyšujú šancu, že aspoň časť z nich prežije nečakanú zmenu v environmentálnych podmienkach. Naopak stratégia del’by práce ukazuje, že cena, ktorú by populácia za expresiu faktorov virulencie platila, môže byť rozdelená medzi jedincov, čo im umožňuje aktívne spolupracovať na kolonizácii hostiteľa. V populácii *Salmonely* sa dajú pozorovať obidve z vyššie spomenutých evolučných stratégií. Navyše je *Salmonela* vhodným modelovým organizmom, a to aj pre štúdiu heterogenity u iných patogénnych baktérií.

Baktérie rodu *Salmonela*, patriace medzi tyčinkovité gram-negatívne enterobaktérie, spôsobujú celosvetovo veľké množstvo významných ochorení, od bežných gastroenteritíd až po život ohrozujúci brušný týfus (WHO, 2018a). Ročne sa brušným týfusom nakazí 11 – 20 miliónov ľudí, z ktorých 128 000 – 161 000 zomrie. (WHO, 2018a). Prenáša sa kontaminovanou vodou a zle upraveným jedlom (WHO, 2018a). Sérovary spôsobujúce brušný týfus sú rozšírené hlavne v krajinách, kde sa na hygienu kladú menšie nároky (WHO, 2018a). Podobne sú v afrických krajinách veľmi rozšírené infekcie invazívnymi netýfusovými sérovarmi *Salmonely* (iNTS), medzi ktoré patrí aj *S. Typhimurium* (van Puyvelde et al., 2019).

Schopnosť uniknúť rozpoznaniu imunitným systémom vďaka heterogénnej expresii faktorov virulencie spolu so schopnosťou spôsobovať perzistentné infekcie je problémom pre efektívnu liečbu (Broadbent et al., 2010). Pochopenie mechanizmov regulujúcich bistabilitu v expresii faktorov virulencie a schopnosť perzistencie u ľudí aj u zvierat nám môže pomôcť v nájdení efektívneho spôsobu liečby infekcie rôznymi sérovarmi *Salmonely* (Broadbent et al., 2010).

Cieľom tejto práce je zhrnúť doterajšie poznatky o heterogénnej expresii faktorov virulencie a ich vplyv na výsledný fenotyp jedincov. V jednotlivých kapitolách budú predstavené výhody a nevýhody expresie faktorov virulencie pre *Salmonelu* a ich mechanizmy.

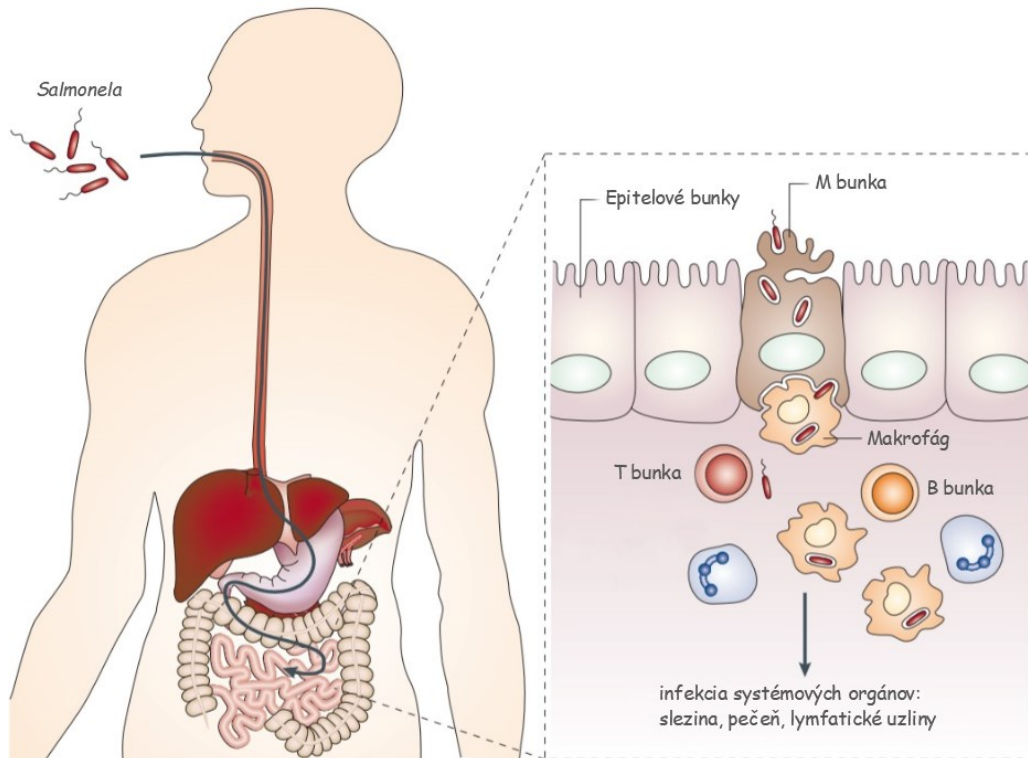
# 1 Baktérie rodu *Salmonella*

Podľa klasifikácie WHO rozdeľujeme rod *Salmonella* na dva druhy – *S. enterica* a *S. bongori* (Reeves et al., 1989). *S. enterica* sa ďalej rozdeľuje na 6 poddruhov, z ktorých 99% ľudských ochorení spôsobujú baktérie patriace do poddruhu *S. enterica* poddruh *enterica* (\*Eng et al., 2015). Zvyšných 5 kategórií spolu s druhom *S. bongori* sa vyskytujú prevažne mimo hostiteľa a napádajú zväčša studenokrvné živočíchy, čiže infekcia človeka je veľmi zriedkavá (\*Eng et al., 2015). Najbežnejšie sérovary napádajúce človeka sú *S. Typhimurium* a *S. Enteritidis* spôsobujúce netýfusový typ ochorenia (WHO, 2018b). *Salmonella* okrem ľudí a živočíchov infikuje aj rastliny. Niektoré sérovary sú špecializované na jeden hostiteľský druh (*S. Typhi* infikuje iba človeka), zatiaľ čo iné infikujú široké spektrum rôznych hostiteľov.

*Salmonella* je fakultatívne intracelulárny patogén. Vďaka svojej všestrannej evolučnej vybavenosti prežije prechod tráviacim traktom a iné zmeny podmienok v prostredí. K napádaniu hostiteľa exprimuje rôzne faktory virulencie, ktoré sú prísne regulované tak, aby ich expresia nastala v správnom čase a na správnom mieste (\*Clements et al., 2001). Expresia faktorov virulencie je často v stave On alebo Off, čiže buď sú exprimované alebo nie. Bimodálna expresia vedie k tvorbe dvoch fenotypovo odlišných subpopulácií. Práve kvôli bimodálnej expresii *Salmonella* dokáže obývať a infikovať rôznorodé niky, prekonávať nepriaznivé podmienky, napríklad tvorbou biofilmu (MacKenzie et al., 2015), prispôbovať sa zmenám prostredia expresiou génov kódovaných na ostrove patogenity 2 (Stapels et al., 2018) a pritom nestráca schopnosť exprimovať žiadny z faktorov virulencie. Výhoda vzniku fenotypovo odlišných subpopulácií z jednej izogénnej populácie, keďže každá zo subpopulácií má výhodu v iných podmienkach, je zachovanie genofondu aj v prípade, že jedna zo subpopulácií z prostredia úplne vymizne, napríklad pri infekcii populácie fágmi (Cota et al., 2015).

*Salmonella* infikuje hostiteľa orálnou cestou pri požití infikovaného jedla alebo vody. Počas infekcie *Salmonella* musí prežiť cestu tráviacim traktom, kým sa dostane do bedrovníku na konci tenkého čreva, kde zahajuje systémovú infekciu (Obr. 1; Carter & Collins, 1974). *Salmonella* napáda bunky črevného epitelu, M bunky, makrofágy a dendritické bunky, ktoré zbierajú vzorky antigénov v črevnom lumen (\*Haraga et al., 2008). Čez M bunky črevného epitelu sa dostáva do Peyerových plakov (Jones et al., 1994). Infikované fagocytické bunky môžu pri migrácii do lymfatických tkanív spôsobiť systémovú infekciu. Pri systémovej infekcii sa *Salmonella* šíri krvou a lymfatickým systémom a kolonizuje slezinu, lymfatické uzliny, pečeň a kostnú dreň. Pri infekcii pečene sa môže dostať do žlčníka, kde niektoré sérovary, ktoré

spôsobujú týfusový typ ochorenia, dokážu tvoriť biofilm, čo vedie k vzniku chronickej infekcie (Gonzalez-Escobedo & Gunn, 2013). Sekrécia zo žlčníka do čriev a následne von z hostiteľa jej umožňuje infikovať ďalších hostiteľov. Pre dlhodobú kolonizáciu hostiteľa je dôležitá, okrem schopnosti tvoriť biofilm, produkcia bičíkov, fimbrií, expresia génov kódovaných na ostrovoch patogenity 1 a 2, expresia génov *spv* operónu a produkcia LPS.



**Obr. 1 – Znáročenie oblastí a typov buniek, ktoré sú pri infikovaní hostiteľa *Salmonelou* kolonizované (preložené z (\*Haraga et al., 2008)).** Infekcia *Salmonelou* nastáva cez ústnu dutinu. Po vstupe do tenkého čreva *Salmonela* napáda epitelové bunky, M bunky, makrofágy a dendritické bunky, cez ktoré sa dostáva do systémových orgánov a spôsobuje systémovú infekciu. Z pečene sa môže dostať do žlčníka a odtiaľ sa dlhodobo šíriť.

## 1.1 Biofilm

Prežívanie v prostredí mimo hostiteľa je zaistené pomocou tvorby biofilmu, ktorá je riadená proteínom CsgD. Populácie *Salmonely* sa vo forme biofilmu vyskytujú na rôznych biotických (rastliny, epitelové bunky, žlčník) aj abiotických (plast, sklo, cement, nehrdzavejúca oceľ) povrchoch (\*Steenackers et al., 2012). Baktérie tvoriace biofilm sú odolnejšie voči nepriaznivým podmienkam, ako napríklad nedostatok živín, vysušenie (Scher et al., 2005) alebo prítomnosť baktericídnych dezinfekčných prostriedkov (Joseph et al., 2001).

## 1.2 Bičíky

*Salmonela* môže súčasne vytvárať až 10 bičíkov, ktoré sú rozmiestnené po celom povrchu bunky. *Salmonelu* teda radíme medzi peritriché baktérie. Produkcia bičíkov je pre baktériu metabolicky náročná (\*Macnab R. M., 2003), keďže jeden bičík môže pozostávať z približne 20 000 flagelínových podjednotiek. Prítomnosť bičíkov predstavuje výhodu *Salmonely* pri súperení s črevnou mikroflórou v podobe rýchlejšieho rastu baktérií, keďže im umožňuje migrovať do živinovo bohatších oblastí v blízkosti črevného epitelu (Stecher et al., 2008). Baktérie, ktoré neexprimujú bičíky, prípadne nie sú schopné chemotaxie, majú zníženú virulenciu v dôsledku neschopnosti efektívne interagovať s epitelovými bunkami (Stecher et al., 2004). Bičíky umožňujú pohyb aj v cytosóle epitelových buniek. Na druhú stranu expresia bičíkov prináša nevýhodu v podobe rozpoznaní flagelínu pomocou TLR-5 receptora, ktorý podnecuje zápalovú odpoveď imunitného systému, čo môže viesť k vytvoreniu heterogenity v expresii bičíkov (Hayashi et al., 2001).

## 1.3 Fimbrie

Fimbrie podporujú inváziu do rôznych typov buniek hostiteľa. Expresia niektorých druhov fimbrií je nutná k spôsobeniu dlhodobých infekcií (Weening et al., 2005), čo umožňuje *Salmonele* postupne infikovať viac hostiteľov ako pri krátkodobej infekcii. Heterogenita sa prejavuje v expresii Lpf, Pef, Fim, Std a Stk fimbrií (\*García-Pastor et al., 2019; Tawfik et al., 2020). Lpf fimbrie prispievajú k iniciácii systémovej infekcie, keďže sprostredkujú interakciu s M bunkami črevného epitelu (Bäumler et al., 1996a). Na interakcii s bunkami črevného epitelu sa podieľajú Pef (Bäumler et al., 1996b) a Fim fimbrie (Althouse et al., 2003). Std fimbrie umožňujú *Salmonele* prichytenie sa na epitelové bunky hrubého čreva a kolonizáciu črevného epitelu (Chessa et al., 2009). Kolonizácia epitelu hrubého čreva je dôležitá k dlhšie trvajúceму šíreniu *Salmonely* fekáliami (Kingsley et al., 2000), čo zvyšuje prenosnosť *Salmonely* do ďalších hostiteľov fekálne-orálnou cestou (Lawley et al., 2008).

## 1.4 Ostrov patogenity 1

Proteíny kódované na ostrove patogenity 1 (*Salmonella* pathogenicity island 1, SPI-1) patria medzi hlavné faktory virulencie *Salmonely*. Na SPI-1 sú kódované efektorové proteíny, proteíny sekrečného systému typu 3 (T3SS) a tiež regulačné proteíny a chaperóny (\*Que et al., 2013), ktoré sa exprimujú po vstupe do tráviaceho traktu hostiteľa. Tam tieto proteíny spôsobia zápal, ktorý je pre *Salmonelu* prospešný (Stecher et al., 2007). Na zápal reagujú epitelové bunky

produkciou antimikrobiálneho proteínu lipocalin-2. Proti lipocalinu-2 je však *Salmonela*, na rozdiel od črevnej mikroflóry, relatívne odolná (Raffatellu et al., 2009).

## 1.5 Ostrov patogenity 2

Prežívanie baktérií rodu *Salmonela* vo vnútornom prostredí hostiteľských buniek a rozvoj systémovej infekcie závisia na aktivite T3SS kódovaného na ostrove patogenity 2 (*Salmonella* pathogenicity island 2, SPI-2), ktorý zabezpečuje transport efektorových proteínov do hostiteľskej bunky. Expresia tohto faktoru virulencie nastáva intracelulárne, až po fagocytovaní baktérie makrofágom. SPI-2 kóduje gény pre injektozóm, regulátory, chaperóny a efekторы (\*Figueira & Holden, 2012).

## 1.6 Plazmid podporujúci virulenciu

Pre optimálnu infekciu hostiteľa je potrebný plasmid pSLT, ktorý kóduje gény *spvRABCD*. SpvB má na hostiteľskú bunku cytotoxický efekt, bráni polymerácii F-aktínových vlákien ADP-ribosyláciou G-aktínových monomérov (Tezcan-Merdol et al., 2005). Spolu s efektorovými proteínmi SPI-2 indukuje bunkovú smrť makrofágov (Libby et al., 2000) aj epitelových buniek (Paesold et al., 2002). Proteíny SpvC a SpvD sa podieľajú na potlačení imunitnej odpovede hostiteľa. Fosfotreonín lyáza SpvC inhibuje signalizáciu MAPK (Haneda et al., 2012), čím inhibuje sekréciu cytokínov a tlmí zápal (Mazurkiewicz et al., 2008). SpvD bráni akumulácii p65 v jadre a tým bráni aktivácii NF- $\kappa$ B (Rolhion et al., 2016).

## 1.7 LPS

Lipopolysacharidové reťazce (LPS) sú tvorené A a O antigénmi. Správna forma O antigénu a jeho dĺžka je dôležitá k plnej virulencii *Salmonely* (Murray et al., 2003). Dĺžka O antigénu ovplyvňuje interakcie baktérií s makrofágmi (Murray et al., 2006), s epitelovými bunkami (Hölzer et al., 2009) a podieľa sa na odolnosti voči zložkám séra (Grossman et al., 1987).

V nasledujúcich kapitolách bude podrobne popísaná heterogenita v produkcii jednotlivých faktorov virulencie.

## 2 Biofilm

Baktérie podieľajúce sa na tvorbe biofilmu vykazujú rdar (red, dry and rough) morfológiu (Römling et al., 1998). *Salmonella* vykazujúca rdar morfológiu produkuje extracelulárny matrix, ktorým spája jednotlivé baktérie medzi sebou za vzniku kolónií. Hlavnú zložku matrixu tvoria vlnité fimbrie spolu s celulózou (White et al., 2003), modifikovaným O polysacharidom (Gibson et al., 2006) a proteínmi BapA (Latasa et al., 2005). Modifikácia O polysacharidu spočíva v čiastočnom nahradení tyvelózového zvyšku polymérom glukózy a glukosyláciou galaktózy (Gibson et al., 2006). Glukosylované O antigény vytvárajú takzvanú O antigénovú kapsulu (Gibson et al., 2006). Hlavné faktory ovplyvňujúce vznik rdar morfológie u *Salmonella* sú limitovaný prístup k živinám, nízka osmolarita prostredia a teplota pod 30°C (Gerstel & Römling, 2001).

Hlavným transkripčným regulátorom rdar heterogenity je CsgD (Gerstel & Römling, 2001). V prostredí indukujúcom tvorbu biofilmu sa tvoria dve rozdielne subpopulácie baktérií (Grantcharova et al., 2010). Časť populácie aktívne exprimuje proteín CsgD a tvorí zhluky, druhá časť baktérií je vo forme osamotených jedincov, ktorý neexprimujú proteín CsgD (Grantcharova et al., 2010). Prítomnosť CsgD vedie k tvorbe kapsule z O antigénu, ktorá prispieva k zvýšenej odolnosti voči dezinfekčným prostriedkom (Gibson et al., 2006) a niektorým druhom antibiotík (Olson et al., 2002).

Jedince CsgD On dokážu spôsobiť ochorenie aj po dlhšom čase mimo hostiteľa, avšak sú menej virulentné (White et al., 2008). Tvorba CsgD On fenotypu zabezpečuje, že aj za cenu zníženej virulencie subpopulácia prekoná nepriaznivé obdobie mimo hostiteľa čo najdlhší čas, aby sa zvýšila pravdepodobnosť prenosu na nového hostiteľa (MacKenzie et al., 2015). Baktérie CsgD Off spôsobujú invazívnejšiu formu ochorenia (MacKenzie et al., 2015). V subpopulácii CsgD Off sa vo zvýšenej miere exprimujú faktory virulencie ako SPI-1 a bičíky, čo potvrdzuje ich virulenciu, na rozdiel od zhlukov baktérií tvoriacich biofilm, ktoré majú zvýšenú expresiu génov pre produkciu extracelulárneho matrixu a sú lepšie prispôbené k perzistencii v iných environmentálnych podmienkach (MacKenzie et al., 2015). Ide pravdepodobne o stratégiu zaistenia stávkou, kde časť baktérií najlepšie prispôbená zmene podmienok zabezpečí prenos spoločného genofondu do ďalších generácií (MacKenzie et al., 2015).

### 3 Bičičky

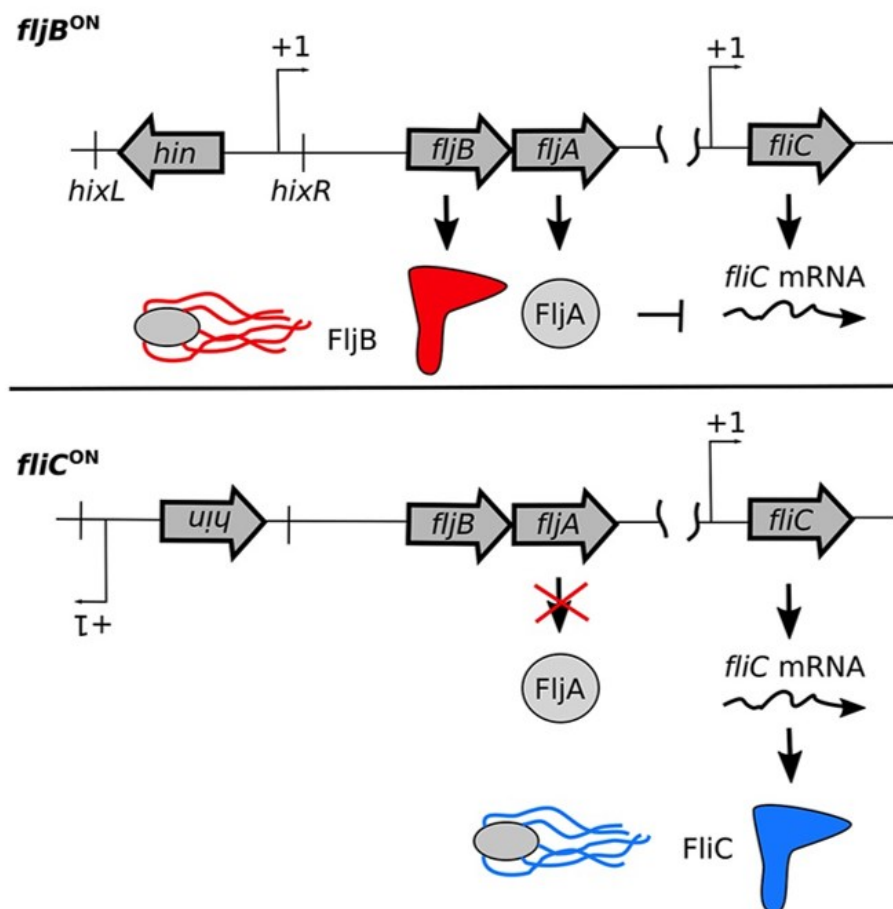
Bičičky sú rozpoznávané imunitnými bunkami. *Salmonela* môže exprimovať dva typy flagelínu, ktoré sú rozpoznávané s rôznou intenzitou (Metcalf et al., 2010). Neutrofilly reagujú produkciou kyslíkových radikálov. Tie reagujú s thiosulfátom tvoreným bunkami črevného epitelu (Furne et al., 2001) a vytvárajú tetrathionát (Winter et al., 2010). *Salmonela* dokáže, na rozdiel od fermentujúcej črevnej mikroflóry, využiť tetrathionát ako akceptor elektrónov pri anaeróbnej respirácii (Winter et al., 2010). Tetrathionát tiež pôsobí ako chemoatraktant rozpoznávaný proteínom chemotaxie Aer, čo zvyšuje fitness *Salmonely*, ktorá týmto spôsobom smeruje svoj pohyb do oblastí, kde je schopná rásť rýchlejšie (Rivera-Chávez et al., 2013). Týmto spôsobom dokážu svoju fitness zvýšiť iba baktérie exprimujúce bičičky, pretože jedince bez bičičkov nie sú schopné chemotaxie (Stecher et al., 2008).

Podobne funguje aj chemotaxia riadená proteínom Tsr, ktorý smeruje *Salmonelu* do oblastí s vyššou koncentráciou nitrátu (Rivera-Chávez et al., 2013). Nitrát, podobne ako tetrathionát, *Salmonela* využíva ako terminálny akceptor elektrónov pri respirácii v anaeróbnych podmienkach v čreve. *Salmonela* po infekcii najskôr kolonizuje epitelové bunky bedrovníku (Carter & Collins, 1974), kde sa nachádza najvyššia koncentrácia nitrátu. K následnému napádaniu bedrovníkových Peyerových plakov je nevyhnutná schopnosť Tsr riadenej chemotaxie v smere k nitrátu (Rivera-Chávez et al., 2016). Schopnosť chemotaxie spolu s prítomnosťou bičičkov umožňujú *Salmonele* inváziu Peyerových plakov nezávisle na T3SS-1 (Rivera-Chávez et al., 2016), aj keď invázia sprostredkovaná bičičkami je oveľa menej efektívna (Lockman et al., 1990). Nielen samotná prítomnosť bičičkov, ale aj schopnosť rotácie sa podieľajú na vstupe do epitelových buniek, pretože baktérie s mutovanými génmi, ktoré zabezpečujú rotáciu bičička majú zníženú schopnosť infikovať epitelové bunky (Horstmann et al., 2017).

Pri infekcii rastlín väčšina jedincov v populácii tlmí expresiu bičičkov (Zarkani et al., 2020). Zopár jedincov naopak expresiu bičičkov zvyšuje (Zarkani et al., 2020). Heterogénnu expresiu bičičkov pri infekcii rastlín môžeme vysvetliť evolučnou stratégiou zaistenia stávky, keďže baktérie FliC Off majú výhodu pri unikaní pred rozpoznaním imunitným systémom rastliny a baktérie FliC On sú pripravené na kolonizáciu ďalších ekologických ník, napríklad na prechod a infekciu herbivora (Zarkani et al., 2020).

### 3.1 FljB verus FliC

*Salmonella* môže exprimovať flagelín FljB alebo FliC. Tieto flagelíny sa líšia v štruktúre domény D3, ktorá sa nachádza na povrchu bičíka a je rozpoznávaná imunitným systémom hostiteľa (Yamaguchi et al., 2020). Prepínanie medzi expresiou FliC a FljB riadi miestne špecifická inverzia promotora *fljBA* (Kutsukake & Iino, 1980). Ak je promotor aktívny, exprimujú sa proteíny FljB a FljA (Obr. 2). FljA pôsobí ako negatívny regulátor transkripcie (Kutsukake & Iino, 1980) aj translácie flagelínu FliC interakciou s *fliC* mRNA (Bonifield & Hughes, 2003).



**Obr. 2 - Schématické znázornenie regulácie expresie flagelínov FljB a FliC** (prevzaté z (Horstmann et al., 2017). Miestne špecifická inverzia promotora *fljBA* je zodpovedná za riadenie expresie *fljB* a *fljA*. FljA potom pôsobí ako negatívny regulátor expresie *fliC*.

Výhoda expresie FljB flagelínu sa prejavuje v prostredí s vyššou viskozitou, v ktorom sa baktérie s týmto typom flagelínu dokážu pohybovať rýchlejšie (Yamaguchi et al., 2020) Avšak kolonizácia epitelových buniek je v prípade exprimácie *fljB* menej efektívna ako u populácie, ktorá má bičičky z FliC flagelínu (Horstmann et al., 2017). Výhoda FliC populácie pozostáva z aktívnejšej pohyblivosti v smere k epitelovým bunkám, nie však z rozdielu v



schopnosti priľnúť k ich povrchu (Horstmann et al., 2017). Pohyb baktérií blízko povrchu epitelu taktiež umožňuje *Salmonela* skenovať povrch buniek a nájsť vhodné miesto k invázii (Misselwitz et al., 2012). Týmto spôsobom je *Salmonela* schopná rozpoznať miesto, kde dochádza k makropinocytóze vyvolanej iným jedincom a dostať sa tak do bunky (Misselwitz et al., 2012).

Štýl pohybu u subpopulácií exprimujúcich FliC alebo FljB flagelín je rozdielny (Horstmann et al., 2017). FliC subpopulácia pri pohybe po povrchu epitelu častejšie zastavuje a medzi pohybmi má dlhšie prestávky (Horstmann et al., 2017). Práve tento štýl pohybu môže mať za následok efektívnejšiu kolonizáciu epitelu, kvôli dôkladnejšiemu skenovaniu povrchu (Horstmann et al., 2017).

Pôvodne sa predpokladalo, že *Salmonela* exprimuje 2 typy flagelínu, aby sa vyhla rozpoznaniu imunitným systémom (Metcalf et al. 2010). Horstmann a kol. (2017) však túto hypotézu nepotvrdili. Okrem toho niektoré sérovary *Salmonel* stratili schopnosť tvoriť FljB flagelín (Porwollik et al., 2002). Znížená schopnosť napádať epitelové bunky pri expresii FljB pravdepodobne viedla k selekcii v prospech FliC flagelínu (Horstmann et al., 2017). U sérovarov, ktoré si zachovali heterogenitu v expresii ide pravdepodobne o stratégiu zaistenia stávky, kde subpopulácia exprimujúca FliC je prispôbena na napádanie epitelových buniek a subpopulácia FljB môže mať výhodu v iných environmentálnych podmienkach, napríklad v prostredí s vyššou viskozitou (Yamaguchi et al., 2020).

Baktérie exprimujúce FliC sú oproti baktériám exprimujúcim FljB typ flagelínu schopné svojou zvýšenou schopnosťou priľnúť k cholesterolu a riadiť začiatkové štádiá tvorby biofilmu (Crawford et al., 2010). Tieto výsledky sú v rozpore s pozorovaním Horstmann a kol. (2017), ktorí nepozorovali rozdiely v priľnavosti k povrchu epitelových buniek medzi baktériami exprimujúcimi FljB alebo FliC typ flagelínu, avšak tí sa zameriavali na schopnosť priľnúť ku chitínu a nie na cholesterol.

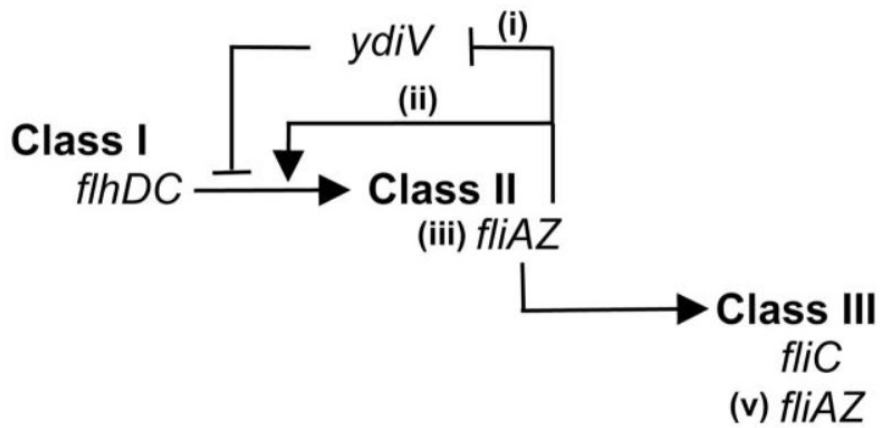
### 3.2 Heterogenita v expresii FliC

Samotná expresia *fliC* je heterogénna (Eriksson et al., 2003). Pre extracelulárne baktérie je výhodnejšie tvoriť bičičky, avšak pre intracelulárnu subpopuláciu je výhodnejšie sa množiť nepozorovane. Po vstupe do bunky *Salmonela* dokáže potlačiť mieru expresie *fliC* pod prahovú hodnotu rozpoznávanú T bunkami mechanizmom závislým na regulačnom systéme PhoPQ, ktorý odpovedá zmenám v prostredí (Cummins et al., 2005). Heterogenita v expresii závisí aj na lokalizácii *Salmonely* v hostiteľovi. *Salmonela* pri infekcii systémových tkanív, konkrétne

pečene a sleziny, neexprimuje flagelín (McSorley et al., 2002), avšak pri invázii Peyerových plakov jeho exprimáciu nepotláča (Cummings et al., 2006). Cytosólické hyper-replikujúce sa baktérie na rozdiel od vakuolárnych tiež tvoria bičičky, čo im umožňuje efektívnejšie šírenie po opustení hostiteľskej bunky (Knodler et al., 2010).

Gény, ktorých produkty sa podieľajú na správnom fungovaní bičička môžeme rozdeliť do 3 tried (\*Chevance & Hughes, 2008). Medzi gény I triedy patria *flhD* a *flhC*, ktoré tvoria komplex FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub>. Tento komplex je hlavným regulátorom expresie bičičkov, keďže aktivuje expresiu génov II triedy, ktoré kódujú proteíny tvoriace bazálne teliesko, háčik a regulačné proteíny génov III triedy, medzi ktoré patrí aj sigma faktor *fliA* (Helmann & Chamberlin, 1987). Gény III triedy kódujú flagelín *fliC* a proteíny riadiace chemotaxiu (\*Chevance & Hughes, 2008). Expresiu flagelínu riadia cez FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub> komplex proteíny YdiV a FliZ (Obr. 3). YdiV riadi prechod baktérií exprimujúcich mierne množstvo FliC do stavu FliC Off a FliZ naopak podporuje tvorbu FliC a zo subpopulácie priemerne exprimujúcej FliC sa stáva FliC On (Stewart & Cookson, 2014). FliZ reprimuje transkripciu YdiV (Wada et al., 2011a) a prostredníctvom pozitívnej regulácie s FliA tak riadi heterogénnu expresiu génov II a III triedy (Saini et al., 2010). V prostredí s vysokým obsahom živín sa zvyšuje miera expresie génov, z ktorých sa tvorí bičička (Wada et al., 2011b). Prítomnosť živín má negatívny vplyv na expresiu YdiV, ktorý pôsobí ako negatívny regulátor (Wada et al., 2011b). V prostredí s nízkym obsahom živín sa YdiV viaže na komplex FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub>, a tým ho označuje na degradáciu pomocou proteázy ClpXP (Tomoyasu et al., 2002). Keďže v cytosóle sa nachádza pomerne vysoká koncentrácia živín, baktérie, ktoré uniknú z vakuoly obklopujúcej jednotlivé baktérie po vstupe do bunky – SCV (*Salmonella*-containing vacuole), spúšťajú tvorbu bičičkov. YdiV pomáha *Salmonelle* uniknúť pred rozpoznaním imunitným systémom, bez potlačenia expresie *Salmonella* nedosiahne plnú virulenciu a nie je schopná spôsobiť systémové infekcie (Stewart et al., 2011). V SCV sa na tlmení expresie flagelínu podieľa proteín SsrB kódovaný na SPI-2 (\*Figueira & Holden, 2012). SsrB je exprimovaný iba v SCV, kde bráni optimálnemu fungovaniu komplexu FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub>, čím bráni expresii *fliC* (Ilyas et al., 2018). Ďalším signálom k zastaveniu tvorby bičičkov sú zmeny v integrite vonkajšej membrány *Salmonely* (Spöring et al., 2018). Skrátenie LPS alebo iné poškodenie membrány aktivuje degradáciu FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub> prostredníctvom YdiV a ClpXP (Spöring et al., 2018).

Na regulácii expresie bičičkov sa podieľa aj proteín CspE, ktorý pozitívne reguluje expresiu génov III triedy avšak nemá vplyv na expresiu génov I a II triedy (Ray et al., 2020). Pri mutácii *cspE* má baktéria menej bičičkov, čo má negatívny vplyv na počiatočné fázy tvorby biofilmu (Ray et al., 2020).

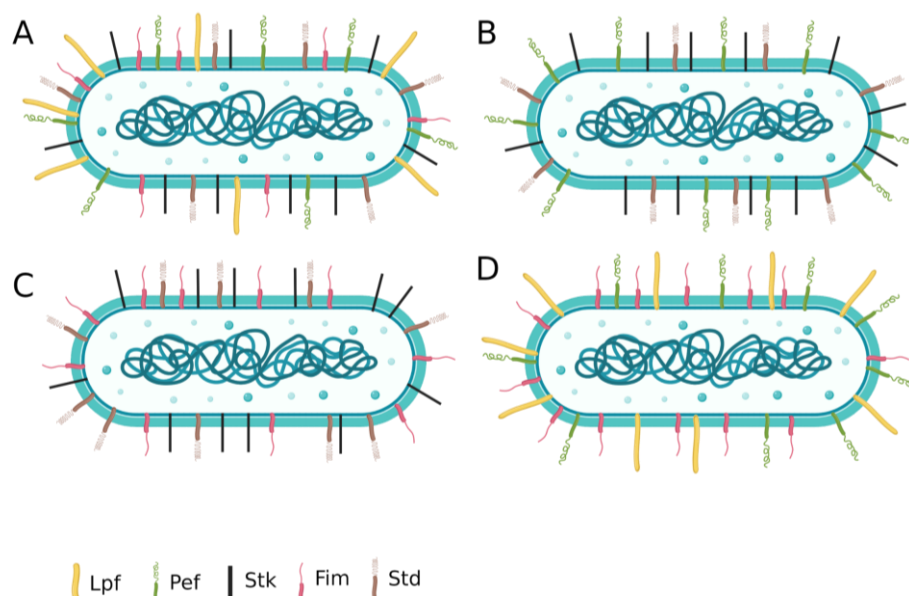


**Obr. 3 - Schéma znázorňujúca regulačnú kaskádu génov bičíka** (prevzaté z (Stewart & Cookson, 2014)). Pri expresii *flhDC* je aktívna expresia génov II triedy, ktoré pozitívne regulujú svoju vlastnú expresiu, expresiu *fliC* a reprimujú transkripciu *ydiV*. Pri zvýšenej expresii *ydiV* bráni aktivácii expresie génov II triedy a *fliC* sa neexprimuje.

## 4 Fimbrie

Fimbrie kódované operónmi *fim*, *lpf*, *std*, *pef* a *stk* preukazujú heterogénnu expresiu (Obr. 4; \*García-Pastor et al., 2019; Tawfick et al., 2020). Fimbrie patria medzi veľmi konzervované štruktúry, ktoré sú ľahko rozoznávané imunitným systémom hostiteľa. Práve odhalenie *Salmonely* imunitným systémom môže viesť k ich bimodálnej expresii, pričom fimbrie exprimuje len malá časť baktérií (\*Humphries et al., 2001).

*Salmonela* exprimuje viac typov fimbrií súčasne. Mutácie len v jednom type fimbrií znižujú virulenciu baktérie veľmi málo (van der Velden et al., 1998). Pri mutáciách vo viacerých typoch fimbrií súčasne sa znižuje schopnosť kolonizácie čreva *Salmonelou*, čo naznačuje, že mutácie v jednom type sú kompenzované prítomnosťou fimbrií iného typu (van der Velden et al., 1998). Z výsledkov van der Velden a kol. (1998) je pravdepodobné, že absencia minimálne 2 typov fimbrií môže signifikantne znížiť virulenciu, avšak ďalšie štúdie sú nutné k identifikácii konkrétnych kombinácií typov fimbrií, pri ktorých absencii je virulencia *Salmonely* znížená.



**Obr. 4 – Heterogénna expresia fimbrií.** (A) *Salmonela* exprimujúca všetky typy fimbrií, (B,C,D) znázorňujú fenotypovú diverzitu jedincov na základe náhodnej heterogénnej expresie fimbrií (zatiaľ nie je známe, či dochádza k heterogénnej expresii viacerých druhov fimbrií súčasne na jednej bakteriálnej bunke, takže tento obrázok slúži iba pre zjednodušené znázornenie heterogenity).

### 4.1 Lpf

Imunizácia jedincami *Salmonely* Typhimurium exprimujúcimi Lpf fimbrie vedie pri nasledovnej infekcii *Salmonelou* Enteritidis, k selekcii proti Lpf On jedincom, jedince s Lpf

Off fenotypom sú schopné vyhnúť sa imunitnej odpovedi vytvorenej na základe predošlej imunizácie (Norris & Bäumler, 1999). Lpf On subpopulácia však umožňuje inváziu Peyerových plakov cez M bunky (Bäumler et al., 1996a), a tým prispieva k systémovej infekcii. Heterogénna expresia *lpf* je regulovaná na úrovni transkripcie (Norris et al., 1998). Veľkosť subpopulácii Lpf On a Lpf Off *in vitro* aj *in vivo* závisí na environmentálnych podmienkach (Kingsley et al., 2002). *In vivo* sa počas infekcie znižuje množstvo Lpf On jedincov (Kingsley et al., 2002).

## 4.2 Pef

Práve typ exprimovaných fimbrií určuje bunky, na ktoré je *Salmonela* schopná priľnúť (Bäumler et al., 1996c). Expresia Pef prináša výhodu v podobe zvýšenej priľnavosti k bunkám črevného epitelu, avšak mutácie v *pef* znižujú schopnosť kolonizácie hostiteľa len veľmi málo (Bäumler et al., 1996c). Baktérie vykazujúce Pef On fenotyp sa podieľajú na akumulácii tekutín v myšom modely (Bäumler et al., 1996b). Keďže bunky môžu mať u rôznych živočíchov rôzne povrchové receptory, funkcia Pef fimbrií v myšom modely môže byť odlišná od ich funkcie pri infekcii iného živočíšneho druhu (Bäumler et al., 1996b). Pokles pH laboratórneho média z 7,1 na 5,1 zvyšuje zastúpenie Pef On baktérií (Nicholson & Low, 2000). Expresia Pef je regulovaná na úrovni transkripcie proteínom Lrp a Dam metyltransferázou (Nicholson & Low, 2000). Ako negatívny regulátor pôsobí proteín PefI, ktorý sprostredkúva naviazanie sa Lrp na GATC<sub>2</sub> a bráni naviazaniu Lrp na oblasť GATC<sub>1</sub> (Nicholson & Low, 2000). K expresii *pef* je nutná metylácia sekvencie GATC<sub>2</sub> a naviazanie Lrp na oblasť GATC<sub>1</sub>, avšak úloha metylácie ďalších GATC úsekov nachádzajúcich sa v regulačnej oblasti zatiaľ nie je známa (Nicholson & Low, 2000).

## 4.3 Fim

Pri kolonizácii tenkého čreva hostiteľa je expresia *fim* výhodná, keďže umožňuje *Salmonele* adherovať na enteroocyty (Althouse et al., 2003). Baktérie s mutovaným *fimA* majú zníženú schopnosť kolonizovať tenké črevo, no táto mutácia nemá vplyv na infekciu systémových orgánov, konkrétne na infikovanie pečene alebo sleziny (Althouse et al., 2003), pretože na adhézii k M bunkám, cez ktoré *Salmonela* prechádza do Peyerových plakov sa podieľa iný typ fimbrií (Bäumler et al., 1996a). Heterogenita v expresii *fim* operónu bola objavená už v roku 1970 (Old & Duguid, 1970). Baktérie s Fim On fenotypom sa pri statickej kultivácii v aeróbných podmienkach rýchlo premnožia na povrchu média (Old & Duguid,

1970). Dokonca aj v prípade, že ich bolo na začiatku veľmi málo, dokážu vytvoriť subpopuláciu väčšiu ako Fim Off (Old & Duguid, 1970). Percento baktérií exprimujúcich Fim rastie s počtom pasáží v tekutom médiu za mikroaeróbných podmienok, rovnako ako pri kultivácii v prítomnosti hostiteľských buniek (Klasa et al., 2020).

#### 4.4 Std

Bistabilná expresia *std* operónu bola objavená len nedávno, keďže podobne ako u väčšiny iných fimbrií, *in vitro* exprimuje *std* menej ako 1% baktérií (García-Pastor et al., 2018). Medzi gény kódované operónom *std* patria regulátory *stdE* a *stdF* (López-Garrido & Casadesús, 2012). Proteíny StdE a StdF majú DNA-väzobnú doménu, pôsobia ako pozitívne regulátory *std* operónu a regulujú aj pomerne veľa iných génov, čím spôsobujú, že pri heterogénnej expresii *std* operónu vznikajú Std On a Std Off subpopulácie líšiace sa nielen v expresii fimbrií (García-Pastor et al., 2018). StdF sa viaže na regulačnú oblasť pred promotorom *std*, podobne ako regulačný proteín HdfR a svojím naviazaním priamo aktivujú transkripciu *std* (García-Pastor et al., 2019). StdE aktivuje transkripciu *std* operónu aktiváciou expresie *hdfR* (García-Pastor et al., 2019). Proteín HdfR sa spolu s Dam metyltransferázou podieľa na regulácii *std* (Jakomin et al., 2008). V prípade metylácie oblastí GATC<sub>2</sub> a GATC<sub>3</sub> nie je naviazaný transkripčný aktivátor HdfR a tvorí sa subpopulácia Std Off jedincov (García-Pastor et al., 2019). StdEF fungujú tiež ako represory génov lokalizovaných na SPI-1, génov dôležitých k expresii bičiekov *flhDC*, *fljB* a reprimujú gény riadiace chemotaxiu *tsr* a *aer* (García-Pastor et al., 2018). Toto spôsobuje zníženú virulenciu Std On jedincov (García-Pastor et al., 2018). Keďže v Std On subpopulácii je reprimovaná expresia SPI-1 systémom, tlmenie ich expresie umožňuje baktérii nepozorované množenie, na ktoré má dostatok energie (García-Pastor et al., 2018). Pri proliferácii Std On jedincov vznikajú hlavne Std Off jedinci, ktorí sú schopní vstupovať do epitelových buniek pomocou T3SS-1 (García-Pastor et al., 2018).

#### 4.5 Stk

Minulý rok bola popísaná heterogénna expresia aj u Stk fimbrií (Tawfick et al., 2020). Aj keď mechanizmus zaisťujúci túto heterogenitu nie je zatiaľ objasnený, predpokladá sa, že môže byť spôsobená prítomnosťou repetitívnej sekvencie v promotore *stk* (Tawfick et al., 2020).

## 5 Ostrov patogenity 1 (SPI-1)

Miera expresie SPI-1 závisí do istej miery na lokalizácii baktérie v hostiteľovi. Prítomnosť bilínov produkovaných žľčným expresiu SPI-1 tlmí (van Velkinburgh & Gunn, 1999). V lumen čreva je relatívne vyššia koncentrácia bilínov, takže expresia SPI-1 je tlmená. Naopak, ak sa baktéria vyskytuje v blízkosti povrchu epitelových buniek vo vrstve mucínu, kde je koncentrácia bilínov nižšia, expresia SPI-1 sa zvyšuje (Prouty & Gunn, 2000). Podobne sa koncentrácia bilínov znižuje aj v závislosti na vzdialenosti od žľčníku, čo koreluje so zistením, že *Salmonela* po infekcii hostiteľa najskôr invaduje do buniek bedrovníku (Carter & Collins, 1974). Izogénnu populáciu *Salmonely* v čreve hostiteľa tak môžeme rozdeliť podľa miery expresie SPI-1 na T3SS-1<sup>+</sup> a T3SS-1<sup>-</sup> subpopulácie (Hautefort et al., 2003), ktoré majú rozdielne fyziologické funkcie. K heterogénnej expresii T3SS-1 dochádza aj medzi baktériami v rámci jednej hostiteľskej bunky. Heterogenitu v expresii T3SS-1 môžeme vysvetliť pomocou dvoch evolučných stratégií, stratégiou zaistenia stávky a del'bou práce medzi subpopuláciami.

### 5.1 Heterogenita expresie SPI-1 z pohľadu evolučných stratégií

Bimodálna expresia génov SPI-1 v čreve hostiteľa, ktorá vedie k efektívnejšej kolonizácii sa dá vysvetliť stratégiou del'by práce. Bunky *Salmonely* exprimujúce SPI-1 (T3SS-1<sup>+</sup>) vyvolávajú zápal, ktorý poškodí črevnú mikroflóru a potlačí jej následné obnovenie (Stecher et al., 2007), čím umožní premnoženie *Salmonely* v extracelulárnom prostredí. Baktérie vykazujúce T3SS-1<sup>-</sup> fenotyp zo zápalu profitujú, v pozmenených environmentálnych podmienkach ovplyvnených zápalom rastú rýchlejšie ako prirodzená črevná mikroflóra, vďaka schopnosti využívať vznikajúci tetrathionát (Sturm et al., 2011). Oba fenotypy T3SS-1<sup>+</sup> aj T3SS-1<sup>-</sup> sú nevyhnutné k optimálnej invázii epitelových buniek a nezáleží na tom, v akom pomere sa v populácii vyskytujú (Sánchez-Romero & Casadesús, 2018). K vytvoreniu optimálnych podmienok pre napádanie buniek epitelu stačí malé množstvo T3SS-1<sup>+</sup> jedincov (0,17%) (Sánchez-Romero & Casadesús, 2018).

Strum a kol. (2011) ukazujú, že z pohľadu jednotlivcov je expresia T3SS-1<sup>+</sup> skôr nevýhodná, keďže za ňu platia daň v podobe spomaleného rastu a sú častejšie vystavený vplyvu imunitných buniek. Ak je však expresia faktorov virulencie pre jedinca nákladná, ale z hľadiska populácie veľmi výhodná, ide o kooperatívnu virulenciu medzi subpopuláciami, ktorá predstavuje vývojovo stabilnú evolučnú stratégiu (Diard et al., 2014). V každej populácii vznikajú okrem T3SS-1<sup>+</sup> a T3SS-1<sup>-</sup> jedincov aj avirulentní mutanti (Diard et al., 2013). V prípade infekcie avirulentnými mutantmi, ktorí nie sú schopní spôsobiť zápal, nedôjde k

poškodeniu mikroflóry a mutanti sa postupne vytratia z hostiteľa (Stecher et al., 2007). Pri populáciách s nižším množstvom T3SS-1<sup>-</sup> jedincov sa avirulentní mutanti rýchlo premnožia, čo vedie k rýchlemu obnoveniu mikroflóry a zníženiu prenosnosti ochorenia (Diard et al., 2013) pravdepodobne v dôsledku zníženého množstva prozápalových efektorových proteínov. Oproti tomu T3SS-1<sup>-</sup> baktérie môžu neskôr spustiť expresiu T3SS-1, a tým doplniť T3SS-1<sup>+</sup> populáciu (Sturm et al., 2011). Baktérie vykazujúce T3SS-1<sup>-</sup> fenotyp rastú rovnako rýchlo ako avirulentní mutanti (Sturm et al., 2011) a tak vďaka kompetícii o zdroje oddávajú ich premnoženie, čo by spôsobilo predčasné ukončenie ochorenia (Diard et al., 2013). Vznik mutantov znižuje virulenciu, takže baktérie nie sú schopné spôsobiť dlhodobú infekciu a minimalizuje sa risk prenosu, čo by sa mohlo využiť ako alternatívny spôsob liečby v boji proti patogénom (Diard et al., 2013).

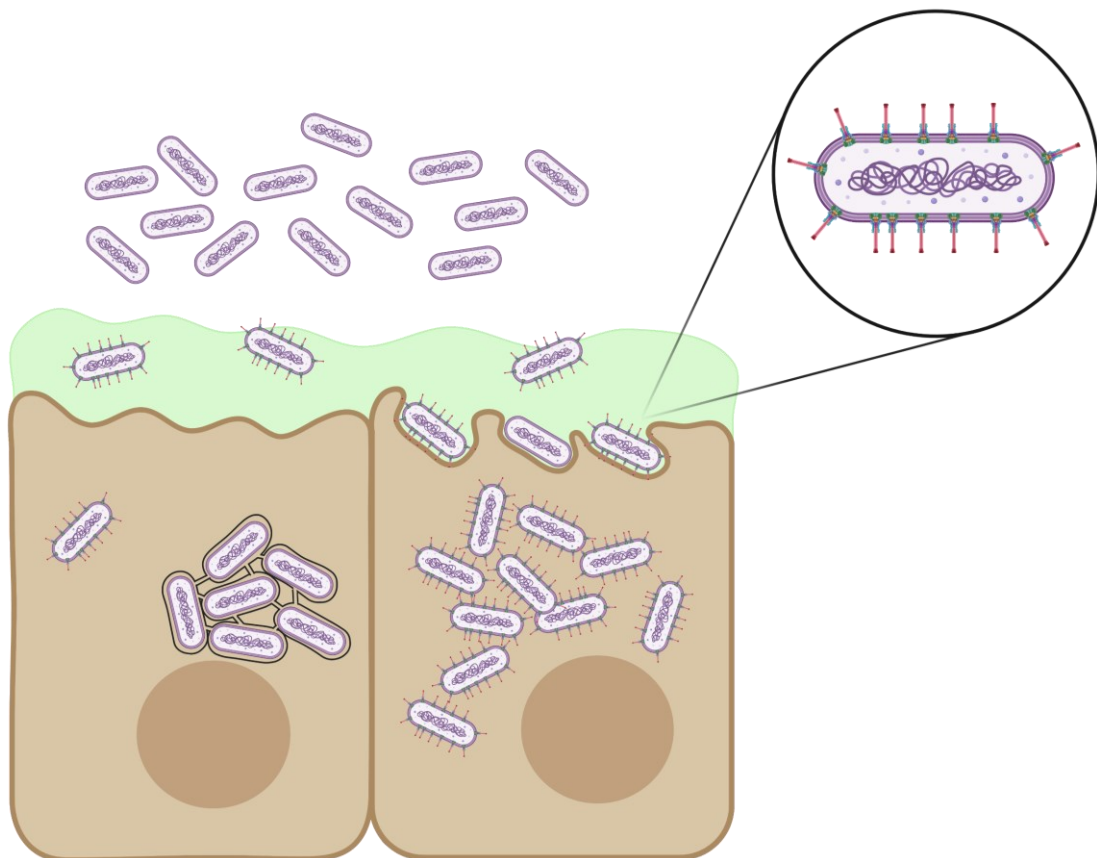
Heterogenita v expresii SPI-1 môže byť považovaná aj za stratégiu zaistenia stávky, ktorá sa uplatňuje v rýchlo sa meniacich podmienkach. Najlepšie prispôsobený fenotyp prežije zmenu podmienok v prostredí a zabezpečí prenos genetickej informácie do ďalších generácií. Subpopulácia exprimujúca T3SS-1, ktorá sa množí pomalšie, s väčšou pravdepodobnosťou prežije vystavenie antibiotikám ako subpopulácia s fenotypom T3SS-1<sup>-</sup> a po vymiznutí antibiotika z prostredia dokáže obnoviť rast a delenie (Arnoldini et al., 2014). Antibiotická liečba selektuje v prospech fenotypovo odlišných subpopulácií tým, že ničí avirulentných mutantov a virulentní jedinci, ktorí prežili, sú schopní obnoviť populáciu pozostávajúcu z jedincov vykazujúcich oba fenotypy (Diard et al., 2014). Pacienti, ktorí neboli liečení antibiotikami sú menej infekční ako tí, u ktorých antibiotikum vyhubilo všetky mutované baktérie (Diard et al., 2014), čo potvrdzuje, že vznik avirulentných mutantov minimalizuje risk prenosu (Diard et al., 2013). Výsledky Diard a kol. (2013) dokazujú, že baktérie spôsobujúce opätovné ochorenie sa tvoria z perzistentných baktérií, ktoré prežili liečbu v tkanivách a nie z geneticky rezistentných jedincov.

## 5.2 Heterogenita expresie SPI-1 po vstupe do bunky

Proteíny kódované na SPI-1 sú potrebné k preniknutiu do epitelovej bunky (\*Zhou & Galán, 2001). *Salmonela* exprimujúca T3SS-1 kontaktom s hostiteľskou bunkou vyvolá makropinocytózu a baktérie v blízkosti sa dostávajú do bunky spolu s T3SS-1<sup>+</sup> *Salmonelou* (Obr. 5). Takto sa do hostiteľskej bunky môžu dostať aj baktérie neexprimujúce SPI-1 (Ginocchio et al., 1992). Po vstupe do buniek črevného epitelu časť baktérií zostáva v SCV a časť uniká do cytosólu (Brumell et al., 2002). Expresia T3SS-1 a formovanie translokonu



spôsobuje vznik pórov v membránach buniek (Pace et al., 1993) a pravdepodobne aj v SCV. Únik z SCV môže byť dôsledkom porušenia membrány translokomom, pretože efektorové proteíny SPI-1 sa na tom nepodieľajú (Roy et al., 2004). Pri úniku z SCV nezáleží na množstve baktérií, ktoré na začiatku bunku infikovali (Knodler et al., 2014). Cytosólické baktérie sú transkripčne odlišné od vakuolárnych (Knodler et al., 2010). Zatiaľ čo vakuolárne baktérie exprimujú SPI-2, prostredie cytosólu indukuje expresiu proteínov kódovaných na SPI-1 a bičikov (Knodler et al., 2010). Cytosólické baktérie sa veľmi rýchlo množia (hyper-replikujú) (Knodler et al., 2010). Hyper-replikujúce sa baktérie vyvolávajú vylúčenie bunky z vrstvy epitelu do lumen čreva a jej pyroptózu, čím sa uvoľňujú virulentní jedinci do prostredia (Knodler et al., 2010). Hyper-replikujúce sa baktérie sa vyskytujú iba v malom množstve infikovaných buniek, no tvoria veľkú časť z celkovej intracelulárnej populácie (Malik-Kale et al., 2012). Väčšina epitelových buniek obsahuje baktérie v SCV, ktoré sa replikujú pomaly a k celkovej rýchlosti šírenia veľmi neprispievajú (Malik-Kale et al., 2012).



**Obr. 5 – Expressia SPI-1 T3SS.** V lumen čreva a v SCV v hostiteľskej bunke sa nachádzajú baktérie neexprimujúce SPI-1, baktérie exprimujúce SPI-1 vo vrstve mucínu (vyznačený zelenou), pri kontakte s hostiteľskou bunkou vyvolávajú makropinocytózu. Baktérie exprimujúce SPI-1 v cytosóle sa hyper-replikujú (pre jednoduchosť je na obrázku znázornená expresia iba jedného faktoru virulencie - SPI-1).

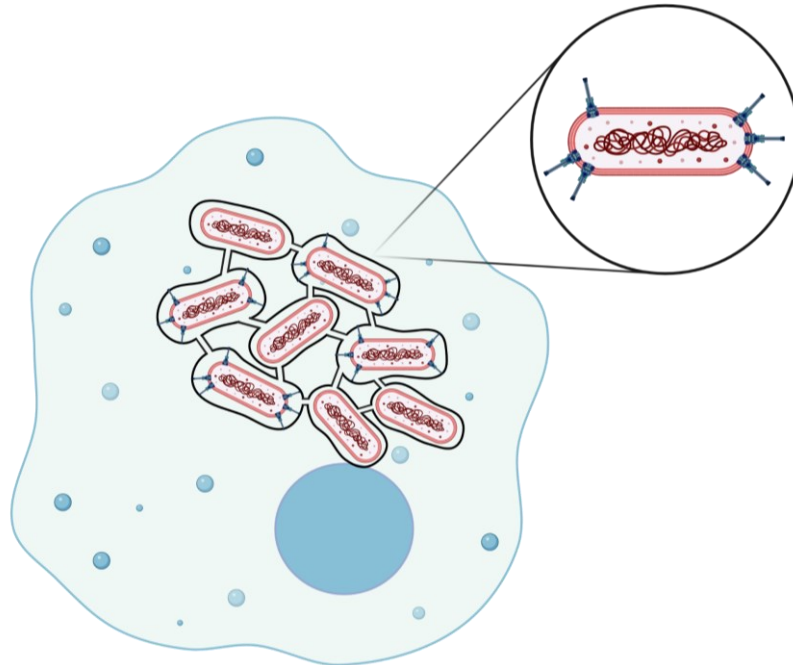
Expresia SPI-1 a flagelínu vo fagocytytujúcich bunkách vyvoláva pyroptózu bunky (Sun et al., 2007). Flagelín sa v cytosóle viaže na receptory aktivujúce bunečnú smrť cez kaspázu-1 (Miao et al., 2006). Hyper-replikujúce sa baktérie v cytosóle epitelových buniek vyvolávajú pyroptózu (Knodler et al., 2010). Väčšina proteínov kódovaných na SPI-1 je preto považovaná za proteíny podnecujúce pyroptózu a zabezpečujúce šírenie *Salmonely* v hostiteľovi aj medzi hostiteľmi (Knodler et al., 2010). Efektorový proteín SopB naopak pyroptóze epitelových buniek bráni tým, že aktivuje Akt/proteín kinázu B, ktorá potláča aktivitu kaspázy-3, čo má za následok oddialenie pyroptózy hostiteľskej bunky *in vitro* (Knodler et al., 2005) aj *in vivo* (Kum et al., 2011). Oddialenie pyroptózy epitelových buniek predlžuje možnosť replikácie v intracelulárnom prostredí, a tým prispieva k šíreniu ochorenia (Knodler et al., 2005).

## 6 Ostrov patogenity 2 (SPI-2)

Jednou z funkcií efektorových proteínov T3SS-2 je zabezpečenie vhodného prostredia na prežívanie baktérií vnútri hostiteľskej bunky. K tomu prispieva okrem iného aj polarizácia makrofágov do stavu M2 (Stapels et al., 2018). M2 polarizované makrofágy potláčajú odpoveď imunitného systému na rozdiel od veľmi prozápalových M1 makrofágov (Mills et al., 2000). Pri dlhodobej infekcii sa *Salmonella* vyskytuje vo väčšom množstve v M2 polarizovaných makrofágoch, čo naznačuje, že vnútorné podmienky v M2 makrofágoch sú pre život *Salmonely* priaznivejšie (Stapels et al., 2018). Proteíny charakteristické pre M2 makrofágy spôsobujúce protizápalovú odpoveď (napr. Il-4ra, Arg1, Odc1, Ppard, a Timp1) sú u buniek obsahujúcich živé baktérie vo zvýšenej miere (Saliba et al., 2016; Stapels et al., 2018). V prípade infekcie prozápalových makrofágov typu M1 bolo zistené, že expresia proteínov zabezpečujúcich imunitnú odpoveď (NF- $\kappa$ B, CD40, Il-1 $\beta$ , Nlrp3, a TNF) je tlmená (Stapels et al., 2018; Sun et al., 2016). K polarizácii v smere M2 prispieva efektorový proteín SteE tým, že zvyšuje expresiu Il-4ra, povrchového markeru M2 makrofágov, ktorého množstvo je výrazne vyššie u makrofágov obsahujúcich živé nerastúce bunky s aktívnym metabolizmom (Stapels et al., 2018). U makrofágov infikovaných baktériami s mutovaným *steE* nenastala zvýšená expresia Il-4ra, ale expresia prozápalových génov u M1 bola aj naďalej tlmená, čo naznačuje, že M1 supresia a M2 polarizácia sú deje nezávislé na sebe (Stapels et al., 2018).

Po fagocytóze je SCV acidifikované na pH približne 5 (Aranda et al., 1992). *Salmonella* na tento stav reaguje okyslením vlastnej cytoplazmy (Chakraborty et al., 2015). Tento proces nastáva okamžite a je závislý na systéme EnvZ/OmpR (Chakraborty et al., 2015). Okyslenie cytoplazmy baktérií je nevyhnutné k expresii SPI-2 proteínov, keďže ich expresia nastáva iba intracelulárne, v SCV (Obr. 6; Chakraborty et al., 2015). Indukuje totiž uvoľňovanie proteínov translokónu T3SS-2 z povrchu bakteriálnej bunky do SCV (Chakraborty et al., 2015). Hlavným regulátorom okyslenia bakteriálnej cytoplazmy je OmpR (Chakraborty et al., 2015). OmpR reprimuje transláciu CadC/BA proteínov, ktoré pôsobia proti acidifikácii a zabezpečujú aby bolo pH cytoplazmy neutrálne (Chakraborty et al., 2015). OmpR tiež pozitívne reguluje expresiu systému SsrA/SsrB, ktorý je kódovaný na SPI-2 a reguluje expresiu ďalších proteínov kódovaných na SPI-2 (Lee et al., 2000). Práve reakciu *Salmonely* na znížené pH pomocou EnvZ/OmpR systému považujú Chakraborty a kol. (2015) za príčinu heterogenity v expresii proteínov kódovaných na SPI-2. Tú dokumentujú proteínmi translokónu SseBCD. Sekrécia SseB je indukovaná práve zníženým pH (Beuzón et al., 1999). SseB sa od povrchu bakteriálnej bunky oddelí a spolu s ďalšími proteínmi vytvorí translokón, cez ktorý sú následne efektorové

proteíny sekretované do cytosólu hostiteľskej bunky (Chakraborty et al., 2015), kde efektorové proteíny vykonávajú svoju funkciu. Ak k acidifikácii cytoplazmy nedôjde, nevytvorí sa translokon a nenastane ani sekrécia efektorových proteínov (Chakraborty et al., 2015; Yu et al., 2010).



**Obr. 6 – Heterogénna expresia SPI-2 T3SS v makrofágoch.** Po fagocytovaní *Salmonely* makrofágom, vyvolá vnútorné prostredie SCV, v ktorom sa baktéria nachádza, expresiu SPI-2 T3SS avšak iba u niektorých jedincov.

## 6.1 SPI-2 a tvorba perzisterov

Pri fagocytóze *Salmonely* makrofágmi, v prípade, že ich makrofág neusmrtí, bunky *Salmonely* začnú rásť a množiť sa alebo prejdú do stavu perzisterov (Helaine et al., 2014). Perzistery sú nerastúce bakteriálne bunky odolné voči antibiotikám, ktoré po vymiznutí antibiotík z prostredia dokážu obnoviť rast a delenie buniek, a tým opakovane spôsobiť infekciu (Balaban et al., 2004; Bigger, 1944). Týmto spôsobom patogény dokážu prežiť v tele aj opakovanú antibiotickú liečbu (Balaban et al., 2004; Bigger, 1944). Makrofágy obsahujúce perzistery vykazujú bimodálnu expresiu génov pre M1 aj M2 (Stapels et al., 2018), čo potvrdzuje heterogenitu transkripčnej a translačnej aktivity a tiež expresiu SPI-2 v nerastúcich bunkách s aktívnym metabolizmom (Helaine et al., 2014).

Tvorba perzisterov vo zvýšenej miere je indukovaná vnútorným prostredím makrofágov (Helaine et al., 2014). Na tvorbu perzisterov má vplyv aktivita TA (toxín/antitoxín) modulu, ktorá je regulovaná Lon proteázou tým, že degraduje iba antitoxíny, ale nie toxíny TA modulu, ktoré sú zodpovedné za dočasné zastavenie rastu (Helaine et al., 2014). Samotná mutácia v géne

pre *lon* nemá efekt na tvorbu intracelulárnej subpopulácie perzisterov, no pri súčasnej mutácii v géne pre syntázu *relA* a *spoT* alebo *lon* dochádza k ich výrazne zníženej tvorbe (Helaine et al., 2014). Úloha (p)ppGpp tvoreného syntázami RelA a SpoT bola potvrdená tento rok (Luk et al., 2021). Podľa tejto štúdie *Salmonela* tvorí perzistery v špeciálnej vakuole odlišnej od SCV (Luk et al., 2021). Objavujú sa však aj štúdie, ktoré ako hlavný dôvod tvorby perzisterov uvádzajú nízku cytoplazmatickú koncentráciu  $Mg^{2+}$ , ktorá spôsobuje obmedzenie rastu nezávisle na množstve (p)ppGpp, aktivite TA modulov, či zníženom pH (Pontes & Groisman, 2019).

## 6.2 SPI-2 a *spv*

Expresia T3SS-2 je dôležitá aj pre gény kódované na plazmide pSLT. Ten obsahuje gény *spvRABCD*, ktoré sa podieľajú na raste v intracelulárnom prostredí (Gulig & Doyle, 1993). Expresia *spv* je indukovaná v intracelulárnom prostredí a v médiách, ktoré kopírujú podmienky v SCV (Wilson et al., 1997).

Hlavným regulátorom *spv* operónu je proteín SpvR (Krause et al., 1992). Gény *spvABCD* sú exprimované z jedného promotora, *spvR* má svoj vlastný promotor. Len nedávno bola objavená bimodalita v expresii *spvR* (Passaris et al., 2018). Expresia *spv* sa aktivuje až po dosiahnutí určitej prahovej koncentrácie SpvR. Ak koncentrácia SpvR kolíše okolo prahovej hodnoty, tvoria sa subpopulácie Spv On a Spv Off (Passaris et al., 2018). V intracelulárnom prostredí len malá časť baktérií vykazuje Spv On fenotyp (Passaris et al., 2018), no k spôsobeniu systémovej infekcie sú baktérie exprimujúce gény *spv* potrebné (\*Gulig, 1990). SpvA tiež pôsobí ako regulátor expresie *spv* (Passaris et al., 2018). Je nevyhnutný ku koordinovanej expresii *spvR* a *spvABCD* (Passaris et al., 2018). Hoci poznáme výhody expresie *spv* pre *Salmonelu*, stále nevieme akú výhodu prináša bimodálna expresia tohto virulentného faktoru (Passaris et al., 2018).

## 7 Lipopolysacharidy (LPS)

Lipopolysacharidový reťazec tvorí hlavnú zložku vonkajšej membrány *Salmonely*. Pozostáva z troch častí, z endotoxínu lipidu A, z oligosacharidového jadra a variabilného O antigénu (polysacharidu). Po fagocytovaní makrofágmi je expresia troch hlavných oblastí kódujúcich gény pre syntézu LPS tlmená (Eriksson et al., 2003). Lipid A patrí všeobecne medzi veľmi konzervované štruktúry a je preto veľmi rýchlo rozoznaný hosťateľským imunitným systémom. *Salmonela* dokáže modifikovať pôvodný lipid A dvoma spôsobmi a vytvoriť tak dve ďalšie varianty lipidu A, LPS 430 a LPS 435 (Pastelin-Palacios et al., 2011). Modifikácia lipidu A je riadená systémom PhoPQ, v závislosti na koncentrácii  $Mg^{2+}$  a pH (Pastelin-Palacios et al., 2011). Jedinci s modifikovaným lipidom A majú oproti jedincom s bežným lipidom A zníženú schopnosť aktivácie imunitného systému (Pastelin-Palacios et al., 2011) a sú odolnejšie voči antimikrobiálnym peptidom, čím zvyšujú svoju virulenciu (Gunn & Miller, 1996; Guo et al., 1997).

Rozdiely v LPS sa najviac prejavujú v expresii O antigénu. Na regulácii dĺžky O antigénu sa podieľajú proteíny Wzz, OvpAB a GtrABC, ktoré riadia polymeráciu a modifikácie O polysacharidu. U *Salmonely* je expresia dĺžky O antigénu trimodálna, na svojom povrchu môžu mať krátky, dlhý alebo veľmi dlhý polysacharidový reťazec.

### 7.1 Expresia pod vplyvom Wzz proteínov

Na dĺžke O antigénu sa okrem dvoch Wzz proteínov ( $Wzz_{ST}$  a  $Wzz_{fepE}$ ) podieľa aj polymeráza Wzy. Pri expresii Wzy sa tvoria lipopolysacharidové reťazce s náhodnou dĺžkou, ktorá je regulovaná Wzz kopolymerázami. Pri súčasnej mutácii oboch Wzz *Salmonela* exprimuje iba krátke O antigény (Hölzer et al., 2009). Pod vplyvom Wzz sa tvoria dlhé alebo veľmi dlhé lipopolysacharidové reťazce (Murray et al., 2003). Ak je exprimovaný proteín  $Wzz_{ST}$  tvorí sa dlhý reťazec s dĺžkou 16-35 podjednotiek (Batchelor et al., 1992). V prípade expresie  $Wzz_{fepE}$  proteínu sa tvorí veľmi dlhý reťazec s dĺžkou  $>100$  podjednotiek (Murray et al., 2003). Expresia Wzz proteínov závisí na podmienkach prostredia, pri kultivácii v podmienkach pripomínajúcich SCV (znížené množstvo  $Mg^{2+}$  a znížená koncentrácia fosfátu pri pH 5.0) sa tvorí veľmi dlhý alebo krátky reťazec vo zvýšenej miere a expresia dlhých reťazcov je tlmená (da Silva et al., 2018). Naopak kultivácia v médiu bohatom na živiny, v podmienkach podobných lumen čreva, indukuje expresiu dlhých reťazcov (da Silva et al., 2018). Prítomnosť všetkých typov reťazcov zabezpečuje kompletnú virulenciu v populáciách *Salmonely* (Murray et al., 2003). Výhoda veľmi dlhých reťazcov sa prejavuje zvýšenou

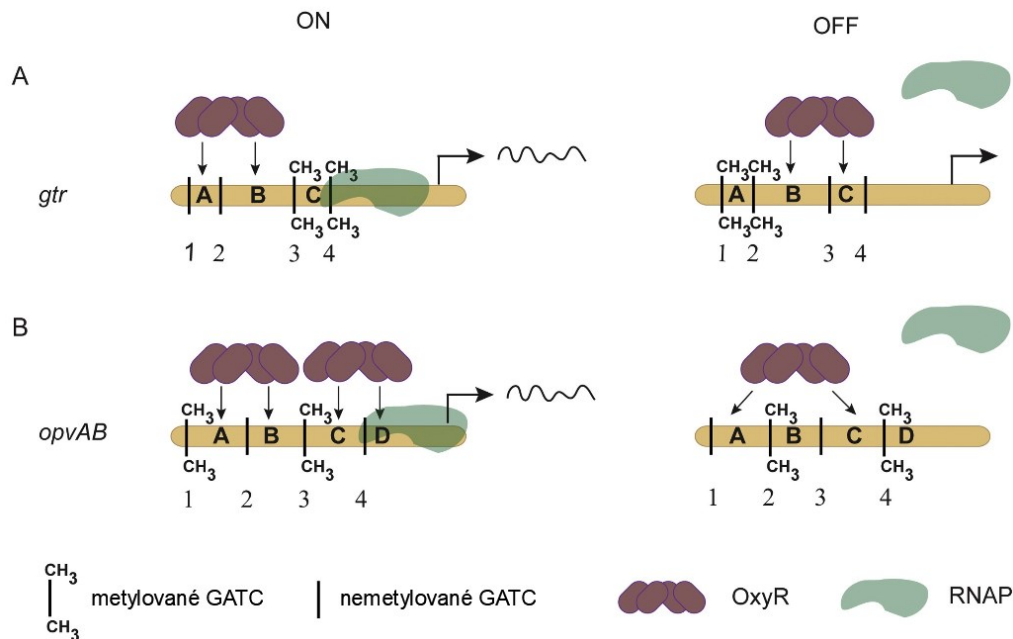
odolnosťou voči zložkám séra (Grossman et al., 1987). Sérum indukuje tvorbu veľmi dlhých polysacharidových reťazcov (Murray et al., 2005), pretože jedinci, ktorí tvoria iba dlhé polysacharidové reťazce nie sú počas exponenciálnej fázy rastu chránení voči lytickým účinkom zložiek komplementu (Bravo et al., 2008). Naopak baktérie s veľmi dlhými polysacharidovými reťazcami sú odolné voči vplyvu séra nezávisle na fáze rastu (Bravo et al., 2008). Baktérie exprimujúce dlhé reťazce sú častejšie pohltené makrofágmi ako baktérie exprimujúce veľmi dlhé polysacharidové reťazce (Murray et al., 2006). Podobný vplyv má dĺžka O antigénu na vstup do epitelových buniek (Hölzer et al., 2009). Subpopulácia exprimujúca  $Wzz_{\text{fepE}}$  má nižšiu schopnosť napádať bunky pravdepodobne preto, že dĺžka ihly T3SS-1 je kratšia ako dĺžka veľmi dlhých reťazcov O antigénu, ktoré týmto spôsobom bránia interakcii T3SS-1 s hostiteľskou bunkou (Murray et al., 2006). Počas invázie epitelových buniek polysacharidový reťazec svojou prítomnosťou zabraňuje rozoznaniu lipidu A receptormi TLR-4, a tým umožňuje v skorých fázach infekcie nepozorované množenie *Salmonely* v epitelových bunkách (Duerr et al., 2009).

## 7.2 Vplyv heterogénnej expresie *gtrABC* na O antigén

Operón *gtrABC* reguluje formu O antigénu. Proteíny GtrABC sprostredkujú pripojenie glukózových zvyškov na O antigén (Bogomolnaya et al., 2008). Neschopnosť pripájania glukózy na O antigén nemá efekt na schopnosť *Salmonely* napádať epitelové bunky ani makrofágy, avšak nadmerná glukosylácia O antigénu, u GtrABC On baktérií, ich invazivitu tlmí (Bogomolnaya et al., 2008). Populácia s mutovanými génmi *gtrABC* nevykazuje zníženú schopnosť kolonizovať hostiteľa v ranných fázach infekcie, no po 9 dňoch sa z hostiteľa vytráti (Bogomolnaya et al., 2008). Glukosylácia riadená GtrABC v neskorších fázach po infekcii môže spôsobiť, že zložky adaptívnej imunity, ktorá sa aktivuje až po pár dňoch, nedokážu identifikovať *Salmonelu* na základe O antigénu (Bogomolnaya et al., 2008). Uniknutie rozoznaniu imunitným systémom umožňuje *Salmonele* s GtrABC On fenotypom spôsobovať dlhodobé infekcie, na rozdiel od baktérií, ktoré nemodifikujú O antigény glukózou (Bogomolnaya et al., 2008).

Expresia *gtrABC* je regulovaná komplexom proteínov OxyR spolu s Dam metyltransferázou (Obr. 7 – A). OxyR v tomto prípade funguje ako represor transkripcie, keďže pri jeho mutácii sa vytvorila populácia vykazujúca len GtrABC On fenotyp (Broadbent et al., 2010). Regulačnú oblasť *gtrABC* operónu môžeme rozdeliť na tri oblasti  $OxyR_{A-C}$  kde sa môže naviazať OxyR a štyri sekvencie  $GATC_{1-4}$ , ktoré v prípade, že nie sú prekryté OxyR podliehajú

metyláci. Vždy dve väzobné oblasti OxyR<sub>A-C</sub> tvoria jedno väzobné miesto pre OxyR. V stave *gtrABC* On sa OxyR viaže na oblasť OxyR<sub>AB</sub>, čo umožňuje naviazanie RNA polymerázy a metyláciu sekvencií GATC<sub>3</sub> a GATC<sub>4</sub> (Broadbent et al., 2010). Naopak jedinci neexprimujúci *gtrABC* majú metylované úseky GATC<sub>1</sub> a GATC<sub>2</sub> a OxyR viaže oblasti OxyR<sub>BC</sub> (Broadbent et al., 2010).



**Obr. 7 – Regulácia transkripcie *opvAB* a *gtrABC*** (preložené z (\*García-Pastor et al., 2019)). (A) znázorňuje reguláciu *gtrABC*. V prípade naviazania OxyR na oblasti OxyR<sub>AB</sub> sú metylované úseky GATC<sub>3</sub> a GATC<sub>4</sub> a transkripcia prebieha. Ak sú metylované oblasti GATC<sub>1</sub> a GATC<sub>2</sub> a OxyR sa viaže OxyR<sub>BC</sub> transkripcia neprebieha. (B) Expressia je aktívna ak je OxyR naviazané na oblasti OBS<sub>AB</sub> a OBS<sub>CD</sub> a úseky GATC<sub>1</sub> a GATC<sub>3</sub> sú metylované. V prípade naviazania sa OxyR na oblasti OBS<sub>A</sub> a OBS<sub>C</sub> sú metylované úseky GATC<sub>2</sub> a GATC<sub>4</sub> a expresia neprebieha.

### 7.3 Vplyv heterogénnej expresie *opvAB* na O antigén

Na dĺžku O antigénu má vplyv aj expresia *opvAB* operónu. Baktérie vykazujúce O<sub>p</sub>vAB On fenotyp tvoria len malú časť populácie, približne 1% (Cota et al., 2016). Pod vplyvom génov *opvAB* má O antigén dĺžku len 3-8 podjednotiek, tvorí sa krátky lipopolysacharidový reťazec (Cota et al., 2012). Heterogenita v expresii odpovedá stratégii zaistenia stávky (Cota et al., 2012). Jedinci s O<sub>p</sub>vAB On fenotypom sú citlivejší na zložky séra a majú zníženú schopnosť proliferácie v makrofágoch (Cota et al., 2012). Kvôli zníženej schopnosti proliferácie sa takáto subpopulácia nepodieľa na šírení infekcie a jej virulencia je znížená (Cota et al., 2012). Pre populáciu *Salmonely* je však výhodné obsahovať aspoň malé percento jedincov s O<sub>p</sub>vAB On fenotypom, pretože sú odolné voči infekcii bakteriofágmi, ktoré využívajú O antigén ako receptor (Cota et al., 2012). Patria sem napríklad fágy P22, Det7 a 9NA (Cota et al., 2015). Pri



napadnutí populácie bakteriofágom prežijú iba baktérie exprimujúce OpvAB, ktoré majú skráteneý O antigén a bakteriofág ich nie je schopný rozoznať (Cota et al., 2012). Po vymiznutí bakteriofágu z prostredia dokážu rýchlo obnoviť populáciu, ktorej jedinci vykazujú oba fenotypy (Cota et al., 2015).

Expresia *opvAB* operónu je regulovaná podobne ako expresia *gtrABC* operónu, komplexom proteínov OxyR spolu s Dam metyltransferázou (Obr. 7; Cota et al., 2012). Regulačná oblasť *opvAB* pozostáva zo štyroch sekvencií GATC<sub>1-4</sub> a štyroch oblastí OBS<sub>A-D</sub>. Vždy dve z oblastí OBS tvoria spolu jedno väzobné miesto pre tetramér OxyR (Cota et al., 2016). OxyR bráni metylácii oblastí, ktoré prekryva svojim naviazaním. V prípade, že sa OxyR naviaže na úseky OBS<sub>AC</sub>, sú metylované sekvencie GATC<sub>2</sub> a GATC<sub>4</sub>. V tomto prípade baktérie vykazujú OpvAB Off fenotyp (Cota et al., 2016). Naopak v prípade naviazania sa OxyR na úseky OBS<sub>AB</sub> a OBS<sub>CD</sub> sú metylované úseky GATC<sub>1</sub> a GATC<sub>3</sub> a jedinec vykazuje OpvAB On fenotyp (Cota et al., 2016).

## Záver

Táto práca zhrňa doterajšie poznatky o heterogenite v expresii faktorov virulencie *Salmonely*. Expresia faktorov virulencie je z hľadiska jednotlivých baktérií častokrát nevýhodná, pretože ich vystavuje pôsobeniu imunitných buniek hostiteľa, ale súčasne prináša mnoho výhod celkovej populácii *Salmonel* v jednom hostiteľovi. Pravdepodobne preto došlo v evolúcii *Salmonely* k fixácii mechanizmov zaisťujúcich heterogénnu expresiu mnohých faktorov virulencie.

Expresia faktorov virulencie je pre baktériu metabolicky náročná a často za ňu platí daň v podobe spomaleného rastu, avšak umožňuje infekciu hostiteľských buniek a vznik perzisterov. Expresia bičikov a s tým spojená schopnosť chemotaxie umožňuje takto vybaveným baktériám vyhľadávať oblasti s priaznivejšími podmienkami pre rast a delenie. Vypnutie expresie dobre konzervovaných štruktúr, napríklad fimbrií, umožňuje *Salmonele* únik pred rozpoznaním imunitným systémom, avšak ich expresia je potrebná k rozpoznaní a adhézii na epitelové bunky hostiteľa. Modifikácie dĺžky LPS zas prispievajú k odolnosti voči zložkám séra. Formovanie biofilmu umožňuje *Salmonele* prežiť dlhší čas mimo hostiteľa a pritom si zachovať kompletnú virulenciu. Vzhľadom na pomerne veľké množstvo heterogénne exprimovaných virulentných faktorov môžeme povedať, že izogénnu populáciu *Salmonely* tvorí mnoho vysoko špecializovaných jedincov a výhody či nevýhody každého z nich závisia na aktuálnych environmentálnych podmienkach.

V súčasnosti disponujeme pomerne veľkým množstvom informácií o heterogenite v expresii SPI-1, bičikov, niektorých fimbrií či LPS, avšak ohľadom heterogenity u SPI-2 a jeho efektorov sa nevie skoro nič. Pretože expresia SPI-2 je dôležitá pre vznik systémovej infekcie, pre dlhodobú kolonizáciu hostiteľa a vznik prenášačov, je štúdium heterogenity tohto faktoru virulencie do budúca veľmi dôležité.

## Literatúra

- Ackermann, M., Stecher, B., Freed, N. E., Songhet, P., Hardt, W. D., & Doebeli, M. (2008). Self-destructive cooperation mediated by phenotypic noise. *Nature*, *454*(7207), 987–990. <https://doi.org/10.1038/nature07067>
- Althouse, C., Patterson, S., Fedorka-Cray, P., & Isaacson, R. E. (2003). Type 1 fimbriae of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium bind to enterocytes and contribute to colonization of swine *in vivo*. *Infection and Immunity*, *71*(11), 6446–6452. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.11.6446-6452.2003>
- Aranda, C. M. A., Swansont, J. A., Loomis, W. P., & Miller, S. I. (1992). *Salmonella* Typhimurium activates virulence gene transcription within acidified macrophage phagosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(21), 10079–10083. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.21.10079>
- Arnoldini, M., Vizcarra, I. A., Peña-Miller, R., Stocker, N., Diard, M., Vogel, V., Beardmore, R. E., Hardt, W. D., & Ackermann, M. (2014). Bistable expression of virulence genes in salmonella leads to the formation of an antibiotic-tolerant subpopulation. *PLoS Biology*, *12*(8), e1001928. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001928>
- Balaban, N. Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L., & Leibler, S. (2004). Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science*, *305*(5690), 1622–1625. <https://doi.org/10.1126/science.1099390>
- Batchelor, R. A., Alifano, P., Biffali, E., Hull, S. I., & Hull, R. A. (1992). Nucleotide sequences of the genes regulating O-polysaccharide antigen chain length (rol) from *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium: Protein homology and functional complementation. *Journal of Bacteriology*, *174*(16), 5228. <https://doi.org/10.1128/jb.174.16.5228-5236.1992>
- Bäumler, A. J., Tsolis, R. M., Bowe, F. A., Kusters, J. G., Hoffmann, S., & Heffron, F. (1996b). The *pef* fimbrial operon of *Salmonella* Typhimurium mediates adhesion to murine small intestine and is necessary for fluid accumulation in the infant mouse. *Infection and Immunity*, *64*(1), 61–68. <https://doi.org/10.1128/IAI.64.1.61-68.1996>
- Bäumler, A., Tsolis, R. M., & Heffron, F. (1996c). Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella* Typhimurium. *Infection and Immunity*, *64*(5), 1862–1865. <https://doi.org/10.1128/IAI.64.5.1862-1865.1996>
- Bäumler, Andreas J, Tsolis, R. M., & Heffron, F. (1996a). The *lpf* fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella* Typhimurium to murine Peyer's patches. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(1), 279–283. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.1.279>
- Beuzón, C. R., Banks, G., Rg Deiwick, J. È., Hensel, M., & Holden, D. W. (1999). pH-dependent secretion of SseB, a product of the SPI-2 type III secretion system of *Salmonella* Typhimurium. *Molecular Microbiology*, *33*(4), 806–816. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01527.x>

- Bigger, J. W. (1944). Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation. *The Lancet*, 244(6320), 497–500. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)74210-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)74210-3)
- Bogomolnaya, L. M., Santiviago, C. A., Yang, H. J., Bäumler, A. J., & Andrews-Polymenis, H. L. (2008). “Form variation” of the O12 antigen is critical for persistence of *Salmonella* Typhimurium in the murine intestine. *Molecular Microbiology*, 70(5), 1105–1119. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06461.x>
- Bonifield, H. R., & Hughes, K. T. (2003). Flagellar phase variation in *Salmonella enterica* is mediated by a posttranscriptional control mechanism. *Journal of Bacteriology*, 185(12), 3567–3574. <https://doi.org/10.1128/JB.185.12.3567-3574.2003>
- Bravo, D., Silva, C., Carter, J. A., Hoare, A., Lvarez, S. A. A., Blondel, C. J., Zaldívar, M., Valvano, M. A., & Contreras, I. S. (2008). Growth-phase regulation of lipopolysaccharide O-antigen chain length influences serum resistance in serovars of *Salmonella*. *Journal of Medical Microbiology*, 57(8), 938–946. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47848-0>
- Broadbent, S. E., Davies, M. R., & van der Woude, M. W. (2010). Phase variation controls expression of *Salmonella* lipopolysaccharide modification genes by a DNA methylation-dependent mechanism. *Molecular Microbiology*, 77(2), 337–353. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07203.x>
- Brumell, J. H., Tang, P., Zaharik, M. L., & Finlay, B. B. (2002). Disruption of the *Salmonella*-containing vacuole leads to increased replication of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the cytosol of epithelial cells. *Infection and Immunity*, 70(6), 3264–3270. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.6.3264-3270.2002>
- Carter, P. B., & Collins, F. M. (1974). The route of enteric infection in normal mice. *Journal of Experimental Medicine*, 139(5), 1189–1203. <https://doi.org/10.1084/jem.139.5.1189>
- Chakraborty, S., Mizusaki, H., & Kenney, L. J. (2015). A FRET-based DNA biosensor tracks OmpR-dependent acidification of *Salmonella* during macrophage infection. *PLoS Biology*, 13(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002116>
- Chessa, D., Winter, M. G., Jakomin, M., & Bäumler, A. J. (2009). *Salmonella enterica* serotype Typhimurium Std fimbriae bind terminal  $\alpha(1,2)$ fucose residues in the cecal mucosa. *Molecular Microbiology*, 71(4), 864–875. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06566.x>
- \*Chevance, F. F. v, & Hughes, K. T. (2008). Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nature Reviews Microbiology*, 6(6), 455–465. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1887>
- \*Clements, M., Eriksson, S., Tezcan-Merdol, D., Hinton, J. C. D., & Rhen, M. (2001). Virulence gene regulation in *Salmonella enterica*. *Annals of Medicine*, 33(3), 178–185. <https://doi.org/10.3109/07853890109002075>

- Cota, I., Béatrice Blanc-Potard, A., & Casadesú, J. (2012). STM2209-STM2208 (opvAB): a phase variation locus of *Salmonella enterica* involved in control of O-antigen chain length. *PLoS ONE*, *7*(5), 36863. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036863>
- Cota, I., Bunk, B., Spröer, C., Overmann, J., König, C., & Casadesús, J. (2016). OxyR-dependent formation of DNA methylation patterns in OpvAB OFF and OpvAB ON cell lineages of *Salmonella enterica*. *Nucleic Acids Research*, *44*(8), 3595–3609. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1483>
- Cota, I., Sánchez-Romero, M. A., Hernández, S. B., Pucciarelli, M. G., García-Del Portillo, F., & Casadesús, J. (2015). Epigenetic control of *Salmonella enterica* O-antigen chain length: A tradeoff between virulence and bacteriophage resistance. *PLoS Genetics*, *11*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005667>
- Crawford, R. W., Reeve, K. E., & Gunn, J. S. (2010). Flagellated but not hyperfimbriated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium attaches to and forms biofilms on cholesterol-coated surfaces. *Journal of Bacteriology*, *192*(12), 2981–2990. <https://doi.org/10.1128/JB.01620-09>
- Cummings, L. A., Barrett, S. L., Wilkerson, W. D., Fellnerova, I., & Cookson, B. T. (2005). FliC-specific CD4+ T cell responses are restricted by bacterial regulation of antigen expression. *Journal of Immunology*, *174*(12), 7929–7938. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.12.7929>
- Cummings, Lisa A, Wilkerson, W. D., Bergsbaken, T., & Cookson, B. T. (2006). In vivo, *fliC* expression by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is heterogeneous, regulated by ClpX, and anatomically restricted. *Molecular Microbiology*, *61*(3), 795–809. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05271.x>
- da Silva, P., Manieri, F. Z., Herrera, C. M., Trent, M. S., & Moreira, C. G. (2018). Novel Role of VisP and the Wzz system during O-antigen assembly in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenesis. *Infection and Immunity*, *86*(8), e00319–18. <https://doi.org/10.1128/IAI.00319-18>
- Diard, M., Garcia, V., Maier, L., Remus-Emsermann, M. N. P., Regoes, R. R., Ackermann, M., & Hardt, W. D. (2013). Stabilization of cooperative virulence by the expression of an avirulent phenotype. *Nature*, *494*(7437), 353–356. <https://doi.org/10.1038/nature11913>
- Diard, M., Sellin, M. E., Dolowschiak, T., Arnoldini, M., Ackermann, M., & Hardt, W. D. (2014). Antibiotic treatment selects for cooperative virulence of *Salmonella* Typhimurium. *Current Biology*, *24*(17), 2000–2005. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.07.028>
- Duerr, C. U., Zenk, S. F., Chassin, C., Pott, J., Gütle, D., Hensel, M., & Hornef, M. W. (2009). O-antigen delays lipopolysaccharide recognition and impairs antibacterial host defense in murine intestinal epithelial cells. *PLoS Pathogens*, *5*(9), e1000567. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000567>

- \*Eng, S.-K., Pusparajah, P., Ab Mutalib, N.-S., Ser, H.-L., Chan, K.-G., & Lee, L.-H. (2015). *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science*, 8(3), 284–293. <https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1051243>
- Eriksson, S., Lucchini, S., Thompson, A., Rhen, M., & Hinton, J. C. D. (2003). Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Molecular Microbiology*, 47(1), 103–118. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03313.x>
- \*Figueira, R., & Holden, D. W. (2012). Functions of the *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI-2) type III secretion system effectors. *Microbiology*, 158(5), 1147–1161. <https://doi.org/10.1099/mic.0.058115-0>
- Furne, J., Springfield, J., Koenig, T., DeMaster, E., & Levitt, M. D. (2001). Oxidation of hydrogen sulfide and methanethiol to thiosulfate by rat tissues: A specialized function of the colonic mucosa. *Biochemical Pharmacology*, 62(2), 255–259. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(01\)00657-8](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(01)00657-8)
- \*García-Pastor, L., Puerta-Fernández, E., & Casadesús, J. (2019). Bistability and phase variation in *Salmonella enterica*. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1862(7), 752–758. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2018.01.003>
- García-Pastor, L., Sánchez-Romero, M. A., Gutiérrez, G., Puerta-Fernández, E., & Casadesús, J. (2018). Formation of phenotypic lineages in *Salmonella enterica* by a pleiotropic fimbrial switch. *PLoS Genetics*, 14(9), e1007677. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007677>
- García-Pastor, L., Sánchez-Romero, M. A., Jakomin, M., Puerta-Fernández, E., & Casadesús, J. (2019). Regulation of bistability in the *std* fimbrial operon of *Salmonella enterica* by DNA adenine methylation and transcription factors HdfR, StdE and StdF. *Nucleic Acids Research*, 47(15), 7929–7941. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz530>
- Gerstel, U., & Römling, U. (2001). Oxygen tension and nutrient starvation are major signals that regulate *agfD* promoter activity and expression of the multicellular morphotype in *Salmonella* Typhimurium. *Environmental Microbiology*, 3(10), 638–648. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00235.x>
- Gibson, D. L., White, A. P., Snyder, S. D., Martin, S., Heiss, C., Azadi, P., Surette, M., & Kay, W. W. (2006). *Salmonella* produces an O-Antigen capsule regulated by AgfD and important for environmental persistence. *Journal of Bacteriology*, 188(22), 7722–7730. <https://doi.org/10.1128/JB.00809-06>
- Ginocchio, C., Pace, J., & Galán, J. E. (1992). Identification and molecular characterization of a *Salmonella* Typhimurium gene involved in triggering the internalization of salmonellae into cultured epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(13), 5976–5980. <https://doi.org/10.1073/PNAS.89.13.5976>

- Gonzalez-Escobedo, G., & Gunn, J. S. (2013). Gallbladder epithelium as a niche for chronic *Salmonella* carriage. *Infection and Immunity*, *81*(8), 2920–2930. <https://doi.org/10.1128/IAI.00258-13>
- Grantcharova, N., Peters, V., Monteiro, C., Zakikhany, K., & Römling, U. (2010). Bistable expression of CsgD in biofilm development of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, *192*(2), 456–466. <https://doi.org/10.1128/JB.01826-08>
- Grossman, N., Schmetz, M. A., Foulds, J., Klima, E. N., Jiminez-Lucho, V., Leive, L. L., & Joiner, K. A. (1987). Lipopolysaccharide size and distribution determine serum resistance in *Salmonella* Montevideo. *Journal of Bacteriology*, *169*(2), 856–863. <https://doi.org/10.1128/jb.169.2.856-863.1987>
- \*Gulig, P. A. (1990). Virulence plasmids of *Salmonella* Typhimurium and other salmonellae. *Microbial Pathogenesis*, *8*(1), 3–11. [https://doi.org/10.1016/0882-4010\(90\)90003-9](https://doi.org/10.1016/0882-4010(90)90003-9)
- Gulig, P. A., & Doyle, T. J. (1993). The *Salmonella* Typhimurium virulence plasmid increases the growth rate of salmonellae in mice. *Infection and Immunity*, *61*(2), 504–511. <https://doi.org/10.1128/IAI.61.2.504-511.1993>
- Gunn, J. S., & Miller, S. I. (1996). PhoP-PhoQ activates transcription of pmrAB, encoding a two-component regulatory system involved in *Salmonella* Typhimurium antimicrobial peptide resistance. *Journal of Bacteriology*, *178*(23), 6857. <https://doi.org/10.1128/jb.178.23.6857-6864.1996>
- Guo, L., Lim, K. B., Gunn, J. S., Bainbridge, B., Darveau, R. P., Hackett, M., & Miller, S. I. (1997). Regulation of lipid A modifications by *Salmonella* Typhimurium virulence genes *phoP-phoQ*. *Science (New York, N.Y.)*, *276*(5310), 250–253. <https://doi.org/10.1126/science.276.5310.250>
- Haneda, T., Ishii, Y., Shimizu, H., Ohshima, K., Iida, N., Danbara, H., & Okada, N. (2012). *Salmonella* type III effector SpvC, a phosphothreonine lyase, contributes to reduction in inflammatory response during intestinal phase of infection. *Cellular Microbiology*, *14*(4), 485–499. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01733.x>
- \*Haraga, A., Ohlson, M. B., & Miller, S. I. (2008). *Salmonellae* interplay with host cells. *Nature Reviews Microbiology*, *6*(1), 53–66. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1788>
- Hautefort, I., Proença, M. J., & Hinton, J. C. D. (2003). Single-copy green fluorescent protein gene fusions allow accurate measurement of *Salmonella* gene expression *in vitro* and during infection of mammalian cells. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(12), 7480–7491. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7480-7491.2003>
- Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M., & Aderem, A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, *410*(6832), 1099–1103. <https://doi.org/10.1038/35074106>

- Helaine, S., Cheverton, A. M., Watson, K. G., Faure, L. M., Matthews, S. A., & Holden, D. W. (2014). Internalization of *Salmonella* by macrophages induces formation of nonreplicating persisters. *Science*, *343*(6167), 204–208. <https://doi.org/10.1126/science.1244705>
- Helmann, J. D., & Chamberlin, M. J. (1987). DNA sequence analysis suggests that expression of flagellar and chemotaxis genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium is controlled by an alternative sigma factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *84*(18), 6422–6424. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.18.6422>
- Hölzer, S. U., Schlumberger, M. C., Jäckel, D., & Hensel, M. (2009). Effect of the O-antigen length of lipopolysaccharide on the functions of Type III secretion systems in *Salmonella enterica*. *Infection and Immunity*, *77*(12), 5458–5470. <https://doi.org/10.1128/IAI.00871-09>
- Horstmann, J. A., Zschieschang, E., Truschel, T., Juana De Diego, Lunelli, M., Rohde, M., May, T., Strowig, T., Stradal, T., Kolbe, M., & Erhardt, M. (2017). Flagellin phase-dependent swimming on epithelial cell surfaces contributes to productive *Salmonella* gut colonisation. *Cellular Microbiology*, *19*(8). <https://doi.org/10.1111/cmi.12739>
- \*Humphries, A. D., Townsend, S. M., Kingsley, R. A., Nicholson, T. L., Tsolis, R. M., & Bäumlner, A. J. (2001). Role of fimbriae as antigens and intestinal colonization factors of *Salmonella* serovars. *FEMS Microbiology Letters*, *201*(2), 121–125. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10744.x>
- Ilyas, B., Mulder, D. T., Little, D. J., Elhenawy, W., Banda, M. M., Pérez-Morales, D., Tsai, C. N., Chau, N. Y. E., Bustamante, V. H., & Coombes, B. K. (2018). Regulatory evolution drives evasion of host inflammasomes by *Salmonella* Typhimurium. *Cell Reports*, *25*(4), 825–832.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.09.078>
- Jakomin, M., Chessa, D., Bäumlner, A. J., & Casadesús, J. (2008). Regulation of the *Salmonella enterica* *std* fimbrial operon by DNA adenine methylation, SeqA, and HdfR. *Journal of Bacteriology*, *190*(22), 7406–7413. <https://doi.org/10.1128/JB.01136-08>
- Jones, B. D., Ghorri, N., & Falkow, S. (1994). *Salmonella* Typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *The Journal of Experimental Medicine*, *180*(1), 15–23. <https://doi.org/10.1084/jem.180.1.15>
- Joseph, B., Otta, S. K., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (2001). Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*, *64*, 367–372. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(00\)00466-9](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(00)00466-9)
- Kingsley, R. A., van Amsterdam, K., Kramer, N., & Bäumlner, A. J. (2000). The *shdA* gene is restricted to serotypes of *Salmonella enterica* subspecies I and contributes to efficient and prolonged fecal shedding. *Infection and Immunity*, *68*(5), 2720–2727. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.5.2720-2727.2000>



- Kingsley, R. A., Weening, E. H., Marijke Kestra, A., & Bäumler, A. J. (2002). Population heterogeneity of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium resulting from phase variation of the *lpf* operon *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Bacteriology*, *184*(9), 2352–2359. <https://doi.org/10.1128/JB.184.9.2352-2359.2002>
- Klasa, B., Kędzierska, A. E., & Grzymajło, K. (2020). Pre-growth culture conditions affect type 1 fimbriae-dependent adhesion of *Salmonella*. *International journal of molecular sciences*, *21*(12), 4206. <https://doi.org/10.3390/ijms21124206>
- Knodler, L A, Nair, V., & Steele-Mortimer, O. (2014). Quantitative assessment of cytosolic *Salmonella* in epithelial cells. *PLoS ONE*, *9*(1), e84681. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084681>
- Knodler, Leigh A., Finlay, B., & Steele-Mortimer, O. (2005). The *Salmonella* effector protein SopB protects epithelial cells from apoptosis by sustained activation of Akt. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(10), 9058–9064. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412588200>
- Knodler, Leigh A, Vallance, B. A., Celli, J., Winfree, S., Hansen, B., Montero, M., & Steele-Mortimer, O. (2010). Dissemination of invasive *Salmonella* via bacterial-induced extrusion of mucosal epithelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(41), 17733–17738. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006098107>
- Krause, M., Fang, F. C., & Guiney, D. G. (1992). Regulation of plasmid virulence gene expression in *Salmonella* Dublin involves an unusual operon structure. *Journal of Bacteriology*, *174*(13), 4482–4489. <https://doi.org/10.1128/jb.174.13.4482-4489.1992>
- Kum, W. W. S., Lo, B. C., Yu, H. B., & Finlay, B. B. (2011). Protective role of Akt2 in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium-induced gastroenterocolitis. *Infection and Immunity*, *79*(7), 2554–2566. <https://doi.org/10.1128/IAI.01235-10>
- Kutsukake, K., & Iino, T. (1980). Inversions of specific DNA segments in flagellar phase variation of *Salmonella* and inversion systems of bacteriophages P1 and Mu. *Genetics*, *77*(12), 7338–7341. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.12.7338>
- Latasa, C., Roux, A., Toledo-Arana, A., Ghigo, J. M., Gamazo, C., Penadés, J. R., & Lasa, I. (2005). BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Molecular Microbiology*, *58*(5), 1322–1339. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04907.x>
- Lawley, T. D., Bouley, D. M., Hoy, Y. E., Gerke, C., Relman, D. A., & Monack, D. M. (2008). Host transmission of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is controlled by virulence factors and indigenous intestinal microbiota. *Infection and Immunity*, *76*(1), 403. <https://doi.org/10.1128/IAI.01189-07>
- Lee, A. K., Detweiler, C. S., & Falkow, S. (2000). OmpR regulates the two-component system SsrA-SsrB in *Salmonella* pathogenicity island 2. *Journal of Bacteriology*, *182*(3), 771–781. <https://doi.org/10.1128/JB.182.3.771-781.2000>
- Libby, S. J., Lesnick, M., Hasegawa, P., Weidenhammer, E., & Guiney, D. G. (2000). The *Salmonella* virulence plasmid *spv* genes are required for cytopathology in human

- monocyte-derived macrophages. *Cellular Microbiology*, 2(1), 49–58. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2000.00030.x>
- Lockman, H. A., Iii, R. C., Carsiotis, M., Stocker, B. A. D., Holder, I. A., Weinstein, D., & O'Brien, A. D. (1990). *Salmonella* Typhimurium mutants lacking flagella or motility remain virulent in BALB/c mice. *Infection and Immunity*, 58(1), 137–143. <https://doi.org/10.1128/IAI.58.1.137-143.1990>
- López-Garrido, J., & Casadesús, J. (2012). Crosstalk between virulence loci: regulation of *Salmonella enterica* pathogenicity island 1 (SPI-1) by products of the *std* fimbrial operon. *PLoS ONE*, 7(1), e30499. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030499>
- Luk, C. H., Valenzuela, C., Gil, M., Swistak, L., Bomme, P., Chang, Y. Y., Mallet, A., & Enninga, J. (2021). *Salmonella* enters a dormant state within human epithelial cells for persistent infection. *PLoS Pathogens*, 17(4), e1009550. Advance online publication. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009550>
- MacKenzie, K. D., Wang, Y., Shivak, D. J., Wong, C. S., Hoffman, L. J. L., Lam, S., Kröger, C., Cameron, A. D. S., Townsend, H. G. G., Köster, W., & White, A. P. (2015). Bistable expression of CsgD in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium connects virulence to persistence. *Infection and Immunity*, 83(6), 2312–2326. <https://doi.org/10.1128/IAI.00137-15>
- \*Macnab R. M. (2003). How bacteria assemble flagella. *Annual Review of Microbiology*, 57, 77–100. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090832>
- Malik-Kale, P., Winfree, S., & Steele-Mortimer, O. (2012). The bimodal lifestyle of intracellular *Salmonella* in epithelial cells: Replication in the cytosol obscures defects in vacuolar replication. *PLoS ONE*, 7(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038732>
- Mazurkiewicz, P., Thomas, J., Thompson, J. A., Liu, M., Arbibe, L., Sansonetti, P., & Holden, D. W. (2008). SpvC is a *Salmonella* effector with phosphothreonine lyase activity on host mitogen-activated protein kinases. *Molecular Microbiology*, 67(6), 1371–1383. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06134.x>
- McSorley, S. J., Asch, S., Costalonga, M., Reinhardt, R. L., & Jenkins, M. K. (2002). Tracking *Salmonella*-specific CD4 T cells *in vivo* reveals a local mucosal response to a disseminated infection. *Immunity*, 16(3), 365–377. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(02\)00289-3](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00289-3)
- Metcalf, H. J., Best, A., Kanellos, T., La Ragione, R. M., & Werling, D. (2010). Flagellin expression enhances *Salmonella* accumulation in TLR5-positive macrophages. *Developmental and comparative immunology*, 34(8), 797–804. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2010.02.008>
- Miao, E. A., Alpuche-Aranda, C. M., Dors, M., Clark, A. E., Bader, M. W., Miller, S. I., & Aderem, A. (2006). Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1 $\beta$  via Ipaf. *Nature Immunology*, 7(6), 569–575. <https://doi.org/10.1038/ni1344>

- Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J., & Hill, A. M. (2000). M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *The Journal of Immunology*, *164*(12), 6166–6173. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.12.6166>
- Misselwitz, B., Barrett, N., Kreibich, S., Vonaesch, P., & Andritschke, D. (2012). Near surface swimming of *Salmonella* explains target-site selection and cooperative invasion. *PLoS Pathogens*, *8*(7), 1002810. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002810>
- Murray, G. L., Attridge, S. R., & Morona, R. (2003). Regulation of *Salmonella* Typhimurium lipopolysaccharide O antigen chain length is required for virulence; identification of FepE as a second Wzz. *Molecular Microbiology*, *47*(5), 1395–1406. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03383.x>
- Murray, G. L., Attridge, S. R., & Morona, R. (2005). Inducible serum resistance in *Salmonella* Typhimurium is dependent on wzz(fepE)-regulated very long O antigen chains. *Microbes and Infection*, *7*(13), 1296–1304. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.04.015>
- Murray, G. L., Attridge, S. R., & Morona, R. (2006). Altering the length of the lipopolysaccharide O antigen has an impact on the interaction of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with macrophages and complement. *Journal of Bacteriology*, *188*(7), 2735–2739. <https://doi.org/10.1128/JB.188.7.2735-2739.2006>
- Nicholson, B., & Low, D. (2000). DNA methylation-dependent regulation of Pef expression in *Salmonella* Typhimurium. *Molecular Microbiology*, *35*(4), 728–742. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01743.x>
- Norris, T. L., & Bäumlner, A. J. (1999). Phase variation of the *lpf* operon is a mechanism to evade cross-immunity between *Salmonella* serotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(23), 13393–13398. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.23.13393>
- Norris, T. L., Kingsley, R. A., & Bäumlner, A. J. (1998). Expression and transcriptional control of the *Salmonella* Typhimurium *lpf* fimbrial operon by phase variation. *Molecular Microbiology*, *29*(1), 311–320. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00934.x>
- Old, D. C., & Duguid, J. P. (1970). Selective outgrowth of fimbriate bacteria in static liquid medium. *Journal of Bacteriology*, *103*(2), 447–456. <https://doi.org/10.1128/JB.103.2.447-456.1970>
- Olson, M. E., Ceri, H., Morck, D. W., Buret, A. G., & Read, R. R. (2002). Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne de Recherche Veterinaire*, *66*(2), 86–92.
- Pace, J., Hayman, M. J., & Galán, J. E. (1993). Signal transduction and invasion of epithelial cells by *S. Typhimurium*. *Cell*, *72*(4), 505–514. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90070-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90070-7)
- Paesold, G., Guiney, D. G., Eckmann, L., & Kagnoff, M. F. (2002). Genes in the *Salmonella* pathogenicity island 2 and the *Salmonella* virulence plasmid are essential for *Salmonella*-

- induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *Cellular Microbiology*, 4(11), 771–781. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2002.00233.x>
- Passaris, I., Cambré, A., Govers, S. K., & Aertsen, A. (2018). Bimodal Expression of the *Salmonella* Typhimurium *spv* operon. *Genetics*, 210(2), 621–635. <https://doi.org/10.1534/genetics.118.300822>
- Pastelin-Palacios, R., Gil-Cruz, C., Pérez-Shibayama, C. I., Moreno-Eutimio, M. A., Cervantes-Barragán, L., Arriaga-Pizano, L., Ludewig, B., Cunningham, A. F., García-Zepeda, E. A., Becker, I., Alpuche-Aranda, C., Bonifaz, L., Gunn, J. S., Isibasi, A., & López-Macías, C. (2011). Subversion of innate and adaptive immune activation induced by structurally modified lipopolysaccharide from *Salmonella* Typhimurium. *Immunology*, 133(4), 469–481. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2011.03459.x>
- Pontes, M. H., & Groisman, E. A. (2019). Slow growth determines nonheritable antibiotic resistance in *Salmonella enterica*. *Science Signaling*, 12(592), 3938. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aax3938>
- Porwollik, S., Wong, R. M.-Y., & McClelland, M. (2002). Evolutionary genomics of *Salmonella*: Gene acquisitions revealed by microarray analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(13), 8956–8961. <https://doi.org/10.1073/pnas.122153699>
- Prouty, A. M., & Gunn, J. S. (2000). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion is repressed in the presence of bile. *Infection and Immunity*, 68(12), 6763–6769. <https://doi.org/10.1128/iai.68.12.6763-6769.2000>
- \*Que, F., Wu, S., & Huang, R. (2013). *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI-1) at work. *Current Microbiology*, 66(6), 582–587. <https://doi.org/10.1007/s00284-013-0307-8>
- Raffatellu, M., George, M. D., Akiyama, Y., Hornsby, M. J., Nuccio, S. P., Paixao, T. A., Butler, B. P., Chu, H., Santos, R. L., Berger, T., Mak, T. W., Tsolis, R. M., Bevins, C. L., Solnick, J. v., Dandekar, S., & Bäumler, A. J. (2009). Lipocalin-2 resistance confers an advantage to *Salmonella enterica* serotype Typhimurium for growth and survival in the inflamed intestine. *Cell Host and Microbe*, 5(5), 476–486. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.03.011>
- Ray, S., da Costa, R., Thakur, S., & Nandi, D. (2020). *Salmonella* Typhimurium encoded cold shock protein E is essential for motility and biofilm formation. *Microbiology (United Kingdom)*, 166(5), 460–473. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000900>
- Reeves, M. W., Evins, G. M., Heiba, A. A., Plikaytis, B. D., & Farmer, J. J. (1989). Clonal nature of *Salmonella* Typhi and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. *Journal of Clinical Microbiology*, 27(2), 313. <http://jcm.asm.org/content/27/2/313.abstract>
- Rivera-Chávez, F., Winter, S. E., Lopez, C. A., Xavier, M. N., & Winter, M. G. (2013). *Salmonella* uses energy taxis to benefit from intestinal inflammation. *PLoS Pathogens*, 9(4), 1003267. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003267>

- Rivera-Chávez, Fabian, Lopez, C. A., Zhang, L. F., García-Pastor, L., Chávez-Arroyo, A., Lokken, K. L., Tsolis, R. M., Winter, S. E., Bäumlner, A. J., & Mcdaniel, L. S. (2016). Energy taxis toward host-derived nitrate supports a *Salmonella* pathogenicity island 1-independent mechanism of invasion. *MBio*, 7(4), e00960-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.00960-16>
- Rolhion, N., Furniss, R. C. D., Grabe, G., Ryan, A., Liu, M., Matthews, S. A., & Holden, D. W. (2016). Inhibition of nuclear transport of NF-κB p65 by the *Salmonella* type III secretion system effector SpvD. *PLoS Pathogens*, 12(5), e1005653. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005653>
- Römling, U., Sierralta, W. D., Eriksson, K., & Normark, S. (1998). Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella* Typhimurium strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter. *Molecular Microbiology*, 28(2), 249–264. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00791.x>
- Roy, D., Liston, D. R., Idone, V. J., Di, A., Nelson, D. J., Pujol, C., Bliska, J. B., Chakrabarti, S., & Andrews, N. W. (2004). A process for controlling intracellular bacterial infections induced by membrane injury. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5676), 1515-1518. <https://doi.org/10.1126/science.1098371>
- Saini, S., Santosh Koirala, Floess, E., Mears, P. J., Chemla, Y. R., Golding, I., Aldridge, C., Aldridge, P. D., & Rao, C. v. (2010). FliZ induces a kinetic switch in flagellar gene expression. *Journal of Bacteriology*, 192(24), 6477–6481. <https://doi.org/10.1128/JB.00751-10>
- Saliba, A. E., Li, L., Westermann, A. J., Appenzeller, S., Stapels, D. A., Schulte, L. N., Helaine, S., & Vogel, J. (2016). Single-cell RNA-seq ties macrophage polarization to growth rate of intracellular *Salmonella*. *Nature Microbiology*, 2(2), 16206. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.206>
- Sánchez-Romero, M., & Casadesús, J. (2018). Contribution of SPI-1 bistability to *Salmonella enterica* cooperative virulence: insights from single cell analysis. *Scientific Reports*, 8(1), 14875. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33137-z>
- Scher, K., Römling, U., & Yaron, S. (2005). Effect of heat, acidification, and chlorination on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium cells in a biofilm formed at the air-liquid interface. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3), 1163–1168. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.3.1163-1168.2005>
- Spörling, I., Felgner, S., Preuße, M., Eckweiler, D., Rohde, M., Häussler, S., Weiss, S., & Erhardt, M. (2018). Regulation of flagellum biosynthesis in response to cell envelope stress in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *MBio*, 9(3), e00736-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00736-17>
- Stapels, D., Hill, P., Westermann, A. J., Fisher, R. A., Thurston, T. L., Saliba, A. E., Blommestein, I., Vogel, J., & Helaine, S. (2018). *Salmonella* persists undermine host

- immune defenses during antibiotic treatment. *Science (New York, N.Y.)*, 362(6419), 1156–1160. <https://doi.org/10.1126/science.aat7148>
- Stecher, B., Barthel, M., Schlumberger, M. C., Haberli, L., Rabsch, W., Kremer, M., & Hardt, W.-D. (2008). Motility allows *S. Typhimurium* to benefit from the mucosal defence. *Cellular Microbiology*, 10, 1166–1180. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01118.x>
- Stecher, B., Hapfelmeier, S., Müller, C., Kremer, M., Stallmach, T., & Hardt, W. D. (2004). Flagella and chemotaxis are required for efficient induction of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice. *Infection and immunity*, 72(7), 4138–4150. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.7.4138-4150.2004>
- Stecher, B., Robbiani, R., Walker, A. W., Westendorf, A. M., Barthel, M., Kremer, M., Chaffron, S., Macpherson, A. J., Buer, J., Parkhill, J., Dougan, G., von Mering, C., & Hardt, W. D. (2007). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. *PLoS Biology*, 5(10), 2177–2189. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050244>
- \*Steenackers, H., Hermans, K., Vanderleyden, J., & de Keersmaecker, S. C. (2012). *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Research International*, 45(2), 502–531. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.01.038>
- Stewart, M. K., & Cookson, B. T. (2014). Mutually repressing repressor functions and multi-layered cellular heterogeneity regulate the bistable *Salmonella fliC* census. *Molecular Microbiology*, 94(6), 1272–1284. <https://doi.org/10.1111/mmi.12828>
- Stewart, M. K., Cummings, L. A., Johnson, M. L., Berezow, A. B., & Cookson, B. T. (2011). Regulation of phenotypic heterogeneity permits *Salmonella* evasion of the host caspase-1 inflammatory response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(51), 20742–20747. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108963108>
- Sturm, A., Heinemann, M., Arnoldini, M., Benecke, A., Ackermann, M., Benz, M., Dormann, J., & Hardt, W. D. (2011). The cost of virulence: Retarded growth of *Salmonella* Typhimurium cells expressing type III secretion system 1. *PLoS Pathogens*, 7(7). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002143>
- Sun, H., Kamanova, J., Lara-Tejero, M., & Galán, J. E. (2016). A family of *Salmonella* type III secretion effector proteins selectively targets the NF- $\kappa$ B signaling pathway to preserve host homeostasis. *PLoS Pathogens*, 12(3). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005484>
- Sun, Y. H., Rolán, H. G., & Tsolis, R. M. (2007). Injection of flagellin into the host cell cytosol by *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Journal of Biological Chemistry*, 282(47), 33897–33901. <https://doi.org/10.1074/jbc.C700181200>
- Tawfick, M. M., Rosser, A., & Rajakumar, K. (2020). Heterologous expression of the *Salmonella enterica* serovar Paratyphi A *stk* fimbrial operon suggests a potential for repeat sequence-mediated low-frequency phase variation. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 85, 104508. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104508>

- Tezcan-Merdol, D., Engstrand, L., & Rhen, M. (2005). *Salmonella enterica* SpvB-mediated ADP-ribosylation as an activator for host cell actin degradation. *International Journal of Medical Microbiology*, 295, 201–212. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2005.04.008>
- Tomoyasu, T., Ohkishi, T., Ukyo, Y., Tokumitsu, A., Takaya, A., Suzuki, M., Sekiya, K., Matsui, H., Kutsukake, K., & Yamamoto, T. (2002). The ClpXP ATP-dependent protease regulates flagellum synthesis in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 184(3), 645–653. <https://doi.org/10.1128/JB.184.3.645-653.2002>
- van der Velden, A. W., Bäumlner, A. J., Tsolis, R. M., & Heffron, F. (1998). Multiple fimbrial adhesins are required for full virulence of *Salmonella* Typhimurium in mice. *Infection and immunity*, 66(6), 2803–2808. <https://doi.org/10.1128/IAI.66.6.2803-2808.1998>
- Van Puyvelde, S., Pickard, D., Vandellannoote, K., Heinz, E., Barbé, B., de Block, T., Clare, S., Coomber, E. L., Harcourt, K., Sridhar, S., Lees, E. A., Wheeler, N. E., Klemm, E. J., Kuijpers, L., Mbuyi Kalonji, L., Phoba, M. F., Falay, D., Ngbonda, D., Lunguya, O., Jacobs, J., ... Deborggraeve, S. (2019). An African *Salmonella* Typhimurium ST313 sublineage with extensive drug-resistance and signatures of host adaptation. *Nature communications*, 10(1), 4280. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11844-z>
- van Velkinburgh, J. C., & Gunn, J. S. (1999). PhoP-PhoQ-regulated loci are required for enhanced bile resistance in *Salmonella* spp. *Infection and Immunity*, 67(4), 1614–1622.
- Wada, T., Morizane, T., Abo, T., Tominaga, A., Inoue-Tanaka, K., & Kutsukake, K. (2011b). EAL domain protein YdiV acts as an anti-FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub> factor responsible for nutritional control of the flagellar regulon in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 193(7), 1600–1611. <https://doi.org/10.1128/JB.01494-10>
- Wada, T., Tanabe, Y., & Kutsukake, K. (2011a). FliZ acts as a repressor of the *ydiV* gene, which encodes an anti-FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub> factor of the flagellar regulon in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 193(19), 5191–5198. <https://doi.org/10.1128/JB.05441-11>
- Weening, E. H., Barker, J. D., Laarakker, M. C., Humphries, A. D., Tsolis, R. M., & Bäumlner, A. J. (2005). The *Salmonella enterica* serotype Typhimurium *lpf*, *bcf*, *stb*, *stc*, *std*, and *sth* fimbrial operons are required for intestinal persistence in mice. *Infection and Immunity*, 73(6), 3358–3366. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.6.3358-3366.2005>
- White, A. P., Gibson, D. L., Collinson, S. K., Banser, P. A., & Kay, W. W. (2003). Extracellular polysaccharides associated with thin aggregative fimbriae of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Journal of Bacteriology*, 185(18), 5398–5407. <https://doi.org/10.1128/JB.185.18.5398-5407.2003>
- White, A. P., Gibson, D. L., Grassl, G. A., Kay, W. W., Finlay, B. B., Vallance, B. A., & Surette, M. G. (2008). Aggregation via the red, dry, and rough morphotype is not a virulence adaptation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infection and Immunity*, 76(3), 1048–1058. <https://doi.org/10.1128/IAI.01383-07>

- WHO (2018a, January 31). *Typhoid*. Retrieved from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/typhoid>
- WHO (2018b, February 20). *Salmonella (non-typhoidal)*. Retrieved from [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))
- Wilson, J. A., Doyle, T. J., & Gulig, P. A. (1997). Exponential-phase expression of *spvA* of the *Salmonella* Typhimurium virulence plasmid: induction in intracellular salts medium and intracellularly in mice and cultured mammalian cells. *Microbiology (Reading, England)*, *143*(12), 3827–3839. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-12-3827>
- Winter, S. E., Thiennimitr, P., Winter, M. G., Butler, B. P., Huseby, D. L., Crawford, R. W., Russell, J. M., Bevins, C. L., Adams, L. G., Tsolis, R. M., Roth, J. R., & Bäumler, A. J. (2010). Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*. *Nature*, *467*(7314), 426–429. <https://doi.org/10.1038/nature09415>
- Yamaguchi, T., Toma, S., Terahara, N., Miyata, T., Ashihara, M., Minamino, T., Namba, K., & Kato, T. (2020). Structural and functional comparison of *Salmonella* flagellar filaments composed of FljB and FliC. *Biomolecules*, *10*(2), 246. <https://doi.org/10.3390/biom10020246>
- Yu, X.-J., McGourty, K., Liu, M., Unsworth, K. E., & Holden, D. W. (2010). pH sensing by intracellular *Salmonella* induces effector translocation. *Science (New York, N.Y.)*, *328*(5981), 1040–1043. <https://doi.org/10.1126/science.1189000>
- Zarkani, A. A., López-Pagán, N., Grimm, M., Sánchez-Romero, M. A., Ruiz-Albert, J., Beuzón, C. R., & Schikora, A. (2020). *Salmonella* heterogeneously expresses flagellin during colonization of plants. *Microorganisms*, *8*(6), 815. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060815>
- \*Zhou, D., & Galán, J. (2001). *Salmonella* entry into host cells: The work in concert of type III secreted effector proteins. *Microbes and Infection*, *3*(14–15), 1293–1298. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(01\)01489-7](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01489-7)