

Wydział Biologii
Uniwersytetu Gdańskiego

Mgr Adrianna Łupkowska

Bakterie przetrwałe
Escherichia coli i *Klebsiella pneumoniae*
powstałe w warunkach stresowych

Escherichia coli and *Klebsiella pneumoniae*
persisters formed under stressful conditions

Praca przedstawiona
Radzie Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego
celem uzyskania stopnia doktora
w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych
w dyscyplinie nauki biologiczne

Promotor: prof. dr hab. Ewa Laskowska
Promotor pomocniczy: dr inż. Karolina Stojowska-Swędryńska
Katedra Biochemii Ogólnej i Medycznej

GDAŃSK 2024

*Składam serdeczne podziękowania Promotorowi
Pani prof. dr hab. Ewie Laskowskiej za opiekę merytoryczną, cenne wskazówki,
życzliwość i ogrom poświęconego czasu.*

*Dziękuję również Promotorowi Pomocniczemu
Pani dr inż. Karolinie Stojowskiej-Swędryńskiej za pomoc w realizacji
doświadczeń laboratoryjnych oraz nieustanne wsparcie.*

Spis treści

1.	STRESZCZENIE.....	5
2.	ABSTRACT.....	7
3.	WYKAZ SKRÓTÓW	9
4.	WSTĘP	10
4.1.	Bakterie przetrwałe.....	10
4.2.	Warunki indukujące powstawanie bakterii przetrwałych.....	11
4.2.1.	Biofilm bakteryjny	13
4.3.	Mechanizmy odpowiedzialne za tworzenie bakterii przetrwałych.....	15
4.3.1.	Odpowiedź ścisła.....	16
4.3.2.	Odpowiedź SOS	18
4.3.3.	Systemy toksyna-antytoksyna (TA).....	18
4.3.4.	Agregacja i glikacja białek	19
4.4.	Metody zwalczania bakterii przetrwałych	22
4.4.1.	Sulforafan.....	24
4.4.2.	<i>Reline</i>	25
4.5.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	26
5.	CEL PRACY	31
6.	MATERIAŁY I METODY	33
6.1.	Szczepy bakteryjne.....	33
6.2.	Pożywki i podłoża	34
6.3.	Warunki wzrostu bakterii; stres cieplny, wysuszenie i rehydratacja, makrokolonie .	34
6.4.	Elektroforeza poliakrylamidowa białek w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)...	35
6.5.	Detekcja białek w żelu poliakrylamidowych	35
6.6.	Immunodetekcja białek.....	35
6.7.	Detekcja glikowanych białek	36
6.8.	Izolacja i oznaczanie ilości agregatów białkowych <i>E. coli</i>	36
6.9.	Izolacja agregatów białkowych z komórek <i>K. pneumoniae</i>	37
6.10.	Oznaczanie pochodnych karbonylowych w białkach.....	37
6.11.	Wyznaczenie tempa wzrostu i fazy <i>lag</i> na podłożu stałym.....	38
6.12.	Analiza białek metodą spektrometrii mas.....	38
6.13.	Oznaczanie całkowitej liczby komórek bakteryjnych, liczby komórek dzielących się, żywych i martwych.....	39
6.14.	Oznaczenie poziomu komórek przetrwałych.....	39

6.15.	Wirowanie w gradiencie Percollu	40
6.16.	Analiza statystyczna	40
7.	WYNIKI	41
7.1.	Agregacja i glikacja białek oraz powstawanie bakterii przetrwałych u <i>E. coli</i>	41
7.1.1.	Wysuszanie hodowli płynnych i rehydratacja <i>E. coli</i> indukują agregację białek oraz powstawanie bakterii przetrwałych.....	41
7.1.2.	W trakcie wysuszania i rehydratacji w komórkach <i>E. coli</i> pojawiają się produkty glikacji.....	42
7.2.	Powstawanie bakterii przetrwałych u <i>K. pneumoniae</i>	46
7.2.1.	Izolacja bakterii przetrwałych <i>K. pneumoniae</i>	46
7.2.2.	Szczepy <i>K. pneumoniae</i> produkują komórki heterooporne na kolistynę	52
7.2.3.	Próba izolacji agregatów białkowych z komórek <i>K. pneumoniae</i>	58
7.3.	W makrokolonjach <i>K. pneumoniae</i> można wyróżnić dwie subpopulacje: formę mukoidalną (centrum) i formę niemukoidalną (pierścień)	58
7.3.1.	Makrokolonie izolatów <i>K. pneumoniae</i> różnią się obecnością celulozy i fimbrii typu <i>curli</i>	60
7.3.2.	Subpopulacje w makrokolonjach <i>K. pneumoniae</i> różnią się poziomem bakterii dzielących się, VBNC, heteroopornych oraz przetrwałych.....	62
7.3.3.	Poziom glikowanych białek w subpopulacji C (centrum) jest wyższy niż w subpopulacji P (pierścień)	63
7.3.4.	Bakterie pochodzące z subpopulacji centrum i pierścienia różnią się długością fazy lag w pożywce płynnej.....	64
7.3.5.	Subpopulacje centrum i pierścień charakteryzują się porównywalną długością fazy lag i tempem wzrostu na podłożu stałym.....	65
7.3.6.	Subpopulacje centrum i pierścienia różnią się profilem białkowym	67
7.4.	Wpływ sulforafanu i eutektyku <i>Reline</i> na bakterie przetrwałe <i>K. pneumoniae</i>	82
7.4.1.	Sulforafan (SFN)	82
7.4.2.	Eutektyk <i>Reline</i> (chlorek choliny + mocznik).....	84
8.	DYSKUSJA.....	88
9.	LITERATURA.....	108

1. STRESZCZENIE

Problem antybiotykooporności jest jednym z najpoważniejszych zagrożeń zdrowia publicznego. Wiele badań wskazuje na to, że główną przyczyną, prócz oporności na antybiotyki, są tolerujące wysokie stężenia antybiotyków bakterie przetrwałe (ang. *persisters*). Jest to zwykle mała subpopulacja bakterii o zahamowanym lub bardzo powolnym metabolizmie. W przeciwieństwie do bakterii opornych, komórki przetrwałe nie dzielą się w obecności antybiotyku i pod względem genetycznym są identyczne jak bakterie wrażliwe, z których pochodzą. Po zakończeniu terapii antybiotykowej mogą ponownie zacząć się dzielić prowadząc do nawrotu infekcji. Bakterie przetrwałe stanowią zwykle niewielki procent populacji, dlatego są trudno wykrywalne. Z czasem mogą przejść w stan VBNC (ang. *Viable But Non-Culturable*), charakterystyczny dla komórek, które nie są zdolne do podziałów w standardowych podłożach mikrobiologicznych. Bakterie przetrwałe i VBNC mogą pojawiać się spontanicznie lub w wyniku działania różnych czynników stresowych (np. głodu, stresu oksydacyjnego, zmiany pH). Dane literaturowe wskazują, że spowolnienie metabolizmu indukujące stan przetrwały może być efektem agregacji endogennych białek. Wiadomo również, że powstawanie agregatów może zachodzić w wyniku utraty wody oraz glikacji białek w komórce bakteryjnej.

Celem tej pracy było sprawdzenie czy agregaty białek, które powstają podczas wysuszenia i rehydracji *Escherichia coli* zawierają glikowane białka oraz czy w hodowlach *Klebsiella pneumoniae*, podobnie jak u *E. coli*, istnieje korelacja pomiędzy agregacją białek a pojawianiem się bakterii przetrwałych. W przypadku *K. pneumoniae* większość doświadczeń prowadzono wykorzystując makrokolonie, które są formą biofilmu na podłożu stałym, narażoną na stopniową utratę wody. Okazało się, że takie warunki szczególnie sprzyjały powstawaniu bakterii przetrwałych. Uzyskane w tej pracy wyniki wykazały ponadto, że w trakcie wysuszenia/rehydracji *E. coli* większość produktów glikacji pozostawała we frakcji rozpuszczalnej i nie ulegała agregacji. Analiza poziomu agregatów i glikowanych białek w subpopulacjach *E. coli* o różnej zawartości komórek żywych-dzielących się, VBNC i martwych pozwoliła na stwierdzenie, że agregaty białkowe prawdopodobnie pełnią rolę ochronną w trakcie stresu. Tak jak się spodziewano, w przypadku *E. coli* agregacji białek podczas wysuszenia i rehydracji towarzyszył wzrost poziomu bakterii przetrwałych. W związku z trudnościami w izolacji agregatów białkowych z *K. pneumoniae* skupiono się na innych aspektach związanych z bakteriami przetrwałymi i zróżnicowaniem makrokolonii *K. pneumoniae*. Stwierdzono, że w makrokoloniiach wybranych izolatów klinicznych można wyróżnić dwie subpopulacje: formę

mukoidalną - centrum, oraz niemukoidalny pierścień. Subpopulacja centrum charakteryzowała się wyższym poziomem bakterii przetrwałych, VBNC i heteroopornych na kolistynę, oraz większą zawartością produktów glikacji w porównaniu z subpopulacją pierścienia. Dodatkowo badania proteomiczne wykazały, że w bakteriach z centrum znajduje się mniej białek rybosomalnych i znacznie więcej czynnika promującego hibernację rybosomów (YhbH/Hpf), co może wyjaśniać zwiększoną tolerancję tej populacji na antybiotyki .

W związku z tym, że bakterie przetrwałe są przyczyną niepowodzenia antybiotykoterapii, w ostatnich latach coraz więcej badań skupia się na poszukiwaniu związków o właściwościach „*anti-persister*”. W ramach mojej pracy zbadałam wpływ sulforafanu i eutektyku *Reline*, na powstawanie oraz eliminację bakterii przetrwałych. W zależności od szczepu *K. pneumoniae*, stężenia sulforafanu lub *Reline* oraz użytej próby (całe hodowle bakteryjne lub wyizolowane bakterie przetrwałe) uzyskano różne wyniki. Oba te związki były skuteczne w zabijaniu bakterii przetrwałych izolowanych z makrokolonii *K. pneumoniae* po działaniu meropenemu. Jednak dodane do hodowli wraz meropenemem, częściowo lub całkowicie znosiły efekt działania antybiotyku, powodując wzrost poziomu bakterii przetrwałych. Doświadczenia te wykazały, że stosowanie izotiocyjanianów i cieczy głęboko eutektycznych może stanowić poważny problem, jeżeli w trakcie terapii nie będzie monitorowany poziom bakterii przetrwałych.

Prezentowane wyniki poszerzają wiedzę na temat mechanizmów, które chronią bakterie przed stresem (agregaty białek) i warunkują różne formy tolerancji lub oporności na antybiotyki (bakterie przetrwałe, VBNC i heterooporne). Kontynuowanie tych badań może w przyszłości pomóc w opracowaniu nowych strategii zwalczających bakterie przetrwałe.

2. ABSTRACT

The problem of antibiotic resistance is one of the most serious threats to public health. Many studies indicate that the main cause, apart from antibiotic resistance, is persistent bacteria that tolerate high concentrations of antibiotics. Persistence is a phenotypic variant usually exhibited by a small number of bacteria that often are non- or slow-growing. Persisters, unlike typical antibiotic-resistant bacteria, do not divide in the presence of antibiotics and are genetically identical to antibiotic-sensitive cells. Persisters can cause recurrent infections because they can resume growth after antibiotic treatment. They usually represent a small percentage of the population; therefore, they are difficult to detect. Over time, persisters can enter the VBNC (Viable But Non-Culturable) state, which is characteristic of cells that are unable to divide in standard microbiological/culture media. Persisters and VBNC can emerge stochastically in the population, but their formation can also be induced by a number of stress factors (e.g., starvation, oxidative stress, and pH change). Literature data indicate that aggregation of endogenous proteins can slow down metabolism and allow bacteria to enter a persistent state. It is also known that the formation of aggregates can result from water loss in the bacterial cell and protein glycation.

The aim of this work was to determine whether protein aggregates formed during *Escherichia coli* desiccation and rehydration contain glycated proteins, and whether in *Klebsiella pneumoniae* cultures, similar to *E. coli*, there is a correlation between protein aggregation and the appearance of persisters. In the case of *K. pneumoniae*, most experiments were conducted using macrocolonies, a form of biofilm on a solid media exposed to gradual water loss. It turned out that such conditions were particularly contributive to the formation of persister bacteria. The results obtained in this work also showed that during *E. coli* desiccation/rehydration, most glycation products remained in the soluble fraction and were not trapped in the aggregates. Analysis of the level of aggregates and glycated proteins in *E. coli* subpopulations with different content of live-dividing, VBNC and dead cells allowed us to conclude that protein aggregates might play a protective role during stress. As expected, in the case of *E. coli*, protein aggregation during desiccation and rehydration was associated with an increase in the level of persistent bacteria. Due to difficulties in isolating protein aggregates from *K. pneumoniae*, I focused on other aspects related to persister bacteria and the diversity of *K. pneumoniae* macrocolonies. Several clinical isolates formed two subpopulations in macrocolonies: mucoid center and non-mucoid ring. The center subpopulation was characterized by a higher level of persister, VBNC,

and colistin-heteroresistant cells and produced an increased level of glycation products compared to the ring subpopulation. In addition, proteome analysis by SWATH-mass spectrometry revealed that the center contains reduced levels of ribosomal proteins and a higher level of the ribosome hibernation-promoting factor (YhbH/Hpf), which might be responsible for the formation of antibiotic-tolerant bacteria.

Due to the fact that persisters are the cause of antibiotic therapy failure, in recent years increased number of studies have focused on the search for compounds with *anti-persister* properties. As part of my work, I initially examined the effect of sulforaphane and the deep eutectic solvent (reline) on the formation and eradication of persister bacteria. Depending on the *K. pneumoniae* isolates, the concentration of sulforaphane or reline used and the type of sample used (whole bacterial cultures or isolated persister bacteria), different results were obtained. Both of these compounds were effective in killing persister bacteria isolated from *K. pneumoniae* macrocolonies after incubation with antibiotic (meropenem). However, adding sulforaphane or reline to the culture together with meropenem partly or entirely abolished the effect of the antibiotic, causing an increase in the level of persistent bacteria.

The presented results expand our knowledge of the mechanisms that protect bacteria from stress and determine various forms of tolerance or resistance to antibiotics. In the future, they can be used to develop new strategies to eradicate persistent bacteria.

3. WYKAZ SKRÓTÓW

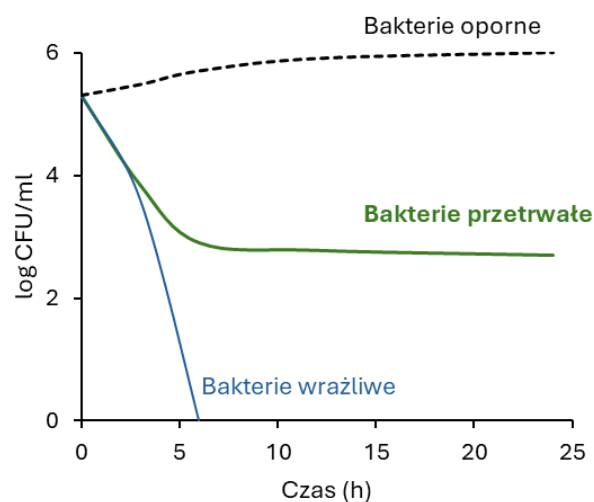
- AGEs (ang. *Advanced Glycation End Products*) - zaawansowane produkty glikacji
- CFU/ml (ang. *colony-forming unit/ml*) - jednostka tworząca kolonię/ml
- cKp (ang. *classical K. pneumoniae*) - szczepy klasyczne *K. pneumoniae*
- CML (ang. *Carboxymethyllysine*) – karboksymetylolizyna
- DNP (ang. *2,4-dinitrophenol*) – 2,4-dinitrofenol
- DNPH (ang. *2,4-dinitrophenylhydrazine*) - 2,4-dinitrofenylohydrazyna
- EDTA (ang. *ethylenediaminetetraacetic acid*) - kwas etylenodiaminotetraoctowy
- EPS (ang. (ang. *extracellular polymeric substance*)) - polisacharydy zewnątrzkomórkowe
- Hpf (ang. *Hibernation promoting factor*) - czynnik indukujący hibernację
- HRP (ang. *Horseradish Peroxidase*) - peroksydaza chrzanowa
- hvKp (ang. *hypervirulent K. pneumoniae*) - szczepy hiperwirulentne *K. pneumoniae*
- ITC (ang. *Isothiocyanates*) - izotiocyjaniany
- LB (ang. *Lysogeny Broth*) - bogata pożywka do hodowli bakterii
- LLPS (ang. *liquid-liquid phase separation*) - rozdział faz ciecz-ciecz
- LPS (ang. *lipopolysaccharide*) - lipopolisacharyd
- MIC (ang. *minimum inhibitory concentration*) - minimalne stężenie hamujące
- MGO (ang. *methylglyoxal*) - metyloglioksal
- MOPS (ang. *3-N-morpholinopropanesulfonic acid*) - kwas 3-N-morfolinopropanosulfonowy
- SDS-PAGE (ang. *sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) - elektroforeza w żelu poliakryloamidowym z dodatkiem SDS
- SFN (ang. *sulforaphane*) - sulforafan
- VBNC (ang. *viable but non-culturable*) - bakterie żywe, które nie wykazują wzrostu na podłożach mikrobiologicznych

4. WSTĘP

4.1. Bakterie przetrwałe

Wiele badań wskazuje na to, że główną przyczyną niepowodzenia antybiotykoterapii i nawracających infekcji, prócz oporności na antybiotyki, są tolerujące wysokie stężenia antybiotyków bakterie przetrwałe (Gollan et al., 2019; Hall-Stoodley et al., 2004; Harms et al., 2016). Bakterie przetrwałe (ang. *persisters*) zostały pierwszy raz opisane w 1944 roku przez Josepha Biggera, który zauważył, że niewielka subpopulacja bakterii *Staphylococcus pyogenes* przeżywa inkubację z penicyliną. Bigger uważał, że *persisters* były uśpionymi, niedzielącymi się komórkami, dlatego były niewrażliwe na działanie penicyliny. Zaproponował procedurę, według której po krótkim okresie podawania penicyliny należało przerwać terapię, aby bakterie przetrwałe mogły ponownie zacząć się dzielić i stać się wrażliwe na antybiotyk (Bigger, 1944).

Obecnie prowadzone badania potwierdzają obserwacje Biggera – bakterie przetrwałe to zwykle niewielka subpopulacja komórek o zahamowanym lub spowolnionym metabolizmie, która jest w stanie przetrwać działanie wysokich stężeń antybiotyków (Balaban et al., 2019). W przeciwieństwie do bakterii opornych, bakterie przetrwałe pod względem genetycznym są identyczne jak komórki wrażliwe. Populacje zawierające komórki przetrwałe charakteryzuje dwufazowa krzywa przeżywalności (Rys. 1). W fazie pierwszej działania antybiotyku następuje gwałtowny spadek liczby komórek, ponieważ giną bakterie wrażliwe. Natomiast w fazie drugiej widoczny jest znacznie wolniejszy spadek CFU/ml prowadzący do plateau, ze względu na obecność bakterii przetrwałych.

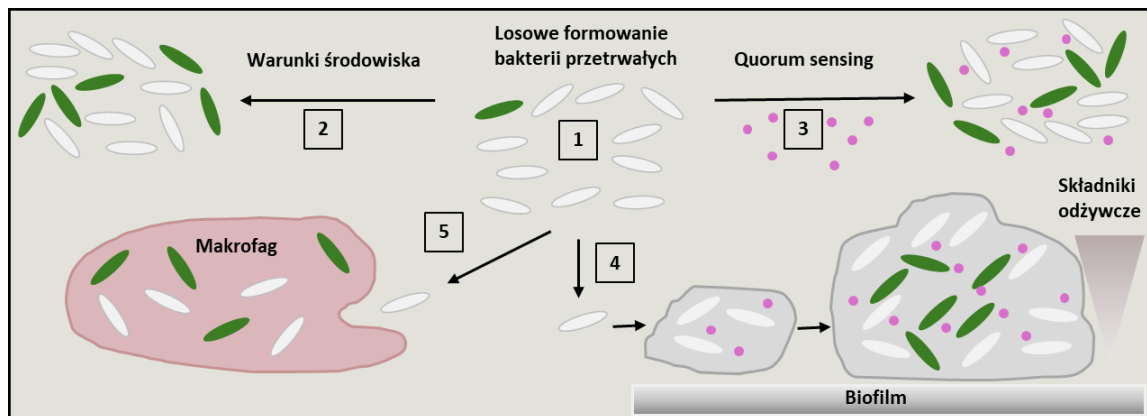


Rys. 1. Krzywe przeżywalności bakterii opornych, przetrwałych i wrażliwych w obecności antybiotyku.

Bakterie przetrwałe nie dzielą się w obecności antybiotyku, jednak po jego usunięciu ze środowiska mogą wznowić podziały i dać początek wrażliwej na antybiotyk populacji. Czas niezbędny do wybudzenia komórek bakteryjnych zależy od tego jak głęboko komórki są uśpione, czyli od ich stanu metabolicznego. Szereg badań sugeruje, że w trakcie działania antybiotyku głęboko uśpione bakterie przetrwałe mogą przechodzić w stan VBNC (ang. *viable but non-culturable*). Komórki VBNC, pozostają żywe, jednak w przeciwieństwie do bakterii przetrwałych, po przeniesieniu do świeżej pożywki nie wznowiają podziałów, nie posiadają zdolności do wzrostu na standardowych podłożach. W celu ich resuscytacji niezbędne jest suplementacja podłoża czynnikami wspomagającymi wzrost, tj. pirogronianem sodu, glutaminianem czy autoinduktorami *quorum sensing* (Ayrapetyan et al., 2014, 2018; Ducret et al., 2014; H. Pan & Ren, 2023; X. H. Zhang et al., 2021). Dodatkowo wiele badań wskazuje że stan przetrwały sprzyja pojawianiu się oporności na antybiotyki (Levin-Reisman et al., 2017; J. Liu et al., 2020; Windels et al., 2019). Gdy w populacji znajduje się duża liczba żywych bakterii, które przetrwały inkubację z antybiotykami, prawdopodobieństwo wystąpienia mutacji powodujących oporność znacząco wzrasta. Wiadomo także, że warunki stresowe indukują zarówno powstawanie bakterii przetrwałych (Michiels et al., 2016), jak i wzrost częstości występowania mutacji (Foster, 2007), co w sposób synergiczny prowadzić może do zwiększenia prawdopodobieństwa pojawienia się oporności (Cohen et al., 2013).

4.2. Warunki indukujące powstawanie bakterii przetrwałych

Bakterie przetrwałe mogą pojawiać się spontanicznie lub mogą być indukowane na skutek działania wielu czynników stresowych. Poziom bakterii przetrwałych wrasta pod wpływem ograniczania składników odżywczych (Amato et al., 2013; Bernier et al., 2013; Fung et al., 2010; Leung & Lévesque, 2012; Nguyen et al., 2011), stresu cieplnego, stresu oksydacyjnego, niekorzystnego pH oraz subletalnych stężeń antybiotyków (Dörr et al., 2010; Leung & Lévesque, 2012; Möker et al., 2010; Wu et al., 2015) (Rys. 2).



Rys. 2. **Warunki indukujące formowanie bakterii przetrwałych.** Bakterie przetrwałe mogą powstawać [1] spontanicznie w hodowlach niepoddanych działaniu warunków stresowych [2] w nieoptymalnych warunkach środowiska (np. podczas głodu aminokwasowego, szoku cieplnego, stresu oksydacyjnego), [3] w wyniku działania cząsteczek sygnałowych quorum sensing, [4] w środowisku biofilmu, [5] wewnątrz makrofagów. Na podstawie Maisonneuve & Gerdes, 2014.

Liczne badania wskazują, że w tworzeniu bakterii przetrwałych uczestniczą cząsteczki sygnałowe biorące udział w zjawisku *quorum sensing*. Bakterie wykorzystują produkcję, uwalnianie, wymianę i wykrywanie cząsteczek sygnałowych by kontrolować i koordynować swoje zachowanie w odpowiedzi na czynniki stresowe. Wykazano na przykład, że peptyd CSP (ang. *competence stimulating peptide*) sprzyja tworzeniu bakterii przetrwałych u *Streptococcus mutants* (Leung & Lévesque, 2012). U *Staphylococcus aureus* funkcję tę pełni lakton acylohomoseryny oraz pochodna fenazy - piocyjanina (Möker et al., 2010).

Interakcja gospodarz-patogen również indukuje przejście bakterii w stan uśpienia. Podczas infekcji bakterie są narażone na szereg czynników stresowych o różnym czasie trwania i intensywności, co sprzyja powstawaniu bakterii przetrwałych. Co ciekawe, makrofagi, które stanowią pierwszą linię obrony przed patogenami, są także miejscem tworzenia się bakterii przetrwałych. Podczas infekcji bakteryjnej ulegają różnicowaniu na makrofagi M1 (pośredniczące w aktywacji odpowiedzi immunologicznej, wytwarzające cytokiny prozapalne, reaktywne formy tlenu) oraz M2 (o właściwościach immunosupresyjnych). W skutek infekcji bakteryjnej dochodzi do polaryzacji makrofagów w kierunku M1, co powinno prowadzić do eliminacji patogenów. Wykazano, że bakterie przetrwałe *Pseudomonas aeruginosa* przez pierwsze 1,5 h po zakażeniu indukują powstawanie makrofagów M2 przy jednoczesnym niskim poziomie cytokin prozapalnych. Dodatkowo w tym czasie zaobserwowano zahamowanie internalizacji komórek przetrwałych przez makrofagi w porównaniu z wyjściową populacją (Hastings et al., 2023). Helaine i wsp. (2014) oraz Kaiser i wsp. (2014) wykazali, że internalizacja *Salmonella typhimurium* przez mysie makrofagi pochodzące z komórek szpikowych powoduje 100-1000-

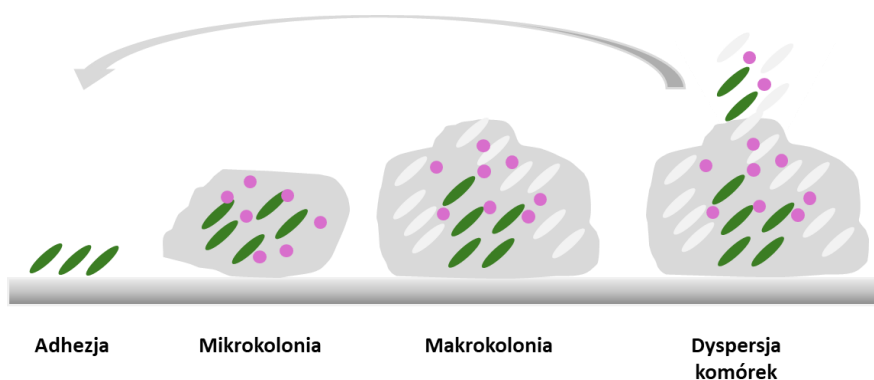
krotny wzrost poziomu bakterii przetrwałych. Analiza mikroskopowa pojedynczych komórek *S. typhimurium* wykazała, że podczas fagocytozy dochodziło do inicjacji replikacji jedynie u części bakterii, nawet w obrębie tego samego makrofagu. Część z komórek pozbawionych możliwości podziału była w stanie przypominającym stan przetrwały, który umożliwił przeżycie bakterii w organizmie gospodarza podczas działania antybiotyku. Warunki panujące w wakuolach makrofagów (niskie pH, uboga zawartość składników odżywczych) oprócz indukcji bakterii przetrwałych stymulowały ekspresję genów wirulencji *S. typhimurium* (Helaine et al., 2014). Wyższy poziom bakterii w stanie uśpienia po interakcji z makrofagami gospodarza zaobserwowano także w przypadku *Mycobacterium tuberculosis* (Manina et al., 2015; Mouton et al., 2016) i *Staphylococcus aureus* (Peyrusson et al., 2020). Wykazano, że makrofagi wytwarzają reaktywne formy tlenu, które powodują szereg uszkodzeń w komórkach *S. aureus* prowadząc do obniżenia poziomu ATP i wejścia w stan uśpienia (Rowe et al., 2020). Inne badania wykazały, że bakterie AIEC *E. coli* (*Adherent Invasive E. coli*) związane z chorobą Leśniowskiego-Crohna, dzielą się lub przechodzą zmianę fenotypową stając się niewrażliwe na antybiotyki. Zmiana ta jest związana z odpowiedzią ścisłą indukowaną w bakteriach wkrótce po wchłonięciu przez makrofagi. W części bakterii wewnątrz makrofagów dochodzi do uszkodzenia DNA i indukcji odpowiedzi SOS. Stres wewnątrz makrofagów prowadzi więc do różnicowania się *E. coli* AIEC i pojawienia się bakterii przetrwałych (Dadole et al., 2024; Demarre et al., 2019). Kolejnym mechanizmem umożliwiającym przetrwanie bakterii wewnątrz makrofagów jest zaburzenie dojrzewania fagosomów, co uniemożliwia fuzje z lizosomami i eliminację patogenów (Cano et al., 2015). Wszystkie opisane powyżej doświadczenia wskazują, że bakterie przetrwałe, które przeżyły antybiotykoterapię w komórkach gospodarza są niewrażliwe na odpowiedź immunologiczną i mogą stanowić źródło nawracających infekcji.

4.2.1. Biofilm bakteryjny

Biofilm to społeczność mikroorganizmów, otoczona macierzą zewnątrzkomórkową złożoną z egzopolimerów (ang. *extracellular polymeric substance* - EPS) wydzielanych przez żyjące wewnątrz komórki (Hall-Stoodley et al., 2004). EPS stanowi 90% biofilmu i składa się z polisacharydów, białek oraz zewnątrzkomórkowego DNA (eDNA) (Cruz et al., 2021). Skład macierzy zewnątrzkomórkowej może się różnić w zależności od gatunku lub szczepu bakterii tworzących biofilm, warunków środowiska, składników odżywczych i etapu wzrostu (Jung et al., 2013).

W procesie tworzenia biofilmu można wyróżnić cztery fazy: adhezję, tworzenie mikrokolonii, formowanie dojrzałej trójwymiarowej struktury oraz dyspersję (Rys. 3). Podczas adhezji bakterie za pomocą struktur takich jak fimbrie i wici oraz oddziaływań hydrofobowych i sił van der Waalsa przyczepiają się do powierzchni abiotycznych lub biotycznych. Następnie poprzez system komunikacji *quorum sensing* zwiększają ekspresję genów odpowiedzialnych za wydzielanie macierzy EPS, która stanowi rusztowanie biofilmu. Dodatkowo polisacharydy bakteryjne zapewniają większą spójność biofilmu. Wewnątrz tworzącej się struktury powstają kanały i szczeliny umożliwiające transport substancji odżywczych, enzymów i cząsteczek sygnałowych. Powstała mikrokolonia jest złożona z małego skupiska komórek bakteryjnych (do ok. 100) i stanowi wczesny etap tworzenia biofilmu. W procesie dojrzewania, mikrokolonia powiększa się tworząc trójwymiarową strukturę dojrzałego biofilmu złożoną z komórek z komórek charakteryzujących się różnym stanem metabolicznym. Ostatnim etapem jest dyspersja, czyli uwalnianie komórek z makrokolonii w celu rozpoczęcia kolejnego cyklu tworzenia biofilmu na nowym podłożu (Monds & O'Toole, 2009).

Jedną z form biofilmu, którą można badać w warunkach laboratoryjnych są makrokolonie, powstające po punktowym naniesieniu płynnej hodowli na podłoże stałe. Wzrost makrokolonii na podłożu stałym odzwierciedla warunki panujące w biofilmie powstałym na materii organicznej (Aguilar et al., 2007; Serra & Hengge, 2014). Podobnie jak w niektórych naturalnych biofilmach, makrokolonie wykazują wysoki stopień zróżnicowania na subpopulacje, a ich trójwymiarowa budowa i aktywność metaboliczna poszczególnych struktur przypominają wyspecjalizowane tkanki organizmu wielokomórkowego. Fimbrie typu *curli* i celuloza są składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej, która nadaje makrokolonii stabilność, elastyczność i spójność (Hufnagel et al., 2015; Serra & Hengge, 2014).

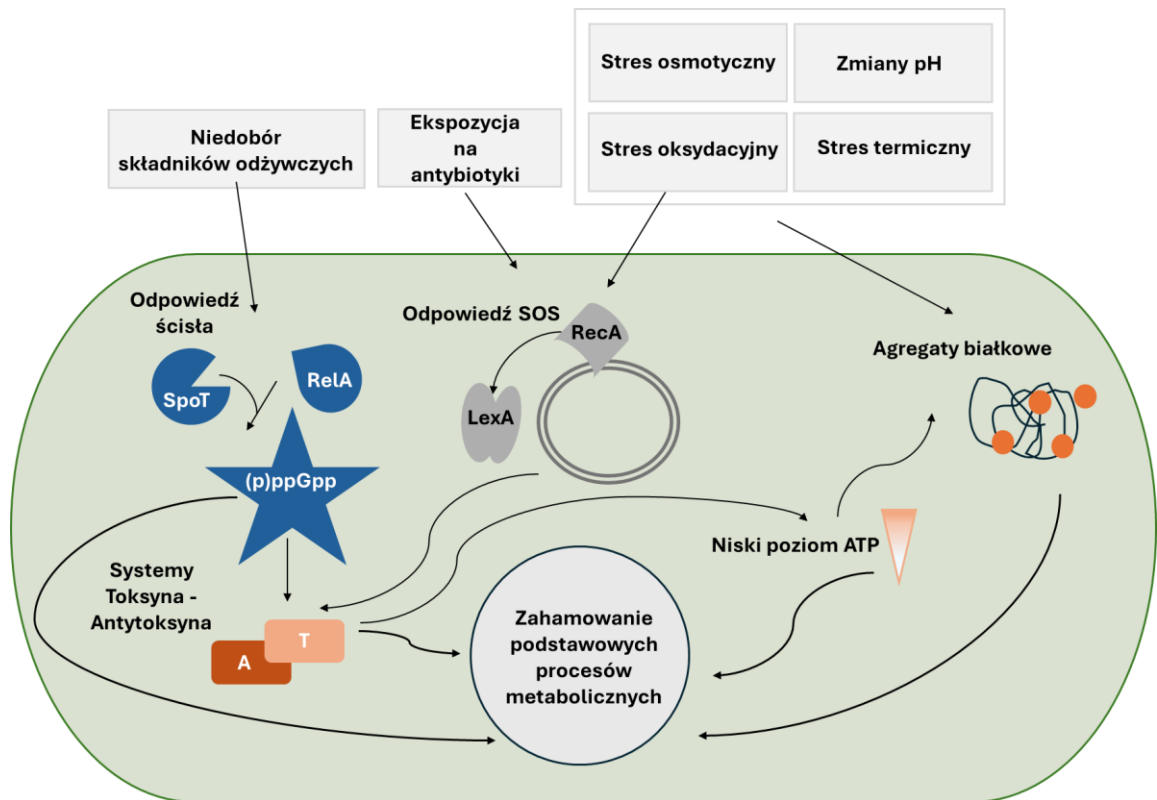


Rys. 3. **Etapy powstawania biofilmu bakteryjnego** Kolorem zielonym oznaczono bakterie przetrwałe, białym – bakterie wrażliwe, różowym – cząsteczki sygnałowe (autoinduktory) *quorum sensing*, szarym – EPS. Na podstawie Lou et al., 2023.

Środowisko biofilmu szczególnie sprzyja powstawaniu bakterii przetrwałych, ze względu na to, że jest ono silnie zróżnicowane. Bakterie żyjące w biofilmie charakteryzują się różnym tempem wzrostu, ekspresją genów, poziomem transkrypcji i translacji. EPS chroni komórki tworzące biofilm, będąc fizyczną barierą utrudniającą wnikanie antybiotyków do wnętrza struktury. Komórki znajdujące się bliżej powierzchni mają ułatwiony dostęp do składników odżywczych i tlenu, natomiast te żyjące wewnątrz mają dostęp ograniczony. Dlatego też komórki położone w głębszych warstwach przechodzą w stan spowolnionego metabolizmu i stają się niewrażliwe na antybiotyki. To dodatkowo zwiększa tolerancję biofilmu na leki (Lewis, 2001; Spoering & Lewis, 2001; Yan & Bassler, 2019). Środowisko biofilmu zapewnia bakteriom 10-1000 razy większą oporność na antybiotyki w porównaniu z komórkami planktonowymi (Singh et al., 2022). Szacuje się, że biofilm odpowiada za 80% infekcji wywołanych przez mikroorganizmy i 65% infekcji szpitalnych (Jamal et al., 2018). Do najczęściej opisywanych w literaturze gatunków bakterii tworzących biofilm należą: *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus viridans*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, oraz *Pseudomonas aeruginosa* (Chen et al., 2013). Ze względu na zwiększoną tolerancję na antybiotyki i obecność bakterii przetrwałych biofilm jest przyczyną wielu przewlekłych infekcji, co sprawia, że jego eliminacja jest niezwykle trudna i wymaga stosowania złożonych i kosztownych metod (Vestby et al., 2020).

4.3. Mechanizmy odpowiedzialne za tworzenie bakterii przetrwałych

W związku z tym, że różne czynniki stresowe stymulują wejście bakterii w stan uśpienia, istnieje wiele szlaków odpowiedzialnych za tworzenie komórek przetrwałych. Można wśród nich wyróżnić: odpowiedź ścisłą, odpowiedź SOS, systemy toksyna-antytoksyna i powstawanie agregatów białkowych (Rys. 4).



Rys. 4. **Molekularne mechanizmy indukujące stan przetrwały.** Szczegółowy opis znajduje się w tekście. Na podstawie Gollan et al., 2019; Huemer et al., 2020.

4.3.1. Odpowiedź ścista

Jednym z mechanizmów umożliwiających adaptację komórki do niedoboru składników odżywczych, takich jak aminokwasy, źródła węgla i azotu, kwasów tłuszczowych, żelaza, jest odpowiedź ścista, której głównym mediatorem są dwa nukleotydy ppGpp (tetrafosforan guanozyny) oraz pppGpp (pentafosforan guanozyny) (Irving & Corrigan, 2018; Ronneau & Hallez, 2019). (p)ppGpp są syntezowane z adenotrifosforanu i guanozynodifosforanu przy udziale enzymów RelA i SpoT (u beta- i gammaproteobakterii) lub homologów RelA-SpoT - rodziny białek RSH (ang. *RelA-SpoT Homologs*) (Atkinson et al., 2011).

Pod wpływem alarmonów odpowiedzi ścistej dochodzi do rearanżacji procesu transkrypcji za pomocą bezpośrednich i pośrednich mechanizmów. (p)ppGpp bezpośrednio oddziałuje z polimerazą RNA, wpływając na jej centrum katalityczne i stabilność utworzonego kompleksu RNAP-promotor (Zuo et al., 2013). Transkrypcja większości genów u *E. coli* prowadzona jest przez polimerazę zawierającą czynniki sigma⁷⁰ (RpoD). W warunkach stresowych, pod wpływem (p)ppGpp dochodzi od oddysocjowania czynnika sigma⁷⁰ i połączenia z alternatywnymi czynnikami sigma, które kodują geny odpowiedzialne za syntezę białek umożliwiających

przetrwane w niekorzystnych warunkach. Akumulacja (p)ppGpp zmniejsza efektywność procesu translacji m.in. poprzez zahamowanie transkrypcji tRNA, rRNA oraz genów odpowiedzialnych za syntezę białek rybosomalnych (Hauryliuk et al., 2015; Kalia et al., 2013). U *E. coli* odpowiedź ścista hamuje replikację DNA m.in. poprzez obniżenie poziomu ekspresji genu *dnaA*, którego białkowy produkt jest niezbędny do inicjacji replikacji (Chiaramello & Zyskind, 1990). Natomiast w przypadku *B. subtilis* (p)ppGpp hamuje proces elongacji replikacji w wyniku działania na prymazę DNA – białko DnaG (Wang et al., 2007.) (p)ppGpp ma także wpływ na syntezę autoinduktorów *quorum sensing* i innych związków, które są istotne dla tworzenia biofilmu (Karczewska et al., 2023; Van Delden et al., 2001; T. Zhang et al., 2020). Warto zaznaczyć, że (p)ppGpp jest obecny na niskim poziomie w komórkach również w optymalnych warunkach hodowli, pełniąc rolę regulatora tempa wzrostu bakterii (Kundra et al., 2020; Potrykus et al., 2011).

Wiele badań wskazuje na związek między odpowiedzią ścisłą a indukcją bakterii przetrwałych. Zespół Korch i wsp. (2003) po raz pierwszy wykazał, że toksyna HipA7 (rozdział 4.3.3.) u *E. coli* zwiększa poziom (p)ppGpp w komórce, a tym samym indukuje powstawanie bakterii przetrwałych. Stwierdzono ponadto, że mutanty delecyjne $\Delta relA$ (Liu et al., 2017; Wu et al., 2015) oraz $\Delta relA\Delta spoT$ (Amato et al., 2013; Fung et al., 2010; Korch et al., 2003; Nguyen et al., 2011), które nie mogą wytwarzać (p)ppGpp, charakteryzują się zmniejszonym poziomem bakterii przetrwałych. Song i Wood (2000) zaproponowali, że mechanizmem, który indukuje bakterie przetrwałe jest zależna od (p)ppGpp inaktywacja i dimeryzacja rybosomów. Alarmon odpowiedzi ścistej indukuje syntezę białka RaiA, które odpowiedzialne jest za inaktywację rybosomów 70S. Następnie czynnik modulujący rybosomy RMF przekształca nieaktywne rybosomy 70S w 90S, które również nie mają aktywności biologicznej. Hpf, czyli czynnik indukujący hibernację przekształca z kolei rybosomy 90S w dimery 100S. Te zmiany struktury rybosomów warunkują wejście bakterii w stan przetrwały. Gdy stres zniknie i komórki mają dostęp do składników odżywczych, może dojść do resuscytacji nieaktywnych rybosomów 100S dzięki białku HflX (czynnikowi resuscytacji rybosomów), którego aktywność w warunkach stresu jest hamowana przez ppGpp.

Istnieją również doniesienia wskazujące, że pojawienie się bakterii przetrwałych nie jest zależne od syntezy i akumulacji (p)ppGpp. Obecność bakterii przetrwałych stwierdzono w mutantach delecyjnych $\Delta relA\Delta spoT$ *E. coli*, niezdolnych do syntezy (p)ppGpp, po inkubacji z ampicyliną lub cyprofloksacyną (Chowdhury et al., 2016). Wykazano również, że za powstawaniem bakterii przetrwałych u *E. coli* (Manuse et al., 2021; Shan et al., 2017) i *S. aureus*

(Conlon et al., 2016) nie jest odpowiedzialny (p)ppGpp, ale spadek poziomu ATP, który powoduje obniżenie aktywności kluczowych procesów bakteryjnych. W rezultacie antybiotyki stają się nieskuteczne ponieważ ich cele komórkowe - transkrypcja, translacja, synteza ściany komórkowej - są nieaktywne.

4.3.2. Odpowiedź SOS

Odpowiedź SOS to system naprawy DNA indukowany pod wpływem rozległych uszkodzeń i akumulacji jednoniciowego DNA (ssDNA) podczas replikacji (Sassanfaq & Roberts, 1990). Stres genotoksyczny powstały pod wpływem np. czynników oksydacyjnych czy ekspozycji na antybiotyki stanowi sygnał alarmowy indukujący uruchomienie odpowiedzi SOS oraz wejście w stan uśpienia (Baharoglu & Mazel, 2014). Można wyróżnić dwa główne regulatory systemu SOS: aktywator RecA oraz represor LexA, który kontroluje ekspresję ponad 50 genów związanych między innymi z naprawą DNA. Dorr i wsp. (2010) wykazali, że inkubacja *E. coli* z ciprofloksacyną (należącą do fluorochinolonów) sprzyja powstaniu bakterii przetrwałych. Mechanizm działania fluorochinolonów polega na uszkodzeniu DNA poprzez hamowanie działania gyrazy i topoizomerazy IV (Drlica et al., 2008), co skutkuje pojawieniem się ssDNA. Następnie białko RecA rozpoznaje ssDNA i indukuje autoproteolizę represora LexA co umożliwia naprawę DNA. Naprawa DNA przez system SOS jest niezbędna, aby komórki przetrwały działanie antybiotyku. Wykazano, że w szczepach *E. coli* pozbawionych białek RecA lub LexA poziom bakterii przetrwałych jest zredukowany (Dörr et al., 2010; Völzing & Brynildsen, 2015). Dorr i wsp. (2010) badając efekty działania ciprofloksacyny zauważyli, że w części komórek podczas odpowiedzi SOS dochodzi do ekspresji genu *tisAB* kodującego toksyczny peptyd TisB, który po wbudowaniu do błony cytoplazmatycznej powoduje spadek siły protonomotorycznej oraz syntezy ATP, prowadząc do stanu przetrwałego. Ekspresja *tisAB* mRNA jest hamowana przez oddziaływanie antysensowne z sRNA – *istR1*. Zależny od odpowiedzi SOS system TisB-IstR1 jest jednym z przykładów układu toksyna-antytoksyna (TA), które są związane z bakteriami przetrwałymi. Inne przykłady systemów TA odpowiedzialnych za powstawanie bakterii przetrwałych zostały opisane w następnym rozdziale.

4.3.3. Systemy toksyna-antytoksyna (TA)

W systemach TA rolę stabilnej toksyny jest hamowanie kluczowych funkcji komórkowych (takich jak translacja i replikacja), natomiast niestabilna antytoksyna chroni komórki przed efektem działania toksyny. Czynniki stresowe mogą wpływać na stopniową aktywację toksyn aby

pozwolić bakteriom na chwilowe zatrzymanie wzrostu, wejście w stan uśpienia, a tym samym przetrwanie niekorzystnych warunków (Hall et al., 2017; Harms et al., 2018). Obecnie wyróżniono osiem głównych typów systemów TA w oparciu o charakter antytoksyny i mechanizm hamowania toksyczności (Jurėnas et al., 2022; G. Singh et al., 2021). Wykazano jednak, że jedynie typ I i II jest powiązany z powstawaniem bakterii przetrwałych (Balaban, 2011; Kint et al., 2012).

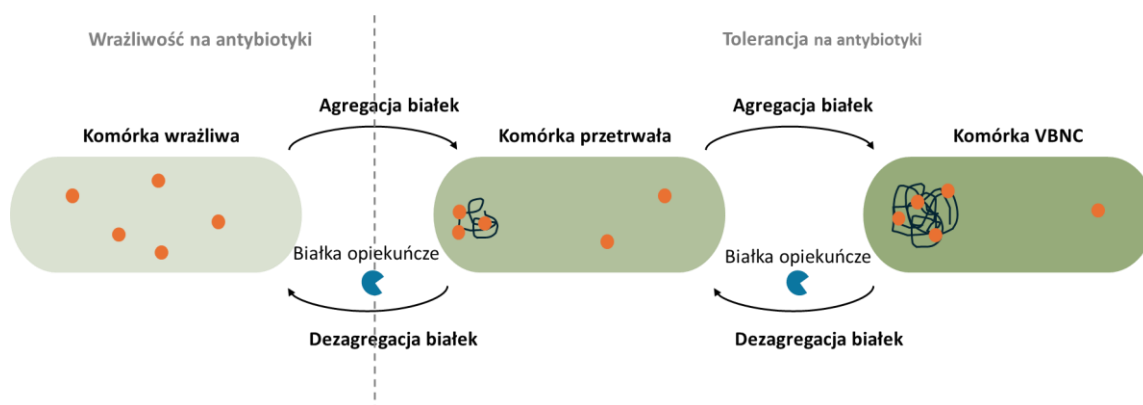
Antytoksyna typu I to antysensowny RNA (np. IstR1), który hamuje biosyntezę toksyny na etapie translacji. Antytoksyna typu II jest białkiem, które poprzez bezpośrednią interakcję z toksyną neutralizuje jej szkodliwe działanie (Jurėnas et al., 2022). HipA/HipB to pierwszy system TA, który powiązano z bakteriami przetrwałymi (Moyed & Bertrand, 1983; Schumacher et al., 2009). HipA jest toksyną typu II, która fosforyluje syntetazę glutamyl-tRNA (GltX) w miejscu wiązania ATP. Skutkiem tego jest akumulacja wolnych tRNA^{Glu}, a następnie aktywacja odpowiedzi ścisłej poprzez wzrost poziomu (p)ppGpp (Harms et al., 2016). Stwierdzono, że szczep *E. coli hipA7* z mutacjami w genie *hipA* (ich wynikiem są substytucje aminokwasów G22S i D291A) charakteryzuje się zwiększonym poziomem bakterii przetrwałych (Korch et al., 2003; Moyed & Bertrand, 1983; Schumacher et al., 2015). W porównaniu z HipA białko HipA7 wykazuje mniejszą toksyczność, ale nie oddziałuje z antytoksyną HipB (Semanjski et al., 2018). Stwierdzono, że w szczepie delecyjnym *E. coli ΔhipA7* poziom bakterii przetrwałych jest ponad 1000 razy niższy niż w szczepie typu dzikiego. Ponadto wykazano, że uropatogenne izolaty *E. coli* często zawierają kilka mutacji w genie *hipA*, co prawdopodobnie sprzyja ich przetrwaniu podczas antybiotykoterapii (Schumacher et al., 2015). Znaczącą rolę w tworzeniu bakterii przetrwałych przypisuje się białkom ObgE i HokB, które należą do systemu TA typu I. Wejście w stan przetrwały poprzez aktywację ObgE wymaga uruchomienia odpowiedzi ścisłej i akumulacji (p)ppGpp w warunkach głodu. Wzrost poziomu ObgE indukuje produkcję toksyny HokB, co prowadzi do utraty potencjału błonowego i wejście w stan uśpienia (Verstraeten et al., 2015).

4.3.4. Agregacja i glikacja białek

W komórce konieczne jest utrzymanie proteostazy, czyli równowagi między syntezą, prawidłowym zwijaniem polipeptydów i usuwaniem niefunkcyjnych białek. Zaburzenia tej równowagi powoduje powstawanie agregatów białkowych głównie z powodu oddziaływań między hydrofobowymi fragmentami nieprawidłowo zwiniętych łańcuchów polipeptydowych (Chaturvedi et al., 2016). Istnieje wiele czynników destabilizujących struktury białek: stres oksydacyjny (Dahl et al., 2015), wysoka temperatura (Litvinovich et al., 1998), zmiany pH (Guijarro et al., 1998) czy stres osmotyczny (Schramm et al., 2019). Wiele badań wskazuje, że

agregacja wewnątrzkomórkowych białek na skutek niskiego poziomu ATP w komórce jest jednym z czynników indukujących stan przetrwały (Bollen et al., 2021; Gollan et al., 2019; Goode et al., 2021; Leszczynska et al., 2013; Pu et al., 2019). Agregaty zawierają białka zaangażowane w kluczowe procesy tj. translację, syntezę aminokwasów, cykl kwasu cytrynowego i odpowiedź komórki na stres (Kwiatkowska et al., 2008), a ich inaktywacja prowadzi może do spowolnienia metabolizmu i wejścia w stan uśpienia (Rys. 5). Wcześniejsze wyniki naszego zespołu wykazały, że głównym składnikiem agregatów białkowych u *E. coli* jest czynnik elongacyjny EF-Tu. Inaktywacja i agregacja EF-Tu prowadzi może do zahamowania translacji (Leszczynska et al., 2013). Stwierdzono, że w hodowlach stacjonarnych *E. coli* związki osmotycznie czynne (trehaloza, betaina, glukoza i glicerol) lub 40 mM MOPS (pH 7,4) hamują agregację białek, tym samym obniżając poziom bakterii przetrwałych. Natomiast czynniki indukujące agregację (octan sodu lub wysokie stężenia osmolitów) powodują wzrost poziomu bakterii przetrwałych (Leszczynska et al., 2013). Wiadomo także, że osmolity jako chemiczne chaperony (ang. *chemical chaperones*) mogą działać podobnie do białek opiekuńczych (ang. *molecular chaperones*) zwiększając stabilność polipeptydów i biorąc udział w ich fałdowaniu (Diamant et al., 2001).

Białka opiekuńcze należą do grupy białek szoku termicznego (ang. *heat shock proteins*, Hsps) i są częścią systemu kontroli jakości białek odpowiedzialnego za utrzymanie proteostazy. Do Hsps można oprócz białek opiekuńczych zaliczyć również proteazy szoku cieplnego, które usuwają nieodwracalnie uszkodzone białka. Warunki stresowe indukują wzrost ekspresji genów *hsp*s, których białkowe produkty biorą udział w refałdowaniu polipeptydów i są kluczowe w procesie dezagregacji i degradacji. System bichaperonowy złożony z białka ClpB (Hsp100) oraz DnaK (współpracującego z DnaJ i GrpE) jest odpowiedzialny za dezagregację i uwalnianie polipeptydów z agregatów białkowych u bakterii. DnaJ rozpoznaje hydrofobowe fragmenty polipeptydów i kieruje je do DnaK (Hsp70), które jest niezbędne do translokacji substratu białkowego przez kanał ClpB, tym samym rozpoczynając proces ekstrakcji polipeptydów z agregatów. Uzyskanie natywnej konformacji przez uwolnione polipeptydy jest możliwe dzięki współpracy systemów DnaK/DnaJ/GrpE i GroES/GroEL (Weibezahn et al., 2004). Oba te systemy działają w sposób zależny od ATP. Badania Zhou i wsp. (2023) wykazały, że białka DnaK oraz ClpB są niezbędne w procesie usuwania agregatów podczas resuscytacji, tzn. przed wznowieniem podziałów bakterii przetrwałych dochodzi do usuwania agregatów białkowych, natomiast w komórkach VBNC agregaty utrzymują się dłużej. Zatem czas potrzebny do usunięcia agregatów determinuje „obudzenie” komórki i możliwość jej dalszego wzrostu (Pu et al., 2019). Wyniki te wskazują na kluczową rolę agregatów białkowych w tworzeniu oraz resuscytacji bakterii przetrwałych.



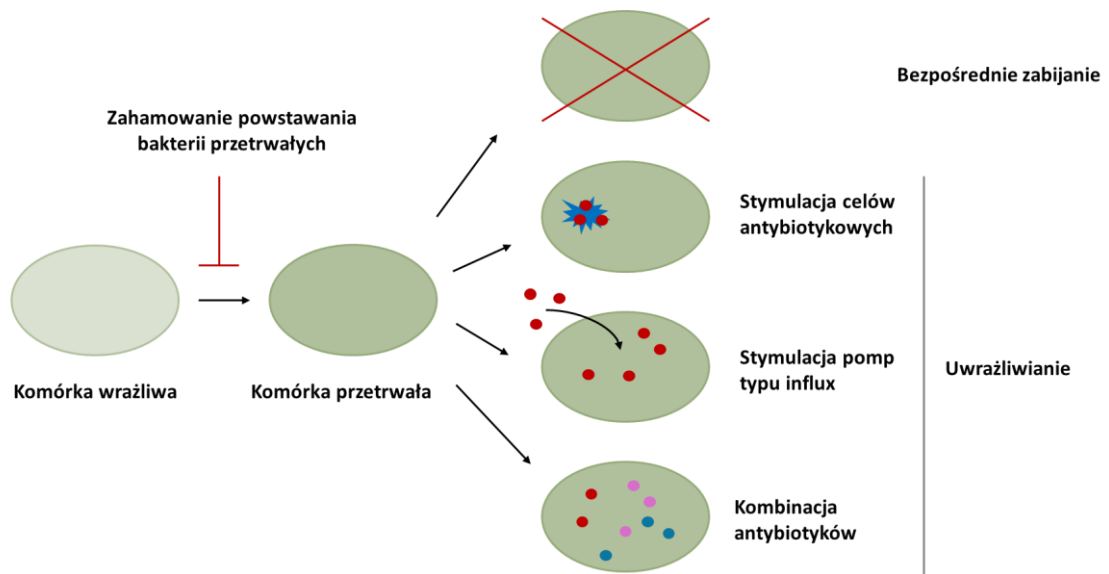
Rys. 5. **Model przedstawiający rolę wewnątrzkomórkowej agregacji białek w trakcie powstawania i resuscytacji bakterii przetrwałych i VBNC.** Bakterie przetrwałe zawierają wczesne stadium agregatów, podczas gdy komórki głęboko uśpione (VBNC) charakteryzują się bardziej stabilnymi agregatami białkowymi. Usunięcie agregatów białkowych przy udziale białek opiekuńczych umożliwia komórkom wybudzenie ze stanu przetrwałego. Na podstawie Bollen et al., 2021.

Wiele badań *in vitro* wskazuje, że powstawanie agregatów białkowych może być indukowane przez glikację (Iannuzzi et al., 2014). Glikację białek (nieenzymatyczną glikozylację) badano do tej pory głównie w organizmach eukariotycznych łącząc powstawanie produktów glikacji z procesem starzenia się organizmów i różnymi stanami chorobowymi, np. cukrzycą. Obecnie wiadomo, że glikacja zachodzi również w komórkach bakteryjnych, mimo tego, że ich czas życia jest krótki (Boteva & Mironova, 2019). Jednym z głównych czynników, który odpowiada za glikację jest metyloglioksal (MGO) (Lee & Park, 2017). MGO powstaje z fosfodihydroksyacetonu będącego jednym z pośrednich produktów glikozy, przy udziale syntazy MGO (ang. *methylglyoxal synthase A*, MgsA) (Subedi et al., 2008). Dodatkowo, podczas działania różnych czynników stresowych (utrata wody, stres termiczny, późna faza stacjonarna) wzrasta poziom reaktywnych form tlenu, zachodzi peroksydacja lipidów, co z kolei sprzyja nadprodukcji MGO. Ze względu na posiadanie dwóch reaktywnych grup karbonylowych, MGO określany jest mianem reaktywnej formy elektrofilowej (ang. *reactive electrophilic species*, RES). Dzięki wysokiej reaktywności MGO oddziałuje z kwasami nukleinowymi oraz aminokwasami znajdującymi się na N-końcu łańcucha polipeptydowego lub aminokwasami posiadającymi grupę aminową w łańcuchu bocznym (lizyna, arginina, histydyna). MGO zaangażowany jest w początkowy etap glikacji (reakcję Maillarda), w wyniku którego powstają zasady Shiffa, przekształcane następnie w bardziej stabilne produkty Amadori, dające początek zaawansowanym produktom glikacji (ang. *Advanced Glycation End Products*, AGEs) (Boteva & Mironova, 2019). Podobne reakcje mogą zachodzić z udziałem aldehydowych form monosacharydów, glukozy i fruktozy. AGEs to bardzo zróżnicowana grupa związków, łatwo ulegających agregacji z powodu licznych wiązań wewnątrz- i międzycząsteczkowych. Bakterie posiadają szereg enzymów, które usuwają MGO (system

glioksyazy I/II, reduktaza MGO) wczesne produkty glikacji (Hsp31, YhbO, YalL, ElbB) lub nawet AGEs (metaloproteazy) (Cohen-Or et al., 2013; Richarme et al., 2018). Wpływ glikacji na agregację białek w komórkach bakteryjnych nie został do tej pory zbadany.

4.4. Metody zwalczania bakterii przetrwałych

Opracowując metody eliminacji bakterii przetrwałych można wykorzystać trzy strategie 1) zahamowanie tworzenia bakterii przetrwałych, 2) zabicie bakterii przetrwałych lub 3) ich resuscytacja i tym samym uwrażliwienie na działanie antybiotyków (Rys. 6).



Rys. 6. **Główne strategie eliminacji bakterii przetrwałych.** Opis w tekście poniżej. Na podstawie Defraigne et al., 2018.

Hamowanie powstawania bakterii przetrwałych jest możliwe poprzez zakłócenie mechanizmów warunkujących wejście komórek w stan metabolicznie nieaktywny. Liczne badania wykazują, że zastosowanie inhibitorów *quorum sensing* (Allegretta et al., 2017; Starkey et al., 2014; Vieira et al., 2022), odpowiedzi ścistej (Wexselblatt et al., 2012), odpowiedzi SOS (Lu & Collins, 2009) lub czynników hamujących powstawanie biofilmu (J. S. Lin et al., 2022) jest skuteczne w ograniczeniu żywotności bakterii, w tym komórek przetrwałych, w warunkach laboratoryjnych. Jednak ze względu na wiele ścieżek indukujących stan uśpienia oraz fakt, że bakterie przetrwałe mogą pojawiać się spontanicznie, podejście to nie zawsze jest wystarczające w ich eliminacji.

Drugą strategią pozwalającą na eliminację bakterii przetrwałych jest ich resuscytacja. Celem antybiotyków są aktywne procesy komórkowe, dlatego resuscytacja może sprawić że bakterie staną się wrażliwe na leki. Wykazano na przykład, że cząsteczka C10 (pochodna

metoksyfenylopiperyzy) oraz kwas kaprynowy są odpowiedzialne za aktywację metabolizmu u *E. coli* i *P. aeruginosa*, co w konsekwencji zwiększa wrażliwość komórek na antybiotyki (Kim et al., 2011; Marques et al., 2014). Stwierdzono ponadto, że cukry proste np. fruktoza, glukoza i mannitol, uwrażliwiają komórki na aminoglikozydy, zmniejszając tym samym poziom bakterii przetrwałych u *E. coli* i *S. aureus* (Allison et al., 2011). Antybiotyki przedostają się do wnętrza komórki bakteryjnej głównie przez poryny, które zlokalizowane są w błonie zewnętrznej. Jednak niektóre z nich wymagają aktywnego transportu, co sprawia, że nie działają one na bakterie w stanie przetrwałym (Saxena et al., 2023). Istnieje co najmniej kilka przykładów doświadczeń, w których indukowano aktywny transport antybiotyków do komórki poprzez wzbudzenie siły protonomotorycznej, zmiany pH lub hamowanie syntezy aminokwasów, co powodowało wzrost poziomu energii niezbędnej do transportu antybiotyków do komórki (Wainwright et al., 2021). Modyfikacja przepuszczalności błony komórkowej lub jej uszkodzenie, np. jonami srebra, także umożliwia przenikanie antybiotyków (Barras et al., 2018). Liczne badania wykazują, że skuteczne w eliminacji bakterii przetrwałych w przypadku niektórych szczepów jest stosowanie kombinacji różnych klas antybiotyków (Baek et al., 2020; Kamble et al., 2022; Kaur et al., 2024; Seo et al., 2024; Zheng et al., 2020). Zastosowanie antybiotykoterapii skojarzonej pozwala na skrócenie czasu leczenia, zastosowanie niższego stężenia pojedynczych leków oraz zmniejszenie prawdopodobieństwa rozwoju oporności (Gill et al., 2015; Hu & Coates, 2012).

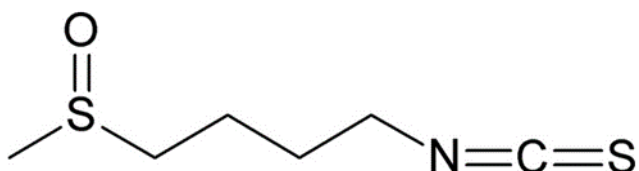
Trzecim sposobem na eliminację bakterii przetrwałych jest bezpośrednie działanie na komórki w stanie uśpienia. Stosowane związki są ukierunkowane na alternatywne cele komórkowe, niezwiązane z aktywnością metaboliczną. Ich działanie polega na uszkodzaniu i depolaryzacji błony komórkowej, niszczeniu ściany komórkowej, sieciowaniu DNA oraz wytwarzaniu reaktywnych form tlenu (Defraigne et al., 2018).

W związku z nasilającą się antybioopornością aktualną strategią jest przeglądanie bibliotek chemicznych w poszukiwaniu nowych cząsteczek, niebędących antybiotykami, o właściwościach „*anti-persister*”. W związku z zapotrzebowaniem na nowe i skuteczne związki antybakteryjne, jako alternatywa dla antybiotyków, w swoich badaniach skupiłam się na określeniu wpływu dwóch związków o właściwościach bakteriobójczych, sulforafanie (rozdział 4.4.1.) i eutektyku *Reline* (rozdział 4.4.2.), na komórki przetrwałe.

4.4.1. Sulforafan

Przykładem dobrze poznanej grupy związków o charakterze przeciwbakteryjnym są izotiocyjaniiny (Nowicki et al., 2016), jednak ich wpływ na bakterie przetrwałe był dotąd słabo poznany. Izotiocyjaniiny (ITC) powstają w wyniku hydrolizy enzymatycznej glukozynolanów, metabolitów wtórnych występujących w roślinach krzyżowych. ITC wykazują właściwości bakteriobójcze względem bakterii Gram dodatnich i Gram ujemnych poprzez wykorzystanie wielu mechanizmów: uszkodzenie błony komórkowej i zmianę metabolizmu indukującą odpowiedź ścisłą oraz hamowanie *quorum sensing* (Aires et al., 2009; Ganin et al., 2013; Nowicki et al., 2014, 2019; J. Patel et al., 2020; Romeo et al., 2018). Wykazano, że ITC nie działają toksycznie na eukariotyczne linie komórkowe (Krause et al., 2021).

Sulforafan (SFN) (Rys. 7) jest jednym z najlepiej opisanych związków, pod względem klinicznym, należących do tej grupy (Houghton, 2019; Ruhee & Suzuki, 2020). SFN hamuje wzrost wielu gatunków bakterii chorobotwórczych zarówno Gram dodatnich (*S. aureus*, *E. faecalis*, *S. saprophyticus*) jak i Gram ujemnych (*E. coli*, *H. pylori*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*) (Aires et al., 2009; Haristoy et al., 2003). Krause i wsp. (2021) wykazali, że sulforafan w stężeniu 1×MIC skutecznie hamuje powstawanie, a także zmniejsza poziom istniejącego już biofilmu *V. cholerae*. Co więcej, związek ten obniża wirulencję *V. cholerae* podczas infekcji *Galleria mellonella*. Po 48 i 72 h po zakażeniu przeżywalność zainfekowanej *G. mellonella* wzrosła odpowiednio o 60 i 30%.

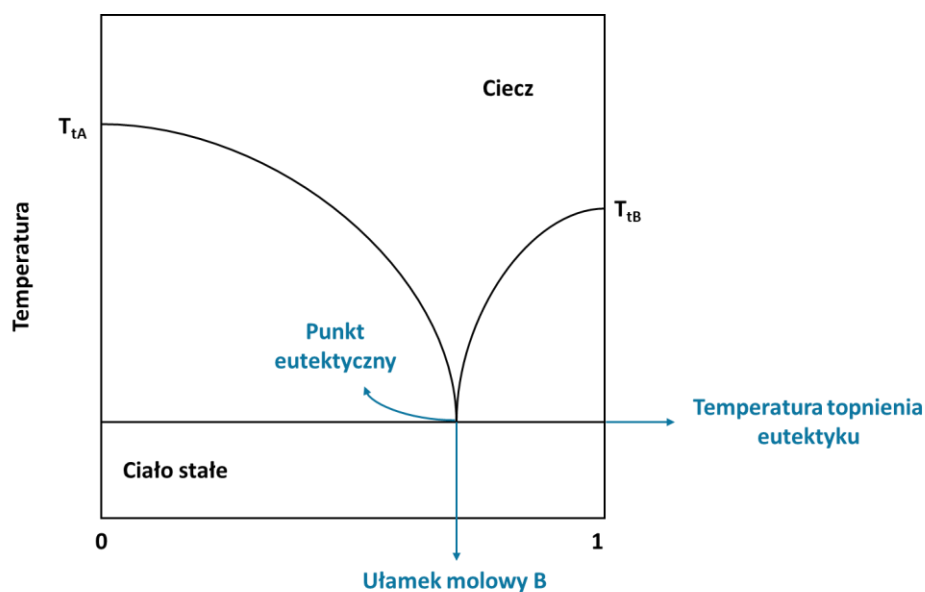


Rys. 7. **Wzór chemiczny sulforafanu**

SFN może indukować odpowiedź ścisłą oraz wpływać na inne procesy komórkowe w sposób niezależny od (p)ppGpp. Badania Nowickiego i wsp. (2019) wskazują, że SFN indukuje syntezę (p)ppGpp i powoduje zahamowanie wzrostu przynajmniej kilku gatunków bakterii (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. faecalis*). Z kolei zahamowanie wzrostu *B. subtilis* i *E. faecalis* przez SFN nie jest zależne od poziomu (p)ppGpp w komórce. W przypadku *P. aeruginosa* SFN hamuje sygnały *quorum sensing*, tym samym ograniczając powstawanie biofilmu (Ganin et al., 2013). SFN indukując odpowiedź ścisłą może sprzyjać pojawianiu się bakterii przetrwałych. Z drugiej strony ponieważ SFN powoduje uszkodzenie błony cytoplazmatycznej (Nowicki et al., 2019), nie jest wykluczone, że może działać bakteriobójczo na komórki przetrwałe.

4.4.2. Reline

Eutektyki to związki powstałe poprzez zmieszanie dwóch lub więcej składników, co skutkuje obniżeniem temperatury topnienia (T_t) powstałej mieszaniny (określonej jako punkt eutektyczny) w porównaniu z temperaturami topnienia wyjściowych substancji (Rys. 8). Ciecze eutektyczne otrzymuje się przez zmieszanie związków będących akceptorem i donorem wiązań wodorowych (Singh et al., 2021; Svigelj et al., 2021). Standardowymi substancjami wyjściowymi są: aminokwasy, cukry, alkohole, kwasy karboksylowe oraz mocznik i jego pochodne. Eutektyki można otrzymać różnymi metodami poprzez m.in. ogrzewanie, liofilizację, sonikację lub rozdrabnianie (mielenie) (Ferreira & Sarraguça, 2024).



Rys. 8. **Wykres fazowy mieszaniny związków A i B.** Po zmieszaniu dwóch związków A i B, ich temperatury topnienia zmniejszają się (T_{tA} i T_{tB}), do osiągnięcia temperatury minimalnej (punkt eutektyczny). Punkt eutektyczny jest wypadkową przecięcia się krzywych topnienia dwóch składników mieszaniny. Na podstawie Ferreira & Sarraguça, 2024.

Ciecze eutektyczne są głównie stosowane jako rozpuszczalniki (przykład „zielonej chemii”) (Alonso et al., 2016; Perna et al., 2020), a także w medycynie jako związki stabilizujące i wzmacniające działania antybiotyków (Olivares et al., 2018) lub transportujące leki (Park & Prausnitz, 2015; Zakrewsky et al., 2016). Wykazują również działanie przeciwdrobnoustrojowe wobec bakterii Gram dodatnich i Gram ujemnym, grzybów i wirusów (Akbar et al., 2023; Zakrewsky et al., 2016). Nava-Ocampo i wsp. (2021) wykazali, że naturalne rozpuszczalniki głęboko eutektyczne (NDES, ang. *Natural Deep Eutectic Solvents*) mogą mieć zastosowanie w zwalczaniu biofilmu. W tym celu testowano dwa NDES: pierwszy złożony z betainy, mocznika i wody oraz drugi będący mieszaniną kwasu mlekowego, glukozy i wody. Oba zmniejszyły poziom

EPS do 70% początkowej zawartości. Rozpuszczanie macierzy zewnątrzkomórkowej osłabia strukturę biofilmu, co może ułatwić jego dalszą eliminację. W badaniu Nystedta i wsp. (2023) wykorzystano trzy inne ciecz eutektyczne (złożone z chlorku choliny i ksylitolu, chlorku choliny i gliceryny oraz betainy i sacharozy) skierowane przeciwko biofilmom *S. aureus* oraz *P. aeruginosa*. Każdy z testowanych związków zmniejszył poziom biomasy biofilmu w zakresie 27-67%. Co ciekawe chlorek choliny i ksylitol oraz chlorek choliny i glicerol, w stężeniach 0,25 – 0,5×MIC, hamowały powstawanie biofilmu w obu testowanych szczepach. Mieszanina kwasów: kaprynowego i laurynowego stanowi kolejną ciecz głęboko eutektyczną mającą udokumentowany wpływ na usuwanie biofilmu bakteryjnego (Silva et al., 2019). Ten eutektyk w stężeniu 1×MIC zmniejszał poziom biofilmu *S. aureus*, *E. coli* i *C. albicans* o 90% już po 30 minutach inkubacji. Innym przykładem cieczy eutektycznej jest *Reline*, mieszanina złożona z chlorku choliny ($T_f=302^{\circ}\text{C}$) oraz mocznika ($T_f=133^{\circ}\text{C}$) w stosunku molowym 1:2, o temperaturze topnienia wynoszącej 12°C (Abbott et al., 2003). To biodegradowalny, nietoksyczny związek dzięki czemu możliwe jest jego szerokie zastosowanie (Kumari et al., 2018). Mechanizm działania *Reline* na komórki bakteryjne nie jest dokładnie poznany i wymaga dalszych badań. W dostępnej literaturze brakuje również informacji o wpływie mieszanin eutektycznych na bakterie przetrwałe.

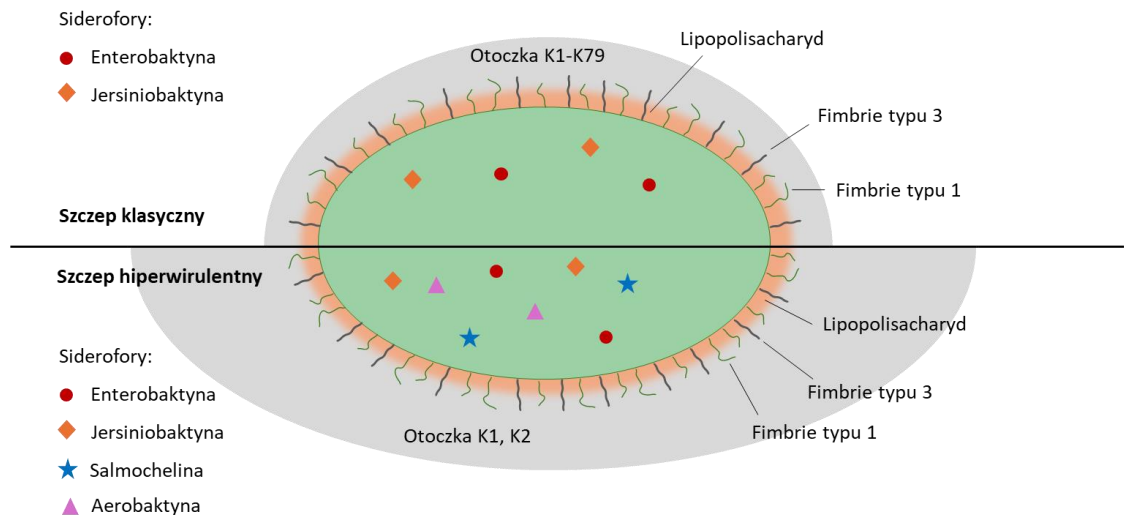
4.5. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae pierwszy raz została zidentyfikowana i opisana w 1882 roku przez niemieckiego badacza Carla Friedländera. To Gram ujemna, nieposiadająca zdolności do ruchu bakteria otoczkowa będąca przedstawicielem rodziny *Enterobacteriaceae*. W środowisku jest obecna w wodach powierzchniowych i glebie oraz występuje na powierzchni urządzeń medycznych. U człowieka *K. pneumoniae* kolonizuje błony śluzowe jamy ustnej i przewodu pokarmowego. Z tych miejsc może migrować do wnętrza tkanek i wywoływać poważne infekcje (Holt et al., 2015; Paczosa & Meccas, 2016). Wśród szczepów *K. pneumoniae* wyróżniamy dwa główne typy: klasyczny (cKp) i hiperwirulentny (hvKp). U osób z obniżoną odpornością bakterie należące do typu klasycznego są przyczyną występowania zapalenia płuc, infekcji dróg oddechowych i bakteriemii. cKp dzięki wytwarzaniu penicyliny kodowanej przez gen chromosomalny (SHV-1) wykazuje naturalną oporność na ampicylinę, karbenicylinę i tikarcylinę. Nadużywanie i niewłaściwe stosowanie antybiotyków spowodowało że izolaty kliniczne coraz częściej wykazują oporność na standardowo stosowane antybiotyki. Problem ten dotyczy również *K. pneumoniae*. Aktualnie pojawia się coraz więcej wielolekoopornych (ang. *multi drug-*

resistant, MDR), szczepów cKp zdolnych do syntezy β -laktamaz o rozszerzonym spektrum aktywności (ang. *extremely extended spectrum β -lactamase*, ESBL) oraz karbapenemaz. Znane są również przypadki izolatów klinicznych *K. pneumoniae* o rozszerzonej (ang. *extensively drug resistance*, XDR) i całkowitej (ang. *pandrug-resistance*, PAN) oporności (Elemam et al., 2009; Navon-Venezia et al., 2017; Xu et al., 2020; Zowawi et al., 2015). W 2017 roku WHO opublikowało listę opornych na antybiotyki patogenów, które stanowią największe zagrożenie dla zdrowia publicznego i które powinny stać się szczególnym obiektem badań w celu opracowania nowych skutecznych antybiotykoterapii. Grupą o najwyższym priorytecie są bakterie ESKAPE, które potrafią „uciec” przed działaniem antybiotyków i są przyczyną większości zakażeń szpitalnych. Oprócz *Klebsiella pneumoniae* do ESKAPE należą: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* oraz *Enterobacter species* (World Health Organization, 2017; Mulani et al., 2019). Według Global Burden of Disease oporność na antybiotyki jest związana z prawie 5 milionami zgonów rocznie i śmiercią 1,27 miliona ludzi spowodowaną bakteriami opornymi (Murray et al., 2022). Z kolei O’Neill (2016) szacuje, że zakażenia wywołane przez szczepy bakteryjne są przyczyną śmierci 700 000 ludzi rocznie, a do 2050 roku liczba ta wzrośnie do 10 milionów, co podkreśla pilną potrzebę opracowania nowych, skutecznych rozwiązań eliminacji wielolekoopornych bakterii.

W ciągu ostatnich dziesięcioleci coraz częściej izolowane są szczepy *K pneumoniae* hvKp, które charakteryzują się większą zjadliwością i śmiertelnością (Choby et al., 2020). Jest to spowodowane obecnością plazmidu o wielkości 200-220 pb zawierającego geny odpowiedzialne za produkcję sideroforów i otoczki (Patel et al., 2014). W przeciwieństwie do cKp typ hvKp może infekować osoby zdrowe oraz z obniżoną odpornością i wywoływać choroby takie jak: zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, zapalenie tkanki łącznej czy ropień wątroby (Paczosa & Meccas, 2016).

U *K. pneumoniae* można wyróżnić cztery główne czynniki wirulencji ułatwiające wywoływanie i rozwój infekcji u gospodarza, są to: otoczka, lipopolisacharyd, siderofory oraz fimbrie (Rys. 9) (Paczosa & Meccas, 2016). Izolaty *K. pneumoniae* mogą różnić się między sobą stopniem zjadliwości ze względu na zmiany ekspresji genów kodujących czynniki wirulencji.



Rys. 9. Czynniki wirulencji w szczepie klasycznym i hiperwirulentnym *Klebsiella pneumoniae*. Na podstawie Paczosa & Mecsas, 2016.

Otoczka jest kluczowym czynnikiem wirulencji u *K. pneumoniae*. Jest zbudowana z polisacharydów (antygenów otoczkowych K), w skład których wchodzi kwas uronowy, mannoza, ramnoza, galaktoza, pirogromian i fukoza (Ramos Pereira et al., 2012; Sahly et al., 2008). U *K. pneumoniae* obecnie wyróżniamy 79 serotypów (od K1 do K79). 70% szczepów hvKp wytwarza hiperotoczkę złożoną z serotypów K1 i K2, która jest trwalsza od typowej otoczki obecnej w szczepach cKp, co przyczynia się do zwiększonej zjadliwości (Marr & Russo, 2019; Pan et al., 2015). Fenotyp hiper mukoidalny może wystąpić niezależnie od nadprodukcji otoczki (Walker et al., 2019). Pozostałe serotypy występują u szczepów cKp. Za syntezę otoczki odpowiada grupa sześciu genów na końcu 5' operonu *cps* (*galF*, *cpsACP*, *wzi*, *wza*, *wzb*, *wzc*) oraz znajdujący się na końcu 3' gen *ugd* (Shu et al., 2009; Wyres et al., 2016). Różnorodność serotypów jest wynikiem działania różnych glikotransferaz, których geny: *wbaP*, *wbaZ*, *wcaN*, *wcaI* i *wcaO*, są umiejscowione w środkowej części operonu *cps* (Rahn et al., 1999; Shu et al., 2009). Otoczka chroni *K. pneumoniae* przed odpowiedzią immunologiczną gospodarza na wiele sposobów: zapobiega fagocytozie i opsonofagocytozie przez komórki układu odpornościowego (March et al., 2013), hamuje aktywność białek przeciwdrobnoustrojowych (Moranta et al., 2010) oraz obniża poziom cytokin prozapalnych (TNF α , IL-6) (Yoshida et al., 2000).

Kolejnym istotnym czynnikiem wirulencji jest lipopolisacharyd (LPS), który jest składnikiem zewnętrznej błony bakterii Gram ujemnych. LPS składa się z trzech odrębnych fragmentów: zakotwiczonego w błonie zewnętrznej lipidu A, polisacharydowego rdzenia oraz antygeny O (również polisacharydu). U *K. pneumoniae* można wyróżnić 9 serotypów antygeny O, najczęściej występującym jest O1. LPS *K. pneumoniae* może pełnić dwie przeciwstawne role: ochronną przed

odpowiedzią immunologiczną gospodarza oraz stymulującą silną odpowiedź zapalną. Lipid A jest rozpoznawany przez TLR4 (ang. *Toll-like receptor 4*), co aktywuje makrofagi do produkcji cytokin i chemokin (Yamamoto & Akira, 2009), co prowadzi do eliminacji bakterii z organizmu gospodarza. Komórki *K. pneumoniae* mogą modyfikować lipid A lub wykorzystać otoczkę aby maskować LPS czyniąc go mniej rozpoznawalnym dla komórek odpornościowych (Llobet et al., 2015; Merino, et al., 1992). Co więcej, zmodyfikowany lipid A chroni *K. pneumoniae* przed działaniem kationowych peptydów przeciwdrobnoustrojowych (Clements et al., 2007; Llobet et al., 2015). Ważną rolę w wirulencji pełni także antygen O, który hamuje aktywację szlaku dopełniacza zapobiegając lizie komórek bakteryjnych (Alberti et al., 1996; Merino et al., 1992).

Fimbrie ułatwiają przyleganie do powierzchni biotycznych i abiotycznych oraz biorą udział w formowaniu biofilmu. U *K. pneumoniae* głównymi strukturami adhezyjnymi są fimbrie typu 1 i 3. Fimbrie typu 1 są szeroko rozpowszechnione wśród przedstawicieli rodziny *Enterobacteriaceae* i występują u 90% szczepów *K. pneumoniae* (Klemm & Schembri, 2000; Paczosa & Meccas, 2016). Wykazują powinowactwo do struktur zawierających reszty mannozy, przez co pośredniczą w przyleganiu do komórek nabłonkowych układu moczowo-płciowego oraz są odpowiedzialne za zakażenia pęcherza moczowego (Kline et al., 2009). Są to cienkie, nitkowate struktury złożone z dwóch podjednostek białkowych: FimA i FimH. Białko FimA posiada właściwości adhezyjne i jest odpowiedzialne za tworzenie biofilmu. Natomiast podjednostka FimH może wywierać negatywny wpływ na wirulencję *K. pneumoniae* poprzez wiązanie z komórkami tucznymi, co aktywuje odpowiedź immunologiczną gospodarza i uwalnianie cytokin (Malaviya et al., 1996). Fimbrie typu 3 to podobne do helis struktury adhezyjne na powierzchni błony *K. pneumoniae*. W przeciwieństwie do fimbrii typu 1, aglutynacja wywołwana przez fimbrie typu 3 nie jest hamowana przez mannozę. U *K. pneumoniae* typ 3 fimbrii jest niezbędny do tworzenia biofilmu (Allen et al., 1991). Pojedyncze włókno fimbrii typu 3 składa się z białka MrkA wiążącego się do powierzchni abiotycznych, oraz zewnętrznie położonej podjednostki MrkD umożliwiającej powstawanie biofilmu na powierzchniach biotycznych i abiotycznych (Jagnow & Clegg, 2003; Martino et al., 2003; Vuotto et al., 2017).

Aby bakterie patogenne mogły rozwijać się w organizmie gospodarza muszą pobierać jony żelaza ze środowiska. Metal ten w stanie wolnym nie jest łatwo dostępny, a większa jego część związana jest z hemem lub białkami transportującymi np. transferyną lub laktoferyną (Cornelissen, 2003; Finkelstein et al., 1983). Z tego powodu bakterie wykształciły mechanizmy umożliwiające pozyskanie żelaza od gospodarza aby przetrwać i dzielić się podczas infekcji. Jednym z nich jest wytwarzanie sideroforów, czyli cząsteczek chelatujących jony żelaza i mających

wyższe powinowactwo do tego pierwiastka niż białka gospodarza (Holden & Bachman, 2015). Działanie sideroforów polega na uwalnianiu żelaza z kompleksów białkowych żywiciela i transferze do wnętrza komórki bakteryjnej. U *K. pneumoniae* można wyróżnić 4 typy sideroforów: enterobaktynę, jersiniobaktynę, salmochelinę oraz aerobaktynę, co umożliwia komórce bakteryjnej kolonizację w różnych miejscach w organizmie żywiciela. Enterobaktyna jest kodowana przez gen znajdujący się na chromosomie bakteryjnym i występuje u większości szczepów *K. pneumoniae* (Paczosa & Mecsas, 2016). Jej aktywność może być hamowana przez lipokalinę 2 – białko uwalniane podczas infekcji głównie przez neutrofile (Holden & Bachman, 2015). Salmochelina to glikozylowana postać enterobaktyny, wobec której lipokalina 2 wykazuje mniejsze powinowactwo. Geny kodujące salmochelinę, jersiniobaktynę i aerobaktynę są zlokalizowane na plazmidzie i występują głównie w szczepach hvKp (Paczosa & Mecsas, 2016).

Wiele badań wskazuje, że szereg szczepów *K. pneumoniae* produkuje bakterie tolerujące letalne stężenia antybiotyków, co jest jedną z głównych przyczyn trudności w leczeniu nawracających infekcji (Abokhalil et al., 2020; Y. Li et al., 2018). W kontekście klinicznym warto zaznaczyć, że powstawanie bakterii przetrwałych *K. pneumoniae* może być indukowane przez subletalne stężenie antybiotyków. Li i wsp. (2018) wykazali, że zastosowanie imipenemu w stężeniu 0,5 i 1×MIC skutkowało odpowiednio 17 i 190-krotnym wzrostem poziomu bakterii przetrwałych, natomiast inkubacja bakterii z ofloksacyną w zakresie stężeń 0,2 - 2×MIC spowodowała 5-30 – krotny wzrost poziomu bakterii przetrwałych w porównaniu z hodowlą kontrolną, niepoddaną działaniu żadnego z wymienionych antybiotyków.

Jednym ze sposobów zwiększenia skuteczności zwalczania bakterii przetrwałych *K. pneumoniae* jest łączenie cukrów prostych z antybiotykami, podobnie jak w przypadku innych gatunków bakteryjnych, o czym wspomniano wcześniej (Allison et al., 2011; rozdział 4.4.). W przypadku *K. pneumoniae* wykazano, że 30 min inkubacja z sacharozą przed dodaniem cyprofloksacyny zmniejsza poziom bakterii przetrwałych z 5,6 % do 0,008 %. Warto zaznaczyć, że nie jest to uniwersalna metoda, a efekt „*anty-persister*” jest zależny od kombinacji cukier-antybiotyk oraz od gatunku bakterii (Abokhalil et al., 2020). Inną metodą mającą na celu zwalczanie bakterii przetrwałych jest zastosowanie kombinacji antybiotyków. Wyniki badań wskazują, że terapia skojarzona zmniejsza poziom bakterii przetrwałych *K. pneumoniae* lub prowadzi do ich całkowitej eliminacji (Lee et al., 2019; Seo et al., 2024). Na przykład, Seo i wsp. (2024) wykazali, że skuteczne jest stosowanie kolistyny w połączeniu z amikacyną lub ciprofloksacyną.

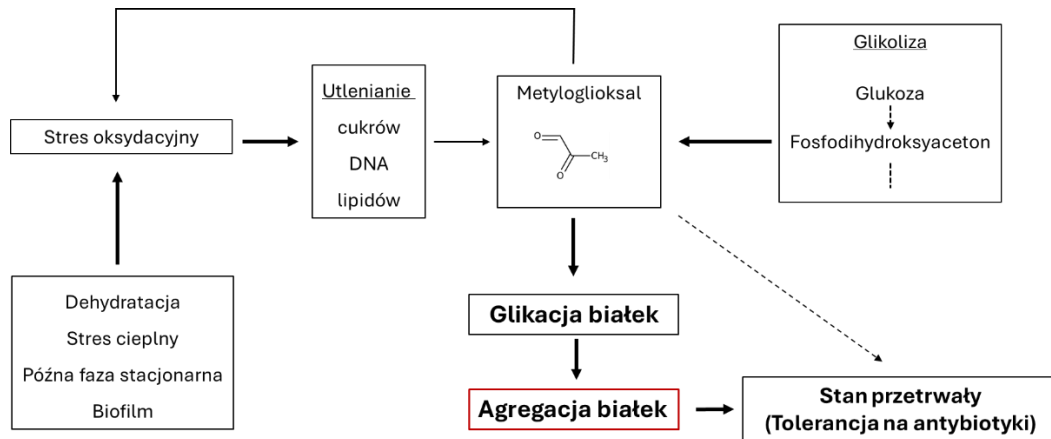
5. CEL PRACY

Dane literaturowe sugerują, że agregacja wewnątrzkomórkowych białek może spowolnić metabolizm i umożliwić bakteriom wejście w stan przetrwały. Wiadomo również, że powstawanie agregatów może być wynikiem glikacji białek oraz utraty wody w komórce bakteryjnej. W związku z tym, celem pracy była próba odpowiedzi na pytania:

1. czy agregaty białek, które powstają podczas wysuszenia i rehydratacji *E. coli* zawierają glikowane białka (Rys. 10)?
2. czy podobnie jak u *E. coli*, istnieje korelacja pomiędzy poziomem zagregowanych białek a liczbą bakterii przetrwałych w hodowlach *K. pneumoniae* poddawanych wysuszeniu i rehydratacji?

*W trakcie realizacji projektu stwierdziłam, że warunkami, które powodują stopniową utratę wody i szczególnie sprzyjają powstawaniu bakterii przetrwałych jest wzrost na podłożu stałym w formie makrokolonii. W przypadku *K. pneumoniae* w makrokolonii można było wyróżnić co najmniej dwie subpopulacje, kolejnymi zadaniami była więc:*

3. charakterystyka subpopulacji obecnych w makrokoloniiach *K. pneumoniae* (m. in. porównanie proteomu i wrażliwości na antybiotyki),
4. sprawdzenie czy wybrane związki o potencjalnym działaniu antybakteryjnym (sulforafan i eutektyk *Reline*) zapobiegają powstawaniu lub całkowicie eliminują bakterie przetrwałę *K. pneumoniae*.



Rys. 10. **Wpływ stresu środowiskowego na agregację i glikację białek oraz powstawanie bakterii przetrwałych.** Jednym z czynników indukujących bakterie przetrwałę są wewnątrzkomórkowe agregaty białkowe. Agregacja może być stymulowana przez glikację białek. Jednym z głównych czynników biorących udział w glikacji jest metyloglioksal (MGO), który powstaje głównie z fosfodihydroksyacetonu, produktu pośredniego glikolizy, oraz w wyniku utleniania lipidów, cukrów i DNA (Lee & Park, 2017). Różne niekorzystne dla bakterii warunki (dehydratacja, stres cieplny, faza stacjonarna, dojrzwały biofilm) mogą sprzyjać powstawaniu bakterii przetrwałych, ponieważ prowadzą do stresu oksydacyjnego, co z kolei pośrednio zwiększa poziom MGO. Wiadomo również, że sam MGO indukuje stres oksydacyjny (Tupe et al., 2019) i prawdopodobnie stymuluje pośrednio lub bezpośrednio powstawanie bakterii przetrwałych (Girgis et al., 2012).

6. MATERIAŁY I METODY

6.1. Szczepy bakteryjne

Badania przeprowadziłam z użyciem szczepów laboratoryjnych *E. coli* MC4100 [*araD139* Δ (*lacI*POZYA *argF*) 21 U169 *fla relA rpsL*] i *K. pneumoniae* ATCC 13883 oraz izolatów klinicznych *K. pneumoniae* pochodzących z Kolekcji Plazmidów i Drobnoustrojów Uniwersytetu Gdańskiego (KPD) i Kolekcji Mikroorganizmów ATCC.

Nazwa szczepu	Źródło pochodzenia	Kolekcja
<i>K. pneumoniae</i> 119-BA KM D5 pC3	Rana	KPD
<i>K. pneumoniae</i> 421-BA ESBL(+) 23956961	Mocz	KPD
<i>K. pneumoniae</i> 423-BA ESBL(+) MBL(+) 24039491	Mocz	KPD
<i>K. pneumoniae</i> 443-BA ESBL(+) 23959042	Wymaz z pachwiny	KPD
<i>K. pneumoniae</i> 576-BA ESBL (+) 274251	Rana	KPD
<i>K. pneumoniae</i> 577-BA ESBL (+) 269482	Wymaz z pachwiny	KPD
<i>K. pneumoniae</i> 578-BA ESBL (+) 274250	Mocz	KPD
<i>K. pneumoniae</i> MBL+	Mocz	KPD
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 10031	Brak danych	ATCC
<i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA1705	Mocz	ATCC

Szczepy bakteryjne przechowywano w temperaturze -80°C w pożywce LB z 15% glicerolem.

Badane izolaty różniły się między sobą wrażliwością na antybiotyki. Lekowrażliwość badanych izolatów została określona z wykorzystaniem pasek gradientowych do wyznaczenia wartości MIC i przedstawiona w Tab. 1.

Tab. 1. Lekowrażliwość badanych szczepów *K. pneumoniae*

Nazwa szczepu	Nazwa antybiotyku					
	gentamycyna	kanamycyna	ofloksacyna	kolistyna	amikacyna	meropenem
ATCC13883	W	W	W	W	W	W
119-BA	W	W	W	W	W	W
421-BA	W	O	O	O	O	W
423-BA	W	O	O	W	O	O
443-BA	W	O	O	O	W	W
576-BA	W	O	O	W	W	W
577-BA	W	O	O	W	W	W
578-BA	W	O	O	b.d.	b.d.	b.d.
MBL+	W	O	O	O	W	O
ATCC10031	W	W	W	O	W	W
ATCC BAA1705	W	O	O	W	W	O

O – szczep odporny, W – szczep wrażliwy określony na podstawie odpowiednio braku bądź obecności strefy zahamowania wzrostu, b.d. – brak danych

6.2. Pożywki i podłoża

- Pożywka LB (1% trypton; 1% NaCl; 0,5% ekstrakt drożdżowy)
- Pożywka minimalna (0,4 M MOPS; 0,04 M trycyna; 0,1 μM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 95 μM NH_4Cl ; 0,276 μM K_2SO_4 ; 0,005 μM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 5,2 μM MgCl_2 , 0,5M NaCl; 1,32 μM K_2HPO_4 , pH 7,4 ustalone za pomocą KOH) (Neidhardt et al., 1974)
- Pożywka SGM [Serum Growth Medium: 40% surowica ludzka, 60% DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)]
- Podłoże LA (1,5% agar, 1% trypton; 1% NaCl; 0,5% ekstrakt drożdżowy)
- Podłoże stałe minimalne (0,4 M MOPS; 0,04 M trycyna; 0,1 μM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 95 μM NH_4Cl ; 0,276 μM K_2SO_4 ; 0,005 μM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 5,2 μM MgCl_2 , 0,5M NaCl; 1,32 μM K_2HPO_4 , pH 7,4 ustalone za pomocą KOH; 1,5% agar)

6.3. Warunki wzrostu bakterii; stres cieplny, wysuszenie i rehydratacja, makrokolonie

Bakterie hodowałam w pożywce LB, pożywce minimalnej lub SGM. Hodowle nocne rozcieńczałam 1:100 w świeżej pożywce, inkubowałam w 37°C lub 40°C (stres cieplny), z wytrząsaniem (160 obr./min).

W celu wysuszenia bakterii hodowle płynne *E. coli* o $\text{OD}_{595}=0,5$ odwirowywałam (10 min, 2576 x g) i zawieszałam w pozostałych 5 ml supernatantu. Zawiesinę przenosiłam do płytki Petriego i pozostawiałam otwartą do całkowitego wysuszenia (4 godziny, 21°C, 40% wilgotności). Następnie bakterie zawieszałam w 10 ml 0,9% roztworu NaCl, dzieliłam na dwie 5 ml porcje i odwirowywałam (10 min, 2576 x g). Jeden z osadów zamrażałam (bakterie wysuszone – W), drugi zawieszałam w 10 ml pożywki LB i hodowałam przez 40, 80 lub 120 min w temperaturze 37°C. Po rehydratacji bakterie odwirowywałam przez 10 min przy 2576 x g, usuwałam supernatant, a osad przechowywałam w -20°C do dalszych analiz (bakterie po rehydratacji – R). Hodowlę *K. pneumoniae* o $\text{OD}_{595}=0,3$ nanosiłam w objętości 100 μl hodowli na całą powierzchnię płytki z cienką warstwą agaru (12 ml LA). Zamknięte płytki inkubowałam w cieplarni w 37°C. Po określonym czasie wysuszone bakterie zeszkrobywałam z powierzchni i zawieszałam w 10 ml 0,9% roztworze NaCl. Następnie zawiesinę bakterii odwirowywałam (10 min, 2576 x g).

W celu uzyskania makrokolonii na podłoże LA nanosiłam punktowo 10 μl hodowli nocnej. Płytki inkubowałam w 37°C od 16 do 72h.

6.4. Elektroforeza poliakrylamidowa białek w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)

Stosowałam żele rozdzielające o stężeniu 12% akrylamidów. Próby zawieszałam w buforze lizującym 2x stężonym (125 mM Tris-HCl pH 6,8, 4% SDS, 5% β -merkaptoetanol, 20% glicerol, 0,001% błękit bromofenolowy). Rozdział elektroforetyczny przeprowadzałam w buforze elektrodowym (25 mM Tris, 192 mM kwas aminooctowy, 0,1% SDS) przy napięciu 120-150 V.

6.5. Detekcja białek w żelu poliakrylamidowych

Do detekcji białek w żelu poliakrylamidowym po rozdziale elektroforetycznym stosowałam roztwór Coomassie R-250 (0,1% Coomassie Brilliant Blue, 50% metanol, 10% kwas octowy). Po 30 minutach inkubacji, żel odbarwiałam w roztworze 20% metanolu i 10% kwas octowego. Żel analizowałam w świetle widzialnym (białym) i archiwizowałam przy zastosowaniu systemu Azure c400. Pomiary densytometryczne wykonywałam w programie ImageJ v1.54d.

6.6. Immunodetekcja białek

Po zakończonej elektroforezie poliakrylamidowej rozdzielone białka poddawałam 16 godz. elektrotransferowi na błonę nitrocelulozową przy napięciu 20 V w buforze transferowym (25 mM Tris, 192 mM glicyna oraz 10% metanol). Następnie nitrocelulozę inkubowałam w roztworze TBS (50mM Tris-HCl pH 8,0; 0,5 M NaCl) z 0,1% Tween20 przez 60 minut. Membranę umieszczałam następnie na 1 godzinę w roztworze TBS z 0,05% Tween20 zawierającym przeciwciała I-rzędowe skierowane przeciwko badanemu białku (Tab. 2.). W celu usunięcia niespecyficznie związanych przeciwciał nitrocelulozę płukałam trzykrotnie roztworem TBS z 0,05% Tween przez 15 minut. Następnie inkubowałam w roztworze TBS z 0,05% Tween20, zawierającym przeciwciała drugorzędowe sprzężone z peroksydazą chrzanową. Po tym czasie ponownie płukałam nitrocelulozę w buforze TBS z 0,05% Tween (3x15min). Na przygotowaną membranę nanosiłam roztwór substratów SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific). Następnie wykonywałam zdjęcia za pomocą systemu Azure c400. Pomiary densytometryczne wykonywałam w programie ImageJ v1.54d.

Tab. 2. Stosowane przeciwciała

Przeciwciała	Charakterystyka	Rozcieńczenie
anty-AGEs	Koźmie przeciwciała poliklonalne skierowane przeciwko zaawansowanym końcowym produktom glikacji (Sigma-Aldrich, nr kat. AB9890)	1:10 000
anty-CML	Królicze przeciwciała poliklonalne skierowane przeciwko karboksymetylolizynie (Abcam, nr kat. ab27684)	1:2 500
anty-DNP	Królicze przeciwciała poliklonalne skierowane przeciwko dinitrofenolowi (Sigma-Aldrich, nr kat. D9656)	1:30 000
anty-królicze IgG-HRP	Koźmie przeciwciała anty-królicze sprzężone z peroksydazą chrzanową (Sigma-Aldrich, nr kat. A0545)	1:3 000
anty-koźmie IgG-HRP	Królicze przeciwciała anty-koźmie sprzężone z peroksydazą chrzanową (Sigma-Aldrich, nr kat. A8919)	1:30 000

6.7. Detekcja glikowanych białek

Oznaczałam poziom trzech różnych produktów glikacji: fruktozoaminy, karboksymetylolizyny (CML) i fluorescencyjnych zaawansowanych produktów glikacji (ang. *Advanced Glycation End products*, AGEs). Poziom fruktozoaminy oznaczałam przy użyciu testu z błękitem nitrotetrazolowym (NBT). Do 10 µl ekstraktu bakteryjnego dodałam 0,5 ml 0,7 mM NBT w 1 M buforze węglanu sodu (pH 10,35) i inkubowałam przez 2 h w temperaturze 37°C. Względny poziom zredukowanego NBT oznaczałam na podstawie pomiarów spektrometrycznych przy 540 nm. Poziom karboksymetylolizyny (CML) wyznaczałam przy użyciu przeciwciał anty-CML (podpunkt: 6.6.). Poziom fluorescencyjnych zaawansowanych produktów glikacji (AGEs) określiłam analizując widma emisyjne w przedziale 350 – 500 nm przy długości fali wzbudzenia: 335, 345, 366, 370 i 380 nm, przy użyciu spektrofluorymetru Perkin-Elmer LS-5B. Wyniki pomiarów były normalizowane względem całkowitego stężenia białka w próbce oznaczanego za pomocą zestawu Bradford Assay Kit (Thermo Scientific).

6.8. Izolacja i oznaczanie ilości agregatów białkowych *E. coli*

Osad bakteryjny uzyskany z 50 ml hodowli zawieszałam w 1 ml 0,2 M Tris-HCl pH 8.0. Następnie dodawałam 1 ml 1 M roztworu sacharozy w 0,2 M Tris-HCl pH 8.0 oraz 20 µl roztworu

lizozymu (12 mg/ml lizozymu w 100 mM EDTA pH 8.0). Po 15 minutach inkubacji prób w lodzie, dodawałam 2 ml wody. Po kolejnych 15 min próby poddawałam sonikacji (Sonikator Vibra Cell, 15 pulsów po 10 sekund, amplituda 20%). Do otrzymanych ekstraktów dodawałam 0,45 ml 20% roztworu Triton X-100 i inkubowałam w temperaturze pokojowej przez 15 minut. Próby porcjowałam do 3 probówek typu Eppendorf. Jedną z nich zamrażałam (frakcja rozpuszczalna), a pozostałe dwie wirowałam 30 minut (21382 x g, 4°C). Po usunięciu supernatantu osad (agregaty białkowe) zawieszałam w 20 µl buforu do lizy (podpunkt 6.4.). Frakcję rozpuszczalną i agregaty białkowe rozdzielałam za pomocą elektroforezy SDS-PAGE. Za pomocą analizy densytometrycznej (ImageJ v1.54d) określiłam poziom zagregowanych białek w stosunku do całkowitej ilości białek zawartych w ekstraktach bakteryjnych.

6.9. Izolacja agregatów białkowych z komórek *K. pneumoniae*

Osad bakteryjny uzyskany z 50 m hodowli zawieszałam w 1 ml 10 x rozcieńczonego roztworu CellLytic B Cell Lysis Reagent (Sigma, nr kat. C8740), z dodatkiem 20 µl roztworu lizozymu (12 mg/ml w 100 mM EDTA pH 8.0) oraz 0,2 µl benzonazy (Sigma, nr kat. E1014). Próby inkubowałam w temperaturze pokojowej z wytrząsaniem przez 20 minut, poddawałam sonikacji w łaźni wodnej (Sonic 5, moc ultradźwięków: 2 x 320 W, częstotliwość: 40 KHz, 10 cykli po 1 min, z 1 min przerwami), następnie wirowałam 10 minut (12045 x g). Otrzymany osad ponownie zawieszałam w 1 ml 10 x rozcieńczonego roztworu CellLytic B, mieszałam przez 2 minuty, następnie dodawałam 20 µl roztworu lizozymu, inkubowałam 20 minut i wirowałam (12045 x g, 5 min). Następnie do osadu dodawałam 1 ml 100 x rozcieńczonego roztworu CellLytic B. Po 10 minutach inkubacji próby wirowałam przez 5 min (12045 x g). Po usunięciu supernatantu, osad (agregaty białkowe) zawieszałam w 20 µl buforu do lizy (podpunkt 6.4.). Frakcję rozpuszczalną i agregaty białkowe rozdzielałam za pomocą elektroforezy SDS-PAGE.

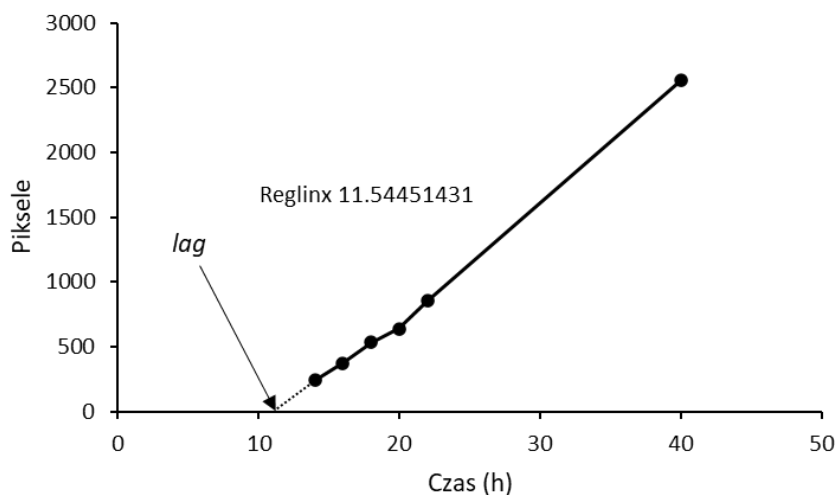
6.10. Oznaczanie pochodnych karbonylowych w białkach

W celu określenia poziomu grup karbonylowych w próbach zastosowałam metodę, która opiera się na reakcji grup karbonylowych białek z 2,4-dinitrofenylohydrazyną (DNPH), co prowadzi do powstania stabilnego produktu 2,4-dinitrofenylohydrazonu (DNP). Osady bakteryjne po suszeniu i rehydratacji przepłukiwałam w 10 mM Tris/HCl pH 8.0 i zawieszałam w 300 µl buforu zawierającym: 6% SDS, 10 mM EDTA, 0,5 M Tris/HCl pH 6.8. Próby ogrzewałam w bloku grzejnym w temperaturze 100°C przez 5 minut, a następnie przez kolejne 5 minut schładzałam w lodzie. Do 50 µl uzyskanego lizatu dodawałam 50 µl DNPH (10 mM DNPH w 2 M

HCl) i inkubowałam przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Po zakończonej inkubacji dodawałam po 50 µl 2 N NaOH oraz 150 µl buforu do lizy (podpunkt 6.4). Po 5 µl przygotowanych prób nanosiłam na nitrocelulozę (dot blot). Poziom karbonylowanych białek oznaczałam wykorzystując przeciwciała anty-DNP (podpunkt 6.6).

6.11. Wyznaczenie tempa wzrostu i fazy *lag* na podłożu stałym

Przygotowałam zawiesinę bakteryjną w LB o $OD_{595}=0,05$, następnie wykonałam seryjne, dziesięciokrotne rozcieńczenia zawiesiny w 0,9% NaCl. 100 µl z wybranych rozcieńczeń nanosiłam na całą powierzchnię podłoża LA i inkubowałam płytki w 37 °C. Aby zmierzyć tempo wzrostu kolonii wykonałam serię zdjęć w odstępach 2 - godzinnych. Analizowałam wzrost i położenie średnio 120 kolonii dla każdej z subpopulacji za pomocą programu OpenCFU v3.9.0 (<https://opencfu.sourceforge.net/>). Faza *lag* została określona jako punkt przecięcia prostej przedstawiającej zmianę wielkości kolonii (mierzoną w pikselach) w czasie z osią x. Długość fazy *lag* obliczałam na podstawie równania opisującego zmianę wielkości kolonii w czasie (Rys. 11).



Rys. 11. Wyznaczenie fazy *lag* dla przykładowej kolonii (przecięcie z osią X - 11,54 h).

6.12. Analiza białek metodą spektrometrii mas

Białka identyfikowano w Laboratorium Spektrometrii Mas na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii UG-GUM. Próby do analizy przygotowano zgodnie z protokołem umieszczonym na stronie: <https://biotech.ug.edu.pl/dzialalnosc-naukowa/zespol-laboratoriow-specjalistycznych/laboratorium-spektrometrii-mas>.

6.13. Oznaczanie całkowitej liczby komórek bakteryjnych, liczby komórek dzielących się, żywych i martwych

Hodowlę bakteryjną odwirowałam i zawieszałam w 0,9% roztworze NaCl. Liczbę wszystkich komórek bakteryjnych oznaczałam w komorze Neubauera, pod mikroskopem Zeiss Axio Scope.A1, w powiększeniu x1000 w świetle widzialnym.

Liczbę żywych, dzielących się komórek określałam na podstawie wzrostu bakterii na podłożu stałym LA. W tym celu wykonałam seryjne rozcieńczenia hodowli bakteryjnej w 0,9% NaCl. Następnie punktowo nanosiłam po 10 µl z każdego rozcieńczenia na podłoże LA. Płytki inkubowałam przez 16 h w 37°C i obliczałam CFU (ang. *Colony Forming Unit*).

Aby wyznaczyć liczbę komórek żywych i martwych 100 µl hodowli bakteryjnej odwirowywałam i zawieszałam w 1 ml 0,9% NaCl. Następnie do 100 µl zawiesiny dodawałam 0,3 µl mieszaniny 1,67 mM jodku propidyny i 1,67 mM SYTO9 (LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit, Invitrogen). Próby inkubowałam przez 7 minut w ciemności w temperaturze pokojowej, a następnie obserwowałam w mikroskopie fluorescencyjnym Zeiss Axio Scope.A1. Barwnik SYTO 9 wnika do komórek żywych i martwych dzięki niskiej masie cząsteczkowej (barwiąc komórki na zielono), natomiast jodek propidyny przenika wyłącznie przez uszkodzoną błonę komórkową (barwiąc komórki na czerwono). Zastosowanie obu barwników pozwala rozróżnić komórki żywe od martwych na podstawie ciągłości błon komórkowych. Obliczałam procentowy stosunek żywych (zielonych) do martwych (czerwonych) komórek bakteryjnych.

W celu wyznaczenia liczby komórek żywych, ale nie dzielących się (VBNC, ang. *Viable But Not Culturable*) odejmowałam od całkowitej liczby bakterii żywych liczbę komórek dzielących się.

6.14. Oznaczenie poziomu komórek przetrwałych

Hodowle bakteryjne rozcieńczałam do $OD_{595}=0,1$ w świeżej pożywce, pobrałam próbę do oznaczenia CFU_0 (CFU przed dodaniem antybiotyku), a następnie dodawałam meropenem (do stężenia końcowego 32 µg/ml), amikacynę (296 µg/ml), kolistynę (30 µg/ml), gentamycynę (20 µg/ml), ofloksacynę (5 µg/ml) lub kanamycynę (30 µg/ml). Stężenia dodanych antybiotyków odpowiadały 10-50 krotnym wartościom MIC. Hodowle inkubowałam w 37°C, z wytrząsaniem przez 24 h. Aby sprawdzić czy krzywa przeżywalności ma charakter dwufazowy, wymagany dla bakterii przetrwałych, w określonych punktach czasowych pobierałam próby do oznaczenia liczby bakterii, które przeżywały działanie antybiotyku (CFU). Procent komórek przetrwałych obliczałam jako stosunek $(CFU/CFU_0) \times 100\%$.

W celu potwierdzenia, że bakterie, które przetrwały działanie antybiotyków nie są opornymi na antybiotyki mutantami, przenosiłam kolonie na płytki LA z takim samym stężeniem antybiotyku. Brak wzrostu na podłożu z antybiotykiem świadczył o tym, że bakterie które przetrwały działanie antybiotyku nie posiadają mutacji warunkujących oporność na wybrane antybiotyki.

6.15. Wirowanie w gradiencie Percollu

W celu otrzymania gradientu przygotowałam 1,5 ml 54% Percollu (Sigma-ALdrich) w roztworze PBS (0,9 % NaCl buforowany fosforanami, pH 7,4). Uzyskaną mieszaninę wirowałam (35540 x g, 15 min). Osady bakteryjne (po wysuszeniu, rehydratacji, szoku cieplnym) przepłukałam PBS, a następnie zawieszałam w 0,4 ml PBS. Przygotowane próby nanosiłam na utworzony gradient i wirowałam (35540 x g, 15 min). Po zakończeniu wirowania zbierałam uzyskane frakcje od góry probówki.

6.16. Analiza statystyczna

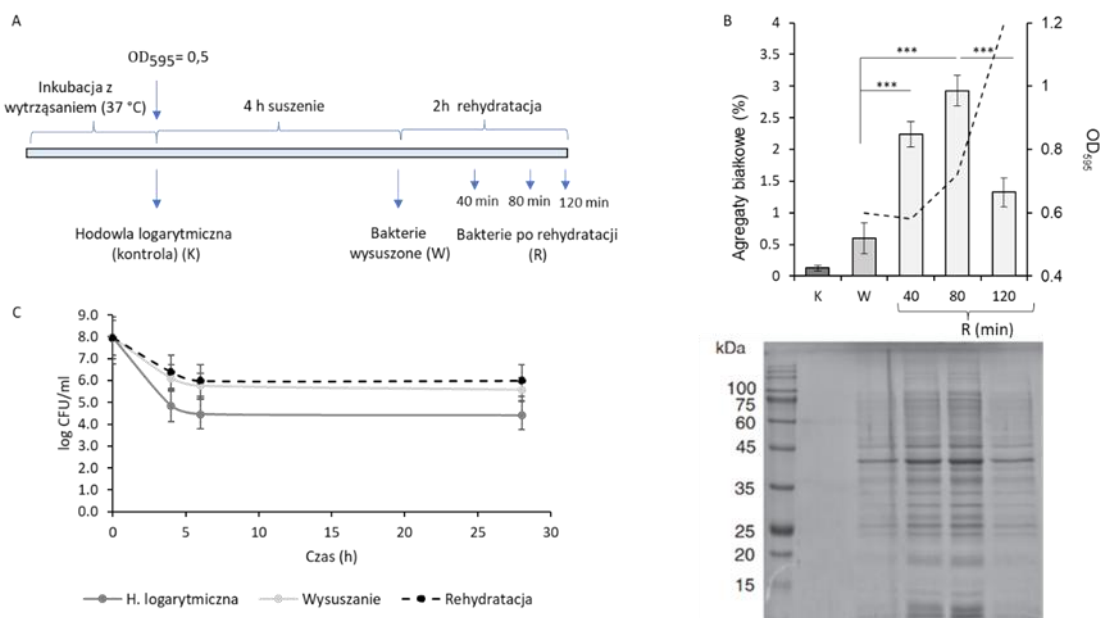
Wszystkie badanie wykonałam w co najmniej w trzykrotnych powtórzeniach. Zastosowałam test t-Studenta w celu potwierdzenia istotności statystycznej otrzymywanych wyników. W wybranych przypadkach wybrałam inne testy statystyczne co zostało zaznaczone w Wynikach. Słupki błędów oznaczają odchylenie standardowe obliczone na podstawie trzech niezależnych doświadczeń. * $p \leq 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

7. WYNIKI

7.1. Agregacja i glikacja białek oraz powstawanie bakterii przetrwałych u *E. coli*

7.1.1. Wysuszanie hodowli płynnych i rehydratacja *E. coli* indukują agregację białek oraz powstawanie bakterii przetrwałych

Wstępne doświadczenia wykonane w ramach mojej pracy magisterskiej sugerowały, że podczas wysuszania i rehydratacji *E. coli* powstają agregaty białkowe. Doświadczenia przeprowadzone w ramach tej pracy wykazały (Rys. 12B), że w hodowli kontrolnej - przed wysuszeniem, agregaty były prawie niewykrywalne, natomiast po 4 h wysuszania poziom agregatów białkowych osiągał 0,6% całkowitej ilości białka w ekstrakcie bakteryjnym. W trakcie rehydratacji (80 min) poziom agregatów wzrastał do 2,8%. Należy zauważyć, że bakterie zaczynały ponownie się dzielić już po ok. 40 min rehydratacji, co powinno sprzyjać usuwaniu agregatów. Jednak białka nadal ulegały agregacji. Dopiero po dwóch godzinach rehydratacji w świeżej pożywce poziom agregatów białkowych gwałtownie spadł. (Rys. 12B). Zakładając, że agregacja białek może powodować zahamowanie metabolizmu i „uśpienie” komórek (Bollen et al., 2021; Dewachter et al., 2021.), sprawdziłam poziom bakterii przetrwałych w hodowli kontrolnej, po wysuszeniu i po rehydratacji. Okazało się, że liczba bakterii przetrwałych wzrastała po wysuszeniu i utrzymywała się na stałym poziomie podczas rehydratacji (Rys. 12C).

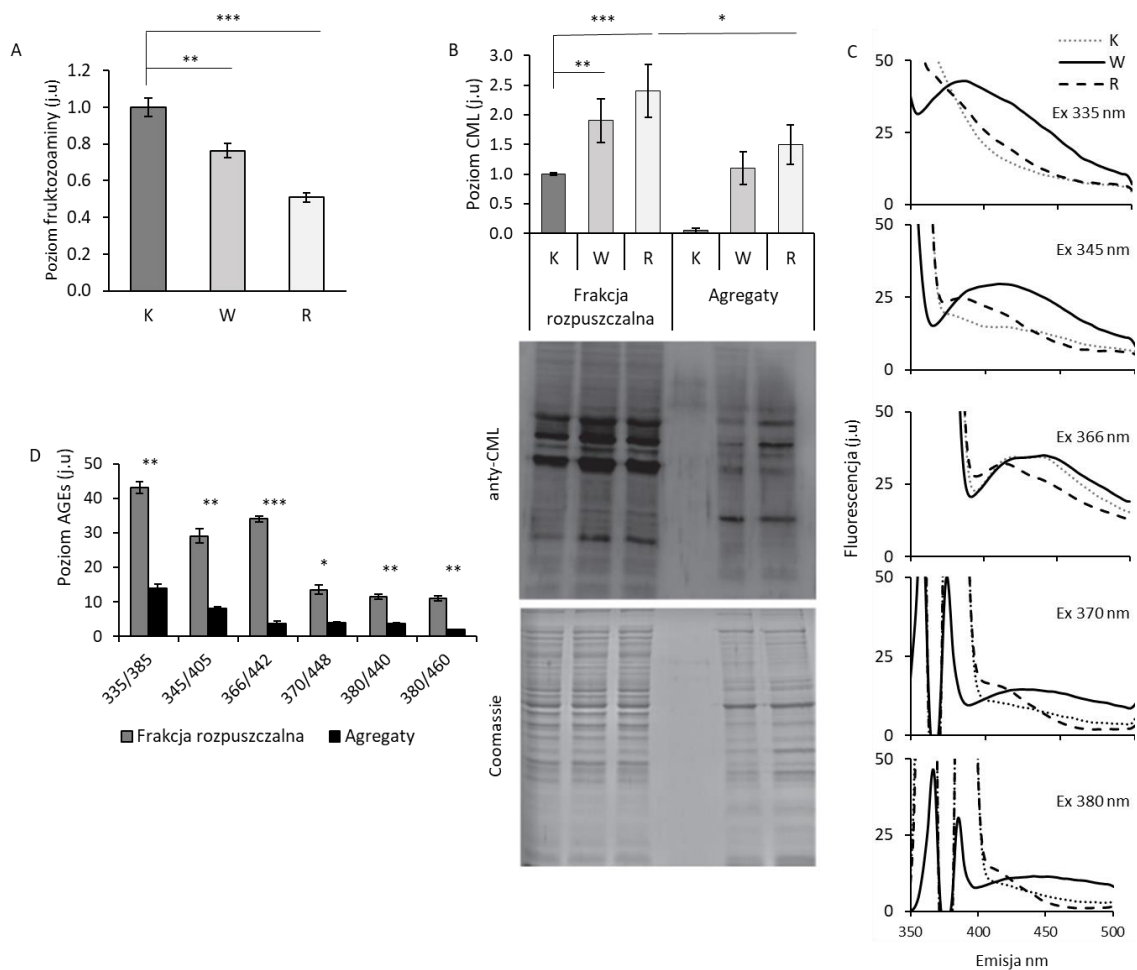


Rys. 12. Poziom agregatów białkowych i komórek przetrwałych w hodowli *E. coli* poddanej wysuszeniu i rehydratacji. (A) Schemat doświadczenia. (B) Poziom agregatów białkowych określono na podstawie pomiarów densytometrycznych żeli barwionych Coomassie. Na żel naniesiono agregaty wyizolowane

z równych ilości bakterii. 100%-całkowita ilość białka w ekstraktach bakteryjnych. W trakcie doświadczenia mierzono gęstość optyczną hodowli (OD_{595}). (C) Poziom bakterii przetrwałych tolerujących ofloksacynę ($5 \mu\text{g/ml}$) określono w hodowli kontrolnej (przed wysuszeniem), po 4 h wysuszeniu oraz po rehydratacji (40 min).

7.1.2. W trakcie wysuszania i rehydratacji w komórkach *E. coli* pojawiają się produkty glikacji

Aby sprawdzić czy stres związany z wysuszeniem i rehydratacją indukuje glikację białek oznaczałam poziom trzech różnych produktów glikacji: fruktozoaminy, karboksymetylolizyny (CML) i fluorescencyjnych zaawansowanych produktów glikacji. Po wysuszeniu i rehydratacji poziom fruktozoaminy malał (Rys. 13A) – prawdopodobnie na skutek przekształceń w bardziej złożone produkty glikacji (Lassak et al., 2022; Rabbani & Thornalley, 2021). Po wysuszeniu natomiast, poziom CML i fluorescencyjnych produktów AGEs wzrastał w porównaniu z kontrolą (Rys. 13B,C). Obecność pewnych ilości CML w hodowli kontrolnej była prawdopodobnie spowodowana użyciem bogatej pożywki LB, która sprzyja powstawaniu wczesnych i późnych produktów glikacji u *E. coli* (Dimitrova et al., 2004; Kram & Finkel, 2015). Fluorescencyjne produkty AGEs pojawiały się dopiero po wydłużeniu czasu wysuszenia do 20 h.

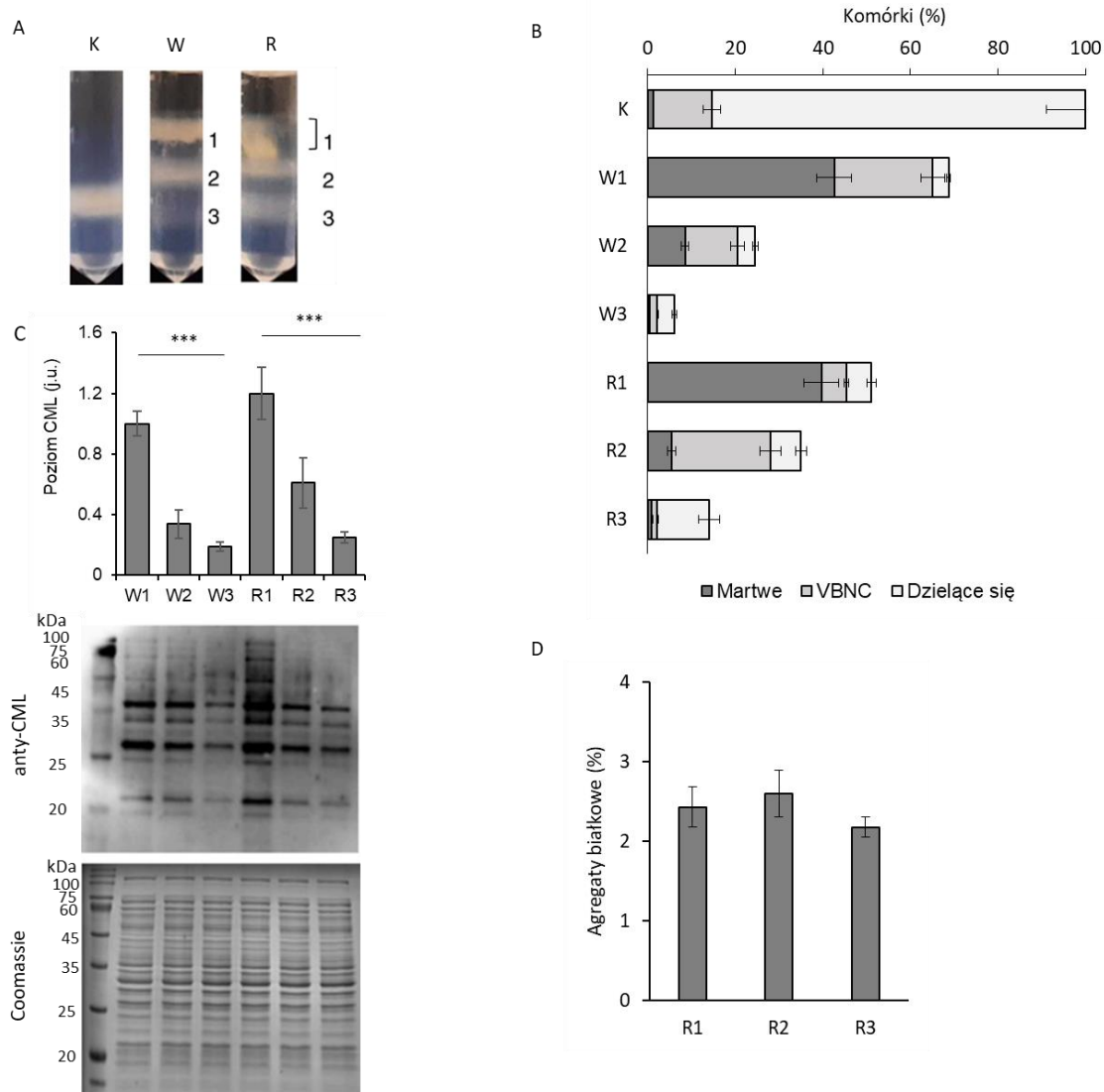


Rys. 13. **Detekcja produktów glikacji u *E. coli* po wysuszeniu i rehydratacji.** Bakterie suszono przez 4 h (A, B) oraz 20 h (C). (A) Poziom produktów glikacji określono według opisu umieszczonego w *Materiałach i Metodach*. Poziom fruktozoaminy mierzono za pomocą testu NBT. (B) Do oznaczenia poziomu CML wykorzystano metodę immunodetekcji z użyciem przeciwciał anty-CML oraz pomiary densytometryczne (program ImageJ). (C) Poziom fluorescencyjnych AGEs określono na podstawie widm uzyskanych przy różnych długościach fal wzbudzenia. Strzałki wskazują wartości fluorescencji odpowiadające pentozydynie (Ex 335 nm/ Em 385 nm), vesperlizynie C (Ex 345 nm/Em 404 nm), vesperlizynie B/C (Ex 366 nm/ Em 442 nm), lizylo-piropirydyne (Ex 370 nm/ Em 448 nm), FFi (Ex 380 nm/ Em 440 nm) i pochodnym fluorolinków (Ex 380 nm/Em 460 nm) (Séro et al., 2013) K – kontrola, W – wysuszenie, R – rehydratacja.

Po rehydratacji ilość CML nadal wzrastała (Rys. 13B), jednak poziom fluorescencyjnych AGEs uległ znacznemu obniżeniu (Rys. 13C). Ponieważ wynikiem glikacji mogą być nierozpuszczalne produkty ulegające sieciowaniu (Fournet et al., 2018; Iannuzzi et al., 2014; Rabbani & Thornalley, 2021b) spodziewałam się, że większość fluorescencyjnych AGEs powinna znajdować się w agregatach. Agregaty białkowe zawierały jednak niższy poziom CML i fluorescencyjnych AGEs niż frakcja rozpuszczalna (Rys. 13B,D). Wyniki te sugerują, że większość produktów glikacji powstających w wyniku wysuszenia i rehydratacji pozostawała we frakcji rozpuszczalnej i nie

ulegała agregacji. Należy zaznaczyć, że w trakcie izolacji agregatów stosowałam detergent Triton X-100, dlatego we frakcji rozpuszczalnej znajdowały się również białka błonowe, które mogły ulegać glikacji. To zagadnienie zostanie omówione szerzej w Dyskusji.

Stosunkowo niewielka ilość produktów glikacji w agregatach oraz dane literaturowe sugerowały, że agregaty białkowe mogą pełnić rolę ochronną w komórkach bakteryjnych (Govers et al., 2018; X. Wang et al., 2020). Aby zweryfikować tę hipotezę podjęłam próbę rozdzielenia hodowli *E. coli* na subpopulacje komórek martwych i żywych, z których następnie zamierzałam izolować agregaty. Obecność agregatów wyłącznie w komórkach martwych wskazywałaby na ich działanie toksyczne, natomiast obecność agregatów w komórkach żywych sugerowałaby ich funkcję ochronną. W tym celu wykorzystałam wirowanie w gradiencie Percollu. Technika ta została wykorzystana we wcześniejszych badaniach prowadzonych w naszym zespole do rozdzielania hodowli po szoku termicznym na dwie subpopulacje różniące się procentową zawartością komórek martwych, żywych – zdolnych do podziału i VBNC (żywych ale niezdolnych do podziału) (Bruhn-Olszewska et al., 2018). Do rozróżnienia komórek żywych i martwych służył zestaw barwników fluorescencyjnych zawierający: jodek propidyny i SYTO 9 (rozdział Materiały i Metody, podpunkt 6.13). W moich badaniach wykorzystałam hodowle w fazie logarytmicznego wzrostu (kontrola), po wysuszeniu (4 h) oraz rehydratacji (40 min). W wyniku wirowania w gradiencie Percollu w hodowli kontrolnej znajdowała się tylko jedna frakcja, natomiast w hodowlach po wysuszeniu i po rehydratacji widoczne były 3 oddzielne subpopulacje (Rys. 14A). Następnie sprawdziłam w zebranych frakcjach zawartość komórek dzielących się, VBNC oraz martwych. Większość martwych komórek zlokalizowana była we frakcji o najniższej gęstości (W1 i R1). Subpopulacje o średniej gęstości (W2 i R2) charakteryzowały się największą zawartością komórek VBNC, natomiast frakcje o najwyższej gęstości (W3 i R3) zawierały w większości komórki żywe, zdolne do podziału (Rys. 14B). Co ciekawe subpopulacja bakterii po rehydratacji R3 zawierała więcej żywych, dzielących się komórek niż w odpowiadającej jej subpopulacji W3 uzyskanej po wysuszeniu. W wyizolowanych subpopulacjach oznaczyłam poziom glikowanych i zagregowanych białek (Rys. 14C). Ze względu na niewielką liczbę bakterii, którą uzyskałam po wirowaniu w każdej z subpopulacji, agregaty izolowałam jedynie z prób otrzymanych po rehydratacji (Rys. 14D).



Rys. 14. **Subpopulacje *E. coli* powstałe po wysuszeniu i rehydratacji.** (A) Hodowle: K - kontrolną, W - po wysuszeniu (4 h) i R - po rehydratacji (40 min) rozdzielono w gradencie Percollu. (B) Zawartość procentową komórek żywych- dzielących się, martwych oraz VBNC określono na podstawie barwienia zestawem LIVE/DEAD zgodnie z opisem w Materiałach i Metodach (podpunkt 6.13.) (C) Poziom CML w wyizolowanych subpopulacjach oznaczono metodą immunodetekcji z użyciem przeciwciał anty-CML oraz pomiarów densytometrycznych (program ImageJ). (D) Poziom agregatów białkowych w wyizolowanych subpopulacjach uzyskanych po rehydratacji. 100% - całkowita ilość białka w ekstraktach bakteryjnych.

Najwyższy poziom CML odnotowałam w frakcjach, w których dominują komórki martwe - W1 i R1 (Rys. 14C), natomiast poziom agregatów we wszystkich trzech wyizolowanych subpopulacjach, zawierających większość martwych (R1) lub żywych (R3) komórek, był porównywalny (Rys. 14D). Wyniki te sugerują, że glikacja w większym stopniu niż agregacja białek przyczynia się do utraty ciągłości błony (która staje się przepuszczalna dla jodku propidyny) i śmierci komórek bakteryjnych.

Podsumowując tę część doświadczeń wykazałam, że:

- W trakcie stresu spowodowanego przez wysuszenie/rehydratację komórek *E. coli* białka ulegały agregacji nie tylko podczas wysuszania, ale również podczas rehydratacji. Agregacji białek podczas wysuszania towarzyszył wzrost poziomu bakterii przetrwałych.
- Wysuszenie powodowało pojawianie się w komórkach *E. coli* CML i fluorescencyjnych AGEs. Uzyskane wyniki sugerowały, że agregaty mogą pełnić funkcje ochronną podczas stresu.

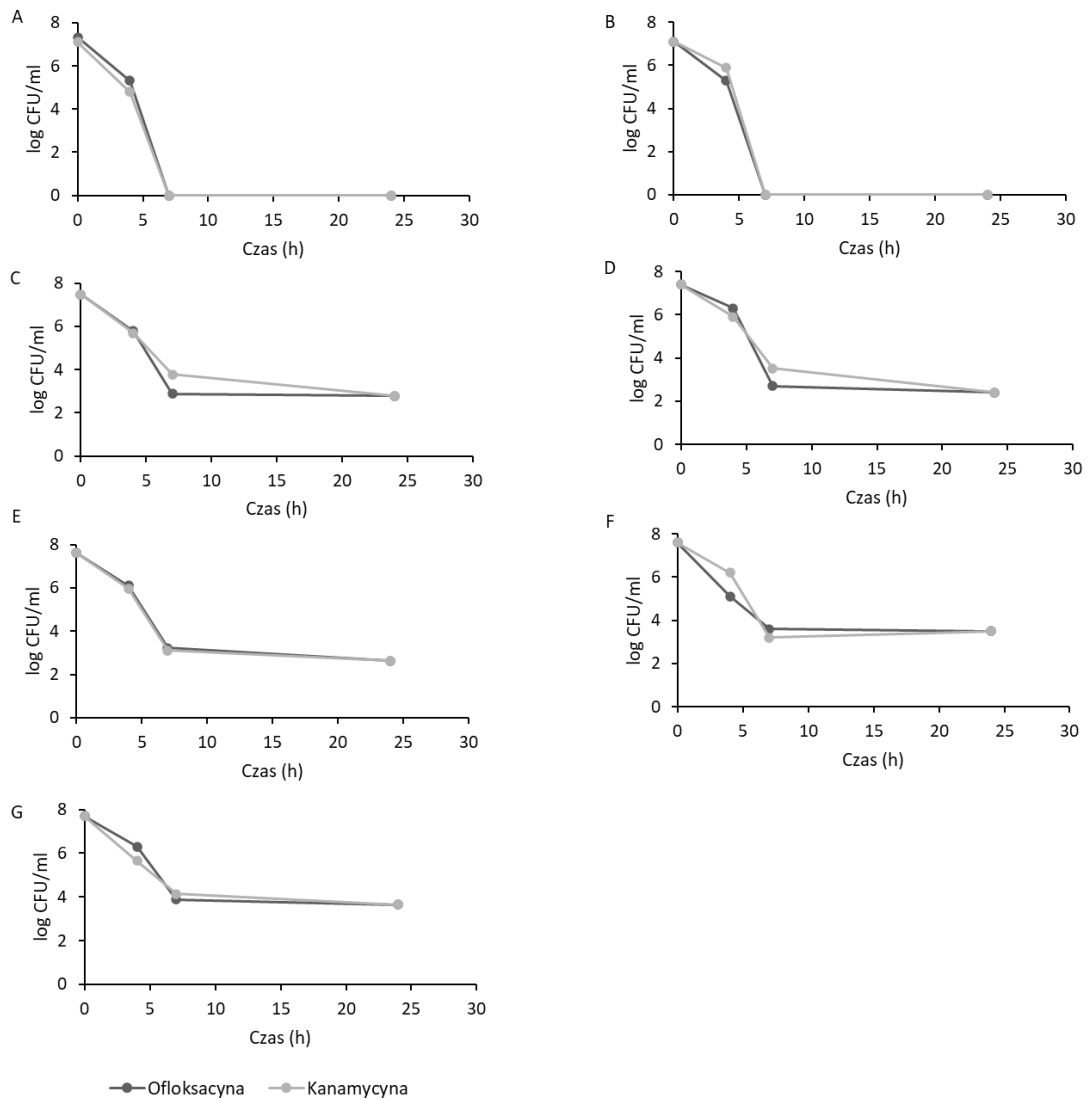
7.2. Powstawanie bakterii przetrwałych u *K. pneumoniae*

Kolejnym zadaniem było sprawdzenie, czy podobnie jak u *E. coli*, istnieje związek pomiędzy agregacją białek i powstawaniem bakterii przetrwałych u *K. pneumoniae*. Wstępne doświadczenia przeprowadziłam wykorzystując szczep *K. pneumoniae* ATCC 13883.

7.2.1. Izolacja bakterii przetrwałych *K. pneumoniae*

Realizacja tego zadania w pierwszej kolejności wymagała znalezienia optymalnych warunków indukujących bakterie przetrwałe. W tym celu sprawdzałam wpływ różnych czynników stresowych i warunków wzrostu: wysuszenie, stres cieplny, fazę stacjonarną, i formowanie biofilmu (makrokolonii). Do izolacji bakterii przetrwałych stosowałam kanamycynę i ofloksacynę (w stężeniu 10×MIC), na które szczep ATCC 13883 wykazywał wrażliwość. Ponieważ *K. pneumoniae* jest patogenem zaliczanym do grupy BSL2, realizacja tego zadania wymagała zmiany warunków wysuszania i sposobu izolacji agregatów białkowych. W przypadku *K. pneumoniae* wysuszenie w otwartych szalkach Petriego nie było wskazane, dlatego zastosowałam długotrwałe, siedmiodniowe wysuszenie bakterii na cienkiej warstwie agaru w 37°C. Po wysianiu wysuszonych bakterii na podłoże stałe nie zaobserwowałam ich wzrostu, a na podstawie barwienia zestawem LIVE/DEAD stwierdziłam, że wszystkie komórki są martwe. W kolejnym doświadczeniu wykorzystałam rosnące na podłożu stałym makrokolonie - formę biofilmu, która podczas długotrwałej inkubacji ulega stopniowemu wysuszeniu, w sposób bardziej zbliżony do naturalnych warunków. Sprawdziłam również inne czynniki stresowe, które mogły indukować bakterie przetrwałe: stres cieplny oraz fazę stacjonarną. W żadnej testowanej kombinacji (kanamycyna/ofloksacyna i różne warunki hodowli/czynniki stresowe) nie zaobserwowałam istotnej indukcji bakterii przetrwałych. Jedynie w przypadku makrokolonii

poziom bakterii przetrwałych tolerujących oba antybiotyki przekroczył 0,01% całkowitej liczby CFU przed dodaniem antybiotyku (Rys. 15H).

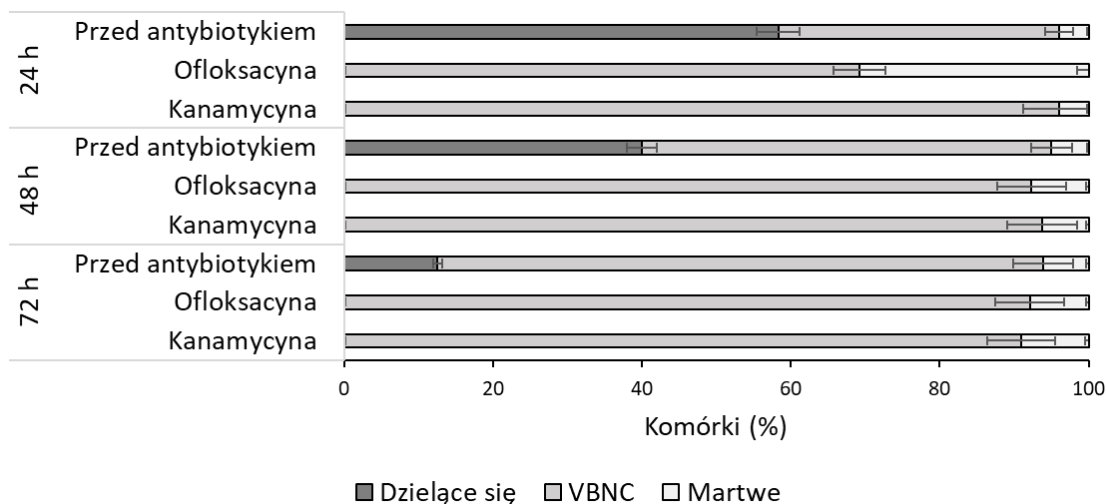


H

Warunki hodowli	% bakterii przetrwałych	
	Ofloksacyna (10xMIC)	Kanamycyna (10xMIC)
H. logarytmiczna	0	0
Wysuszenie	0	0
Stres cieplny	0.0025	0.02
H. płynna 24h	0.002	0.013
H. płynna 48h	0.004	0.003
H. płynna 72h	0.01	0.004
Makrokolonie 72h	0.015	0.028

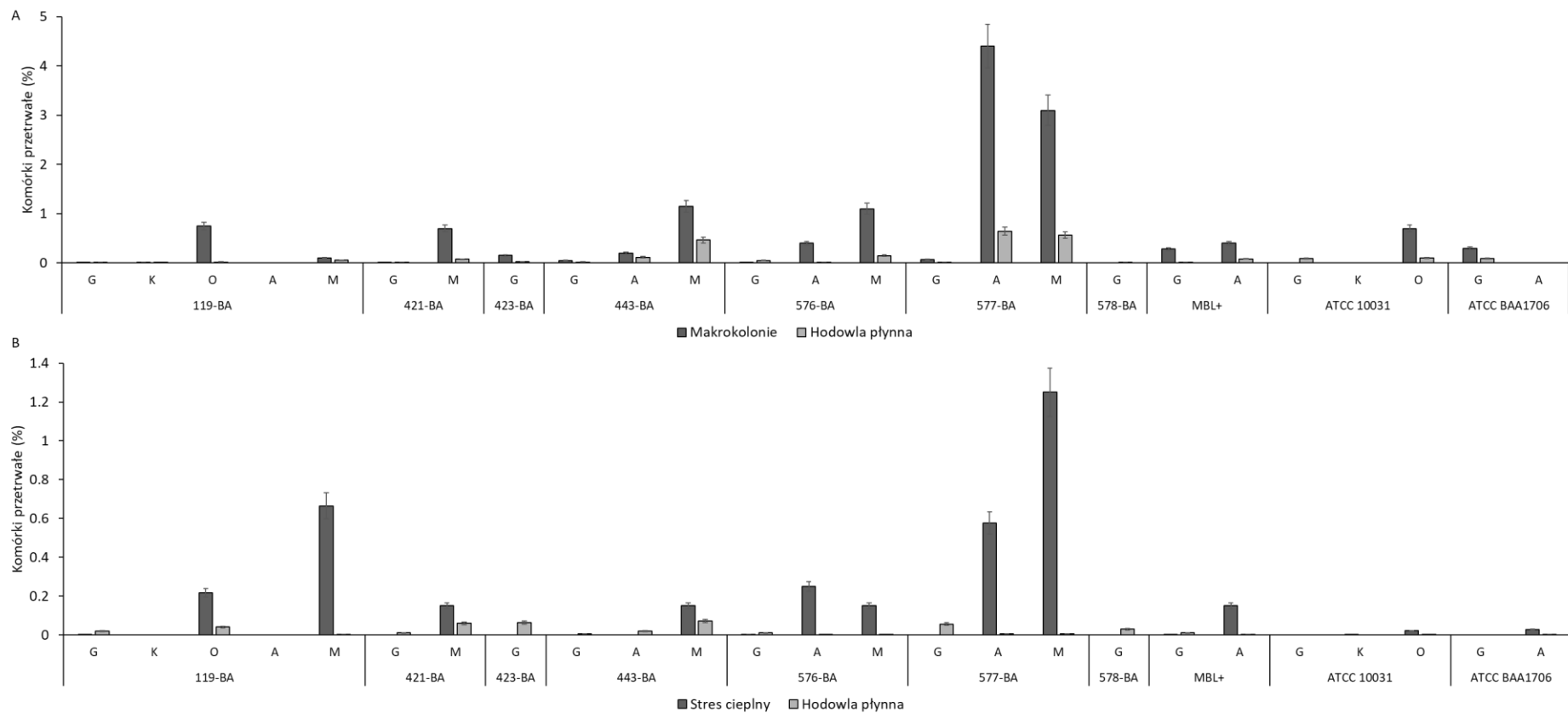
Rys. 15. Wpływ warunków hodowli na poziom bakterii przetrwałych w szczepie *K. pneumoniae* ATCC 13883. Bakterie (A) z hodowli logarytmicznej, (B) wysuszone, (C) po stresie cieplnym (40°C), (D) z hodowli płynnej 24 h, (E) hodowli płynnej 48 h, (F) hodowli płynnej 72 h, (G) 72 h makrokolonii, inkubowano z ofloksacyną lub kanamycyną (stężenie 10xMIC). (H) Poziom bakterii przetrwałych po 24 h inkubacji z antybiotykami (100%- całkowita liczba CFU/ml przed dodaniem antybiotyku).

Barwienie LIVE/DEAD wykazało, że większość komórek *K. pneumoniae* ATCC 13883 przeżywała działanie antybiotyków w formie VBNC. Rys. 17. przedstawia dane dla przykładowej płynnej hodowli stacjonarnej.



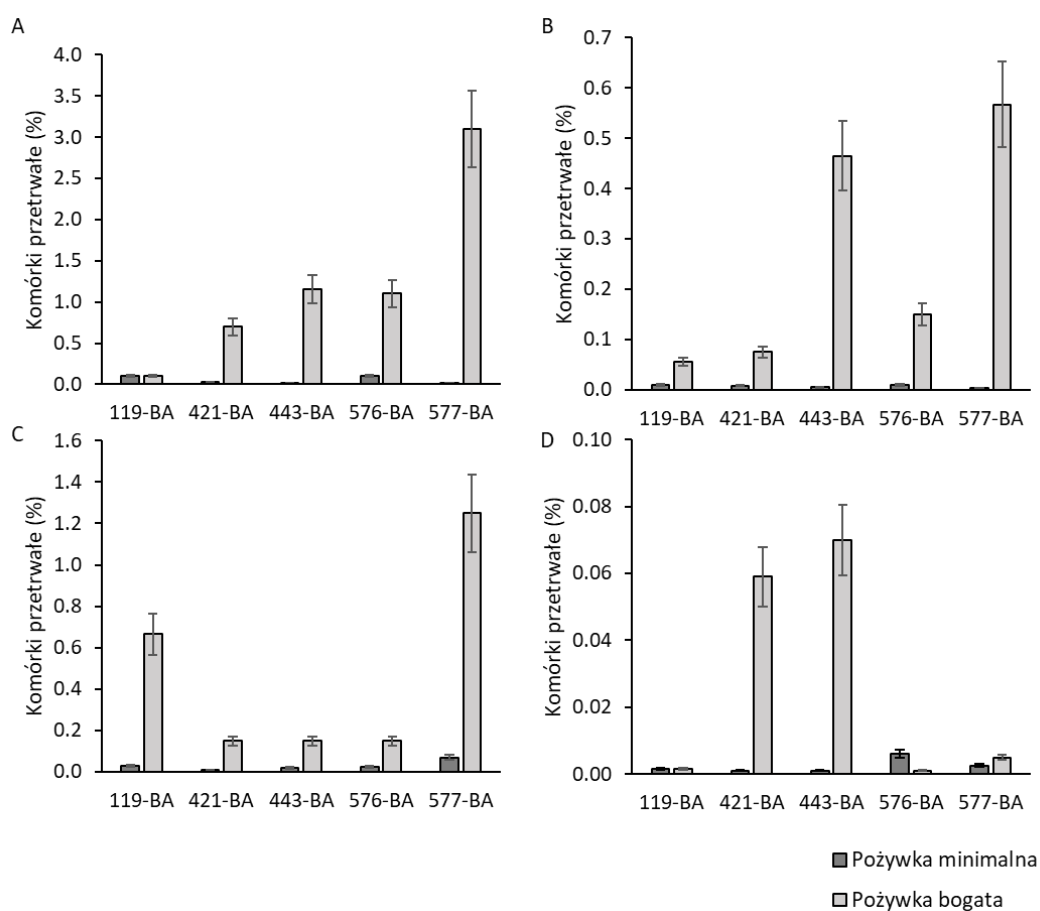
Rys. 16. Zawartość procentowa bakterii żywych - dzielących się, VBNC oraz martwych w hodowli stacjonarnej *K. pneumoniae* ATCC 13883. Zawartość procentową komórek żywych - dzielących się, VBNC oraz martwych określono na podstawie barwienia zestawem LIVE/DEAD zgodnie z opisem w Materiałach i Metodach (podpunkt 6.13).

Ponieważ uzyskane wyniki wykazały, że szczep *K. pneumoniae* ATCC 13883 nie jest odpowiednim modelem do przeprowadzenia zaplanowanych badań, postanowiłam sprawdzić powstawanie bakterii przetrwałych w izolatach klinicznych *K. pneumoniae* (119-BA, 421-BA, 423-BA, 443-BA, 576-BA, 577-BA, 578-BA, MBL+) oraz dwóch dodatkowych szczepach z kolekcji ATCC (ATCC 10031 oraz ATCC BAA1705). Zbadałam wpływ różnych warunków wzrostu i czynników stresowych: makrokolonie (Rys. 17A), stres cieplny (Rys. 17B), głodzenie (hodowla w pożywce minimalnej) (Rys. 18) oraz hodowla z dodatkiem surowicy ludzkiej (Rys. 19). Pożywkę SGM (ang. *Serum Growth Medium*) zawierającą surowicę ludzką zastosowałam aby w większym stopniu odtworzyć warunki panujące w organizmie gospodarza.



Rys. 17. **Poziom bakterii przetrwałych** (A) w 72 h makrokolonii oraz w płynnej 72 h hodowli stacjonarnej (kontrola) (B) w 24 h hodowli płynnej po stresie cieplnym (40°C) oraz w 24 h hodowli płynnej kontrolnej (37°C). Bakterie inkubowano z antybiotykami (10×MIC) przez 24 h w 37°C; G – gentamycyna, K – kanamycyna, A – amikacyna, M – meropenem, O – ofloksacyna. 100% -CFU/ml przed dodaniem antybiotyku.

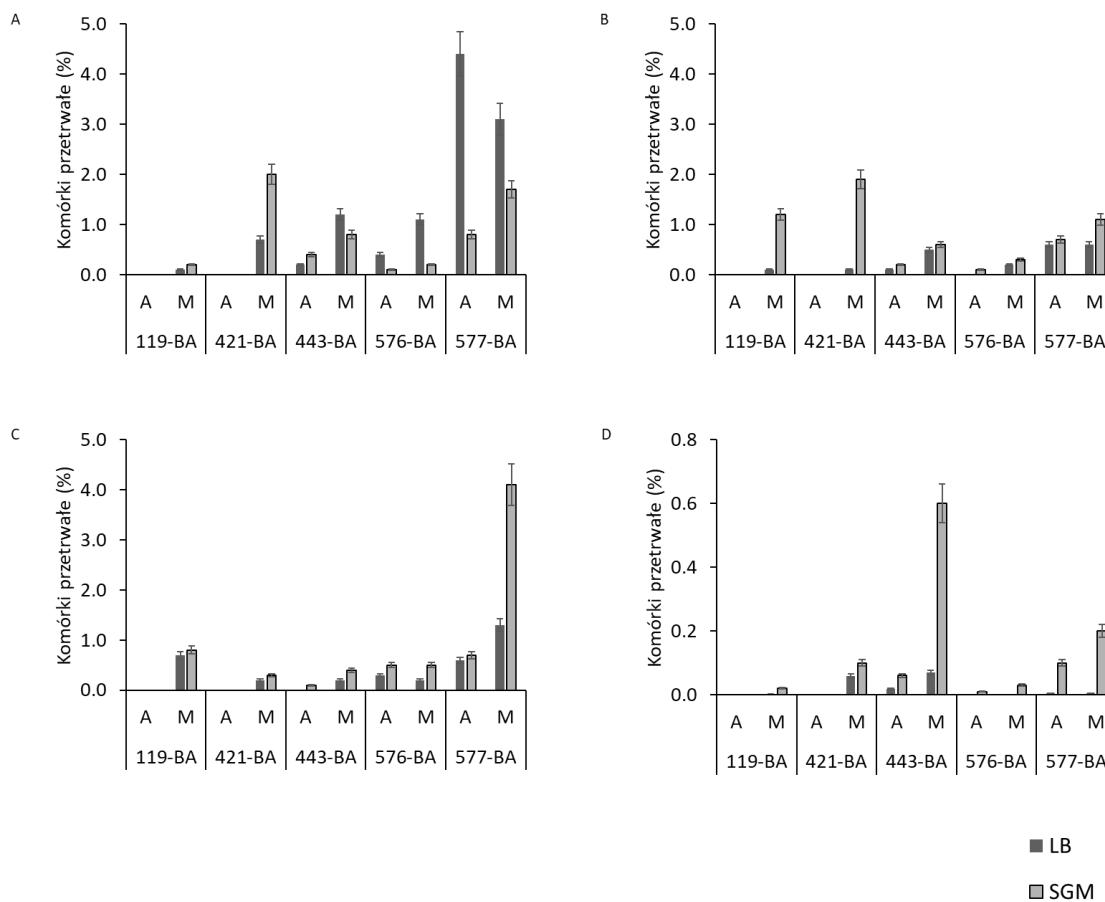
Wybrane izolaty kliniczne *K. pneumoniae* charakteryzowały się wyższym niż w przypadku szczepu ATCC 13883, poziomem bakterii przetrwałych, który zmieniał się w zależności od zastosowanego antybiotyku oraz warunków hodowli (Rys. 17). Najwięcej bakterii przetrwałych stwierdziłam w makrokoloniiach 577-BA; komórki tolerujące amikacynę i meropenem stanowiły odpowiednio aż 4,3% i 3,1% całkowitej liczby CFU/ml przed dodaniem antybiotyku (Rys. 17A). Również stres cieplny indukował powstawanie bakterii przetrwałych w większości testowanych szczepów. Ich najwyższy poziom (1,25%) stwierdziłam w hodowli 577-BA poddanej działaniu meropenemu.



Rys. 18. Poziom bakterii przetrwałych po 24 h inkubacji z meropenemem (10xMIC) w pożywce bogatej (LB) i minimalnej (A) 72 h makrokolonie, (B) 72 h hodowla płynna, (C) 24 h hodowla płynna po stresie cieplnym (40°C), (D) 24 h hodowla płynna (37 °C). Dla przejrzystości wyników, na każdym z paneli zastosowano inną skalę na osi Y. 100% - CFU/ml przed dodaniem antybiotyku.

Inkubacja bakterii w pożywce minimalnej prawie całkowicie zahamowała powstawanie bakterii przetrwałych, niezależnie od tego czy bakterie hodowano w formie makrokolonii (Rys. 18A) czy poddawano stresowi cieplnemu (Rys. 18C). Ich poziom był średnio o dwa rzędy

wielkości niższy niż w pożywce bogatej. Na rysunku 18. przedstawione zostały wyniki dla wybranych szczepów poddanych działaniu meropenemu.

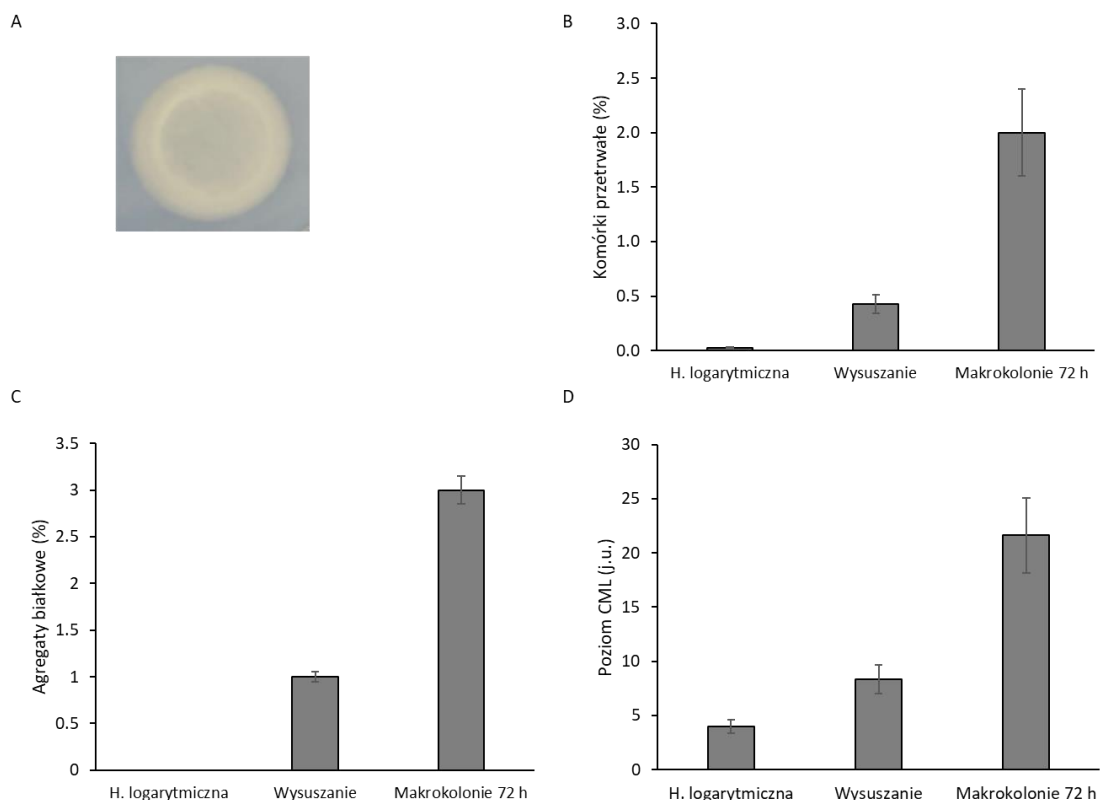


Rys. 19. Poziom bakterii przetrwałych w szczepach *K. pneumoniae* hodowanych w pożywce LB i SGM. (A) 72 h makrokolonie, (B) 72 h hodowla płynna, (C) 24 h hodowla po stresie cieplnym (40°C), (D) 24 h hodowla płynna (37°C). A – amikacyna, M- meropenem. Makrokolonie hodowano na podłożu LA, a następnie przenoszono do pożywki SGM w celu inkubacji z antybiotykiem (10×MIC, 24 h, 37°C), natomiast hodowle płynne (B-D) inkubowano w SGM od początku doświadczenia. Dla przejrzystości wyników, na panelu D zastosowano inną skalę na osi Y. 100% - CFU/ml przed dodaniem antybiotyku.

Zastosowanie SGM nie zwiększyło poziomu bakterii przetrwałych powstałych w makrokolonii w porównaniu ze standardową pożywką (Rys. 19A). Natomiast w przypadku hodowli po stresie cieplnym oraz w płynnych 24 i 72 h hodowlach, inkubacja w SGM powodowała, że bakterii przetrwałych było więcej w pożywce LB (Rys. 19B,C,D).

Podsumowując, najwięcej bakterii przetrwałych produkował szczep 577-BA rosnący w formie makrokolonii na pożywce LA (4,4% bakterii przetrwałych tolerujących amikacynę, Rys. 19A) lub hodowany w płynnej pożywce SGM po stresie cieplnym (4% bakterii tolerujących meropenem, Rys. 19C).

Makrokolonie okazały się środowiskiem, które szczególnie sprzyjało powstawaniu bakterii przetrwałych nie tylko u *K. pneumoniae*, ale również w przypadku *E. coli* (Rys. 20B).

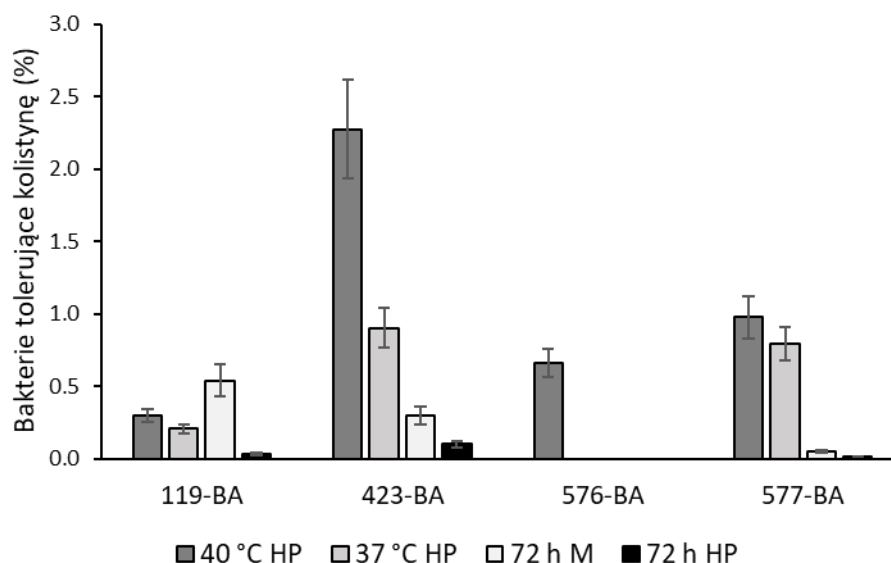


Rys. 20. Wpływ warunków hodowli na powstawanie bakterii przetrwałych, agregację i glikację białek *E. coli* MC4100. (A) Makrokolonie *E. coli*. (B) Poziom bakterii przetrwałych *E. coli* oznaczony po 7 godzinnej inkubacji z ofloksacyną (5 µg/ml). 100% - CFU/ml przed dodaniem antybiotyku. (C) Poziom agregatów białkowych oznaczony zgodnie z opisem w Materiałach i metodach (podpunkt 6.8.). 100% - całkowita ilość białka w ekstraktach bakteryjnych, (D) względny poziom CML w hodowlach *E. coli* w fazie logarytmicznego wzrostu (kontrola), po 4h wysuszania oraz w 72 h makrokoloniiach. Poziom CML oznaczono metodą immunodetekcji z użyciem przeciwciał anti-CML oraz pomiarów densytometrycznych (program ImageJ).

W makrokoloniiach *E. coli*, oprócz wyższego poziomu bakterii przetrwałych, zaobserwowałam więcej agregatów białek oraz CML w porównaniu z bakteriami poddanymi wysuszeniu (Rys. 20B, C, D). Spodziewałam się uzyskać podobne wyniki badając makrokolonie *K. pneumoniae* (rozdział 7.2.3.).

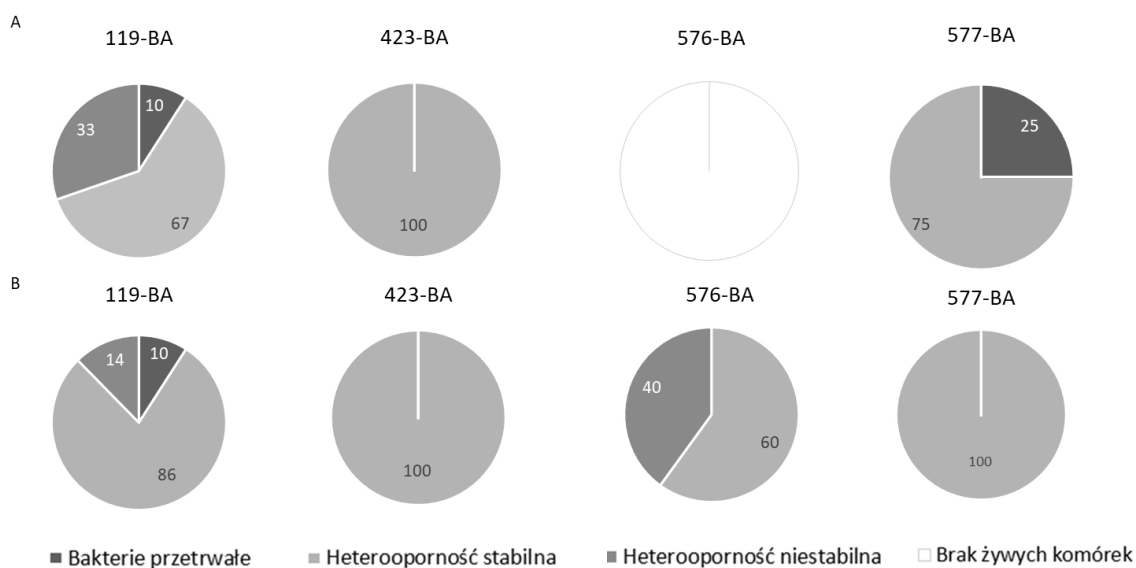
7.2.2. Szczepy *K. pneumoniae* produkują komórki heterooporne na kolistynę

Doświadczenia, w których oznaczano poziom bakterii przetrwałych *K. pneumoniae* tolerujących kolistynę dostarczyły dodatkowych interesujących wyników. Bakterie, które przetrwały inkubację z kolistyną (10×MIC) stanowiły do 2,3% wyjściowej hodowli (Rys. 21). W większości testowanych szczepów więcej bakterii przeżywało w próbach po szoku cieplnym.



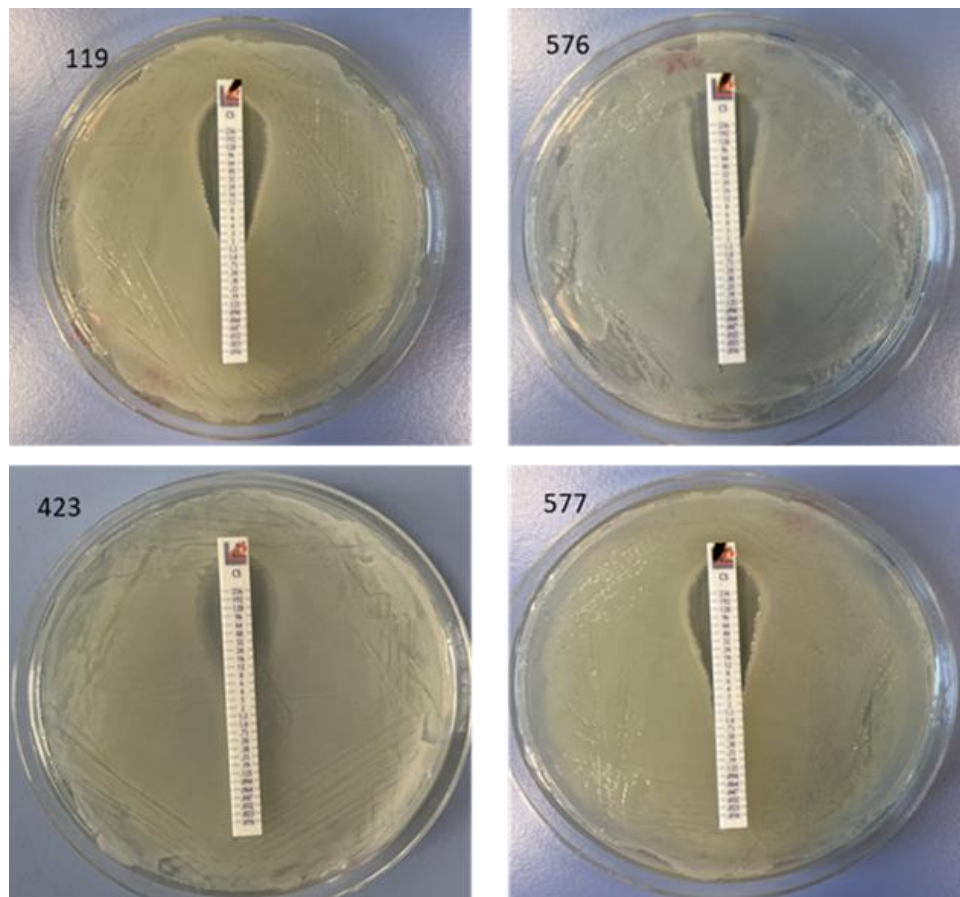
Rys. 21. **Poziom bakterii tolerujących kolistynę u *K. pneumoniae* w 24 h hodowli płynnej po stresie cieplnym (40°C), w płynnej 24 h hodowli kontrolnej (37°C), w 72 h makrokolonjach (72 h M) oraz w płynnej 72 h hodowli stacjonarnej (72 H HP) po inkubacji z kolistyną.**

Podobnie jak w przypadku doświadczeń z użyciem innych antybiotyków (Rys. 17-19), bakterie przenosiłam na płytki z z kolistyną, aby potwierdzić, że są to komórki przetrwałe, a nie odporne na kolistynę mutanty. Po inkubacji płytek w 37°C z większości wysianych bakterii powstały kolonie, co świadczyło o ich oporności na kolistynę. Jednak w trakcie kolejnych pasaży część bakterii traciła oporność na testowany antybiotyk. Wyniki te wskazywały na występowanie w badanych hodowlach heterooporności. Pojawianie się subpopulacji *K. pneumoniae* heteroopornych na kolistynę jest zjawiskiem coraz częściej opisywanym w literaturze (Band & Weiss, 2019; Sánchez-León et al., 2023; Stojowska-Swędryńska et al., 2022). Wyróżniono pojęcie heterooporności stabilnej (jeżeli fenotyp utrzymuje się przez co najmniej kilka pasaży) oraz heterooporności niestabilnej (gdy oporność na antybiotyk stopniowo zanika). Po kolejnych pasażach w szczepach 423-BA i 577-BA zaobserwowałam ciągły wzrost liczby bakterii, co mogło świadczyć o heterooporności stabilnej, natomiast w dwóch pozostałych izolatach (119-BA i 576-BA) część bakterii traciła z czasem nabytą oporność i stawała się ponownie wrażliwa na kolistynę (Rys. 22).

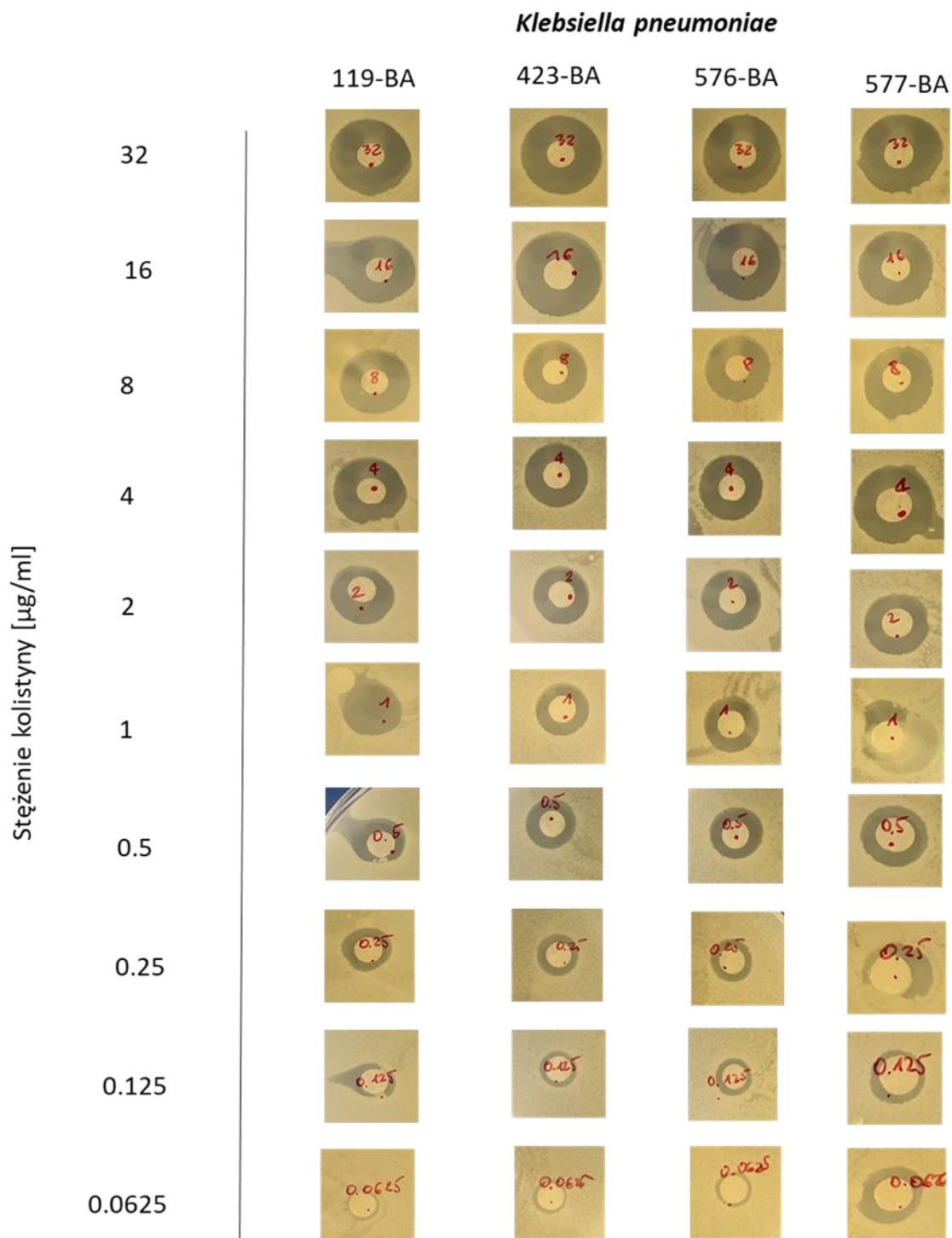


Rys. 22. Bakterie przetrwały i heterooporne izolowane ze szczepów klinicznych *K. pneumoniae* po działaniu kolistyny. Bakterie, które przetrwały inkubację z kolistyną w makrokoloniach (A) oraz po stresie cieplnym (B) pobrano i wysiano na podłoże LA z takim samym stężeniem antybiotyku. Płytki były inkubowane w 37 °C przez 24 h. Bakterie, które nie wykazywały wzrostu zakwalifikowano jako przetrwały. Te, które utworzyły kolonie były ponownie wysiewane na podłoże z kolistyną. Po 5 pasażach wykonano obliczenia, aby ustalić jaką część całej subpopulacji, która przetrwała działanie kolistyny na początku doświadczenia (100%), stanowią bakterie wykazujące heterooporność stabilną i niestabilną.

Aby potwierdzić, że analizowane szczepy wykazują heterooporność względem kolistyny wykonałam e-testy (testy paskowe) oraz testy dyfuzyjno – krążkowe, które są alternatywnymi metodami pozwalającymi na badanie heterooporności. Oznaką heterooporności jest pojawienie się pojedynczych kolonii w strefie zahamowania wzrostu. W obu przypadkach wynik nie wskazywał jednoznacznie na występowanie bakterii heteropornych w badanych izolatach klinicznych (Rys. 23, 24). W przypadku testów paskowych i dyfuzyjno-krążkowych strefy zahamowania wzrostu nie zawsze miały wyraźne granice, jednak w ich obrębie nie zauważyłam pojedynczych kolonii.

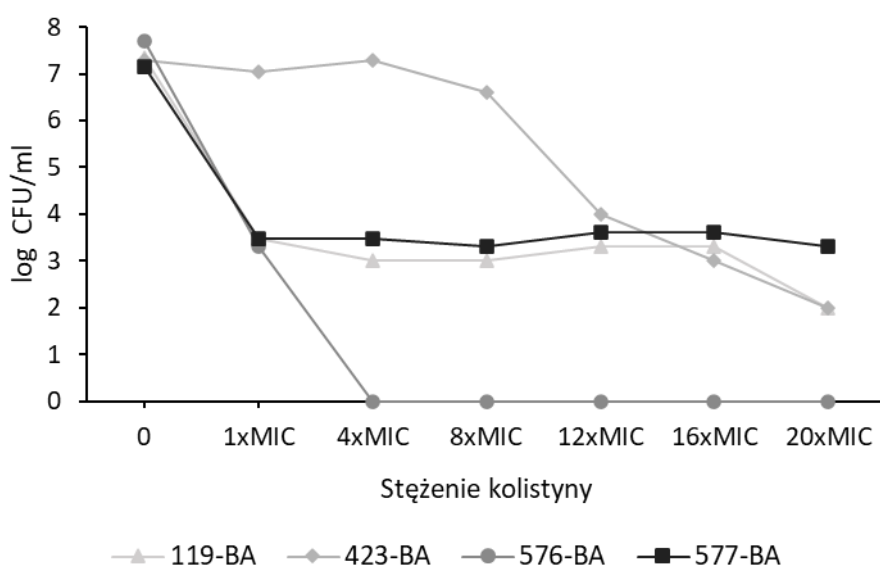


Rys. 23. **E-testy.** Na płytkę LA z wysianymi bakteriami w formie murawy nanoszono paski z gradientem stężenia kolistyny (Liofilchem, nr kat. 92141). Płytki inkubowano w 37°C przez 16 h.



Rys. 24. **Test dyfuzyjno-krążkowy.** Na płytki LA z naniesionymi bakteriami nałożono krążki z różnym stężeniem kolistyny (0,0625 - 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Płytki inkubowano w 37°C przez 16 h.

W celu potwierdzenia, że wybrane izolaty wykazują heterooporność na kolistynę wykonałam również test PAP (ang. *Population Analysis Profiling*), który jest powszechną techniką pozwalającą na ilościowe określenie częstości występowania komórek bakteryjnych, które przeżywają inkubację w obecności rosnącego stężenia antybiotyku. Zgodnie z przyjętymi zasadami, jako heterooporne można zaklasyfikować bakterie, które 1) przeżyły inkubację z antybiotykiem o stężeniu co najmniej ośmiokrotnie wyższym niż stężenie, które nie miało wpływu na wzrost wrażliwej subpopulacji, i 2) stanowiły od 10^{-7} do 50 % wyjściowej hodowli (Sherman et al., 2019). Spośród testowanych izolatów klinicznych 3 wykazywały wzrost podczas inkubacji z kolistyną w stężeniu $20\times$ MIC, natomiast szczep 576-BA nie tworzył kolonii już przy stężeniu $4\times$ MIC (Rys. 25). Zgodnie z literaturą zaklasyfikowałam szczep 576-BA jako wrażliwy na kolistynę, natomiast szczepy 119-BA, 577-BA oraz 423-BA jako heterooporne. Wyniki te są zbieżne z danymi przedstawionymi na Rys. 22.



Rys. 25. Test PAP wykonany w celu identyfikacji szczepów heteroopornych na kolistynę. Hodowlę nocną rozcieńczono do $OD_{595} = 0,1$, następnie wykonano seryjne rozcieńczenia w roztworze PBS i naniesiono po 10 μ l prób na wcześniej przygotowane płytki ze wzrastającymi stężeniami kolistyny (1 – $20\times$ MIC). Po 16 h inkubacji w 37 °C zliczano kolonie bakterii i wykonano analizy wg Shermana i wsp. (2019). 576-BA uznano jako wrażliwy na kolistynę, 119-BA, 577-BA 423-BA jako szczepy heterooporne.

Wyniki te nie były zaskakujące, ponieważ dane literaturowe sugerują, że metoda PAP jest najbardziej niezawodną metodą służącą do wykrywania heterooporności oraz zapewnia największą powtarzalność wyników. Natomiast testy paskowe oraz dyfuzyjno-krążkowe nie są metodami ilościowymi oraz charakteryzują się różną czułością, często mogą dawać fałszywie pozytywne lub fałszywie negatywne wyniki (Nicoloff et al., 2019; Seo et al., 2021).

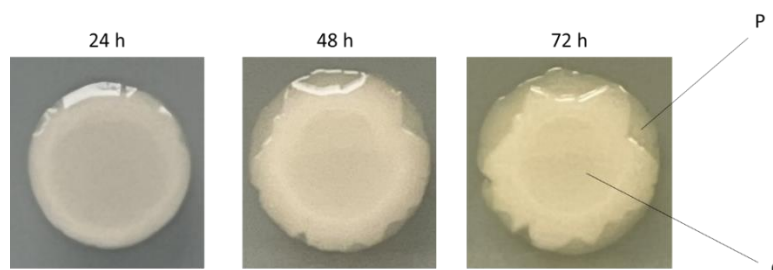
7.2.3. Próba izolacji agregatów białkowych z komórek *K. pneumoniae*

Mając do dyspozycji kilka izolatów klinicznych, które w zależności od warunków hodowli produkowały bakterie przetrwałe na różnym poziomie, podjęłam próbę izolacji agregatów białkowych. Spodziewałam się, że podobnie jak w komórkach *E. coli*, zwiększonej agregacji białek będzie towarzyszył podwyższony poziom bakterii przetrwałych.

Mimo wielokrotnych prób optymalizacji metody (Materiały i metody, podpunkt 6.9), nie udało mi się wyizolować agregatów białkowych z *K. pneumoniae*, chociaż było to skuteczne w przypadku *E. coli*. Przyczyną niepowodzenia może być otoczką *K. pneumoniae*, która zwiększa lepkość bakterii tym samym utrudniając lizę komórek i izolację agregatów. W związku z tym skupiłam się na innych aspektach związanych z bakteriami przetrwałymi i zróżnicowaniem makrokolonii *K. pneumoniae*.

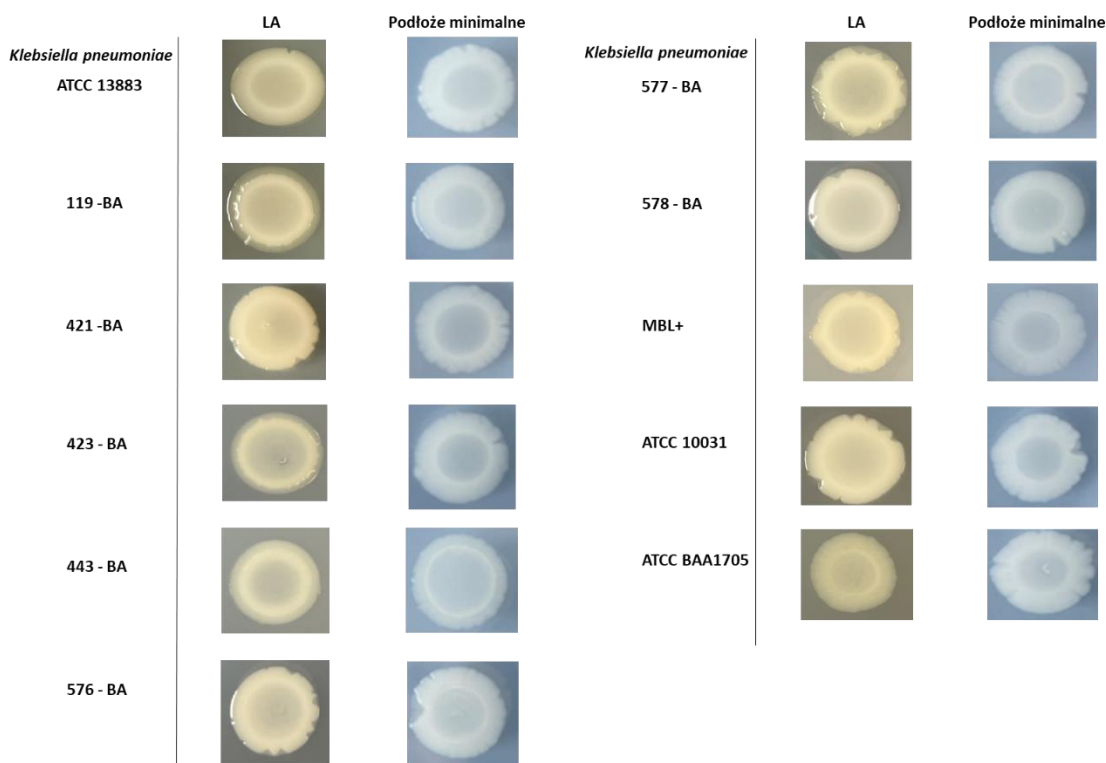
7.3. W makrokoloniiach *K. pneumoniae* można wyróżnić dwie subpopulacje: formę mukoidalną (centrum) i formę niemukoidalną (pierścień)

Oznaczając poziom bakterii przetrwałych w makrokoloniiach zwróciłam uwagę na ich zróżnicowaną strukturę. Makrokolonie poszczególnych szczepów *K. pneumoniae* różniły się od siebie pod względem morfologii, jednak u kilku z nich można było wyróżnić centrum (C, formę mukoidalną) oraz pierścień (P, formę niemukoidalną) (Rys. 26). Zdolność mukoidalnych form do tworzenia sektorów niemukoidalnych była zależna od czasu inkubacji. Przez pierwsze godziny inkubacji na podłożu bogatym makrokolonie miały jednorodny wygląd, dopiero po około 48 h widoczne były przezroczyste formy na obrzeżach, po 72 h różnice między centrum i pierścieniem były jeszcze bardziej wyraźne (Rys. 26) Makrokolonie badanych szczepów przedstawiłam na Rys. 27.



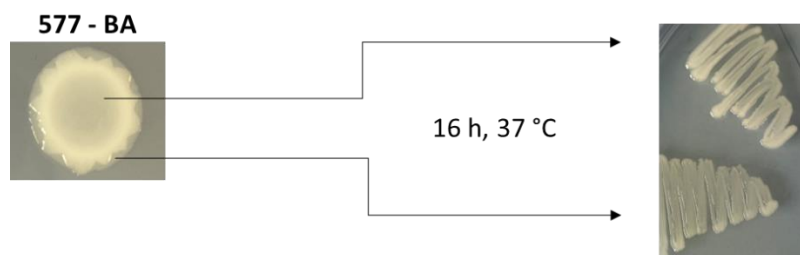
Rys. 26. **Zmiany morfologii makrokolonii szczepu 577-BA podczas inkubacji w 37°C.** C – centrum, P – pierścień.

Makrokolonie hodowane na podłożu minimalnym różniły się od swoich odpowiedników hodowanych na podłożu bogatym - miały mniej zaznaczony niemukoidalny pierścień.



Rys. 27. Morfologia 72 h makrokolonii *K. pneumoniae* inkubowanych w 37°C na LA oraz na podłożu minimalnym.

Bakterie pobrane z centrum i pierścienia po inkubacji w 37°C na świeżym podłożu utworzyły odpowiednio murawę mukoidalną i niemukoidalną, co oznaczało, że wykazywały stały fenotyp. Wiadomo, że pojawianie się form niemukoidalnych *K. pneumoniae* jest związane z utratą otoczki spowodowaną mutacjami punktowymi, insercjami, delecjami lub SNPs (Chiarelli et al., 2020; Nucci et al., 2023).



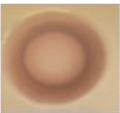
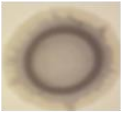
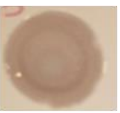





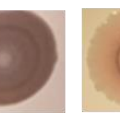



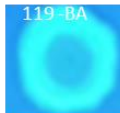





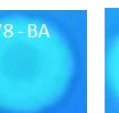
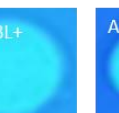

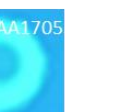
Rys. 28. Stałość fenotypu subpopulacji mukoidalnej (centrum) i niemukoidalnej (pierścień) *K. pneumoniae* na przykładzie szczepu 577-BA. Fragment makrokolonii z centrum i pierścienia przeniosłam na płytkę LA i inkubowałam w 37 °C przez 16 h.

7.3.1. Makrokolonie izolatów *K. pneumoniae* różnią się obecnością celulozy i fimbrii typu *curli*

Aby dokładniej zbadać morfotyp makrokolonii 10 µl hodowli nocnej *K. pneumoniae* nanosiłam na płytki LA bez NaCl uzupełnionych czerwienią Kongo (CR, 40 µg/ml) oraz Coomassie brilliant blue (20 µg/ml) lub kalkofluorem (40 µg/ml). Płytki inkubowałam w 37°C przez 72 h. CR i kalkofluor umożliwiają wykrycie fimbrii typu *curli* oraz celulozy. W przypadku hodowli na podłożu agarowym CR wiąże się do włókien amyloidowych, z których zbudowane są *curli*, przez co agar znajdujący się pod spodem zostaje pozbawiony barwnika. CR nie jest jednak barwnikiem specyficznym i może wiązać inne struktury pozakomórkowe, w tym celulozę (Reichhardt et al., 2015), która wraz z *curli* uczestniczy w formowaniu biofilmu. Obecność tego egzopolisacharydu w makrokolonii sprawdzałam dodatkowo przy użyciu kalkofluoru. Kalkofluor oddziałuje z wiązaniem β - 1,4 glikozydowym występującym w celulozie, emitując pod wpływem światła UV fluorescencję przy 366 nm (Wang et al., 2016). Różnice w intensywności fluorescencji świadczą o odmiennej zawartości celulozy w strukturach biofilmu (Anes et al., 2017; Bokranz et al., 2005).

Na podstawie zmiany barwy makrokolonii po związaniu CR i fluorescencji, oraz danych literaturowych (Anes et al., 2017; Bokranz et al., 2005) określiłam rodzaj morfotypu dla każdego z badanych szczepów. Uzyskane wyniki nie były jednoznaczne. U większości izolatów nie stwierdziłam obecności fimbrii typu *curli* (morfotyp SAW i PAS), pozostałych 4 spośród 11 testowanych szczepów miały zdolność do częściowego wiązania CR (morfotyp RAS i BAS) (Rys. 29). Ponadto, w sześciu testowanych szczepach widoczna była wyraźna fluorescencja kalkofluoru świadcząca o obecności celulozy (Rys. 29). Wynik ten potwierdza barwienie czerwienią Kongo, na podstawie którego morfotypy PAS i RAS charakteryzowały się obecnością tego egzopolisacharydu. Jedynie szczep 119-BA dawał niejednoznaczny wynik, ponieważ mimo uzyskania morfotypu SAW, w którym nie stwierdza się obecności *curli* ani celulozy, makrokolonie tego izolatu wykazywały fluorescencję.

Należy zaznaczyć, że Bokranz i wsp. (2005) i Anes i wsp. (2017) nie rozróżniali subpopulacji w makrokolonii i przypisywali szczepy do poszczególnych morfotypów głównie na podstawie wyglądu centralnej części makrokolonii. W przypadku badanych przeze mnie izolatów wyraźnie widać, że pierścień w makrokolonii 577-BA ma większą zdolność do wiązania CR, a fluorescencja kalkofluoru widoczna jest przede wszystkim w subpopulacji centrum. Wynik ten sugerował, że pierścień prawdopodobnie produkuje *curli*, a centrum makrokolonii celulozę.

<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883	119-BA	421-BA	423-BA	443-BA	576-BA	577-BA	578-BA	MBL+	ATCC 10031	ATCC BAA1705
Czerwień Kongo											
Morfotyp	PAS	SAW	SAW	SAW	BAS ?	BAS ?	SAW ?	PAS/RAS ?	PAS/RAS ?	PAS	PAS
Kalkofluor											

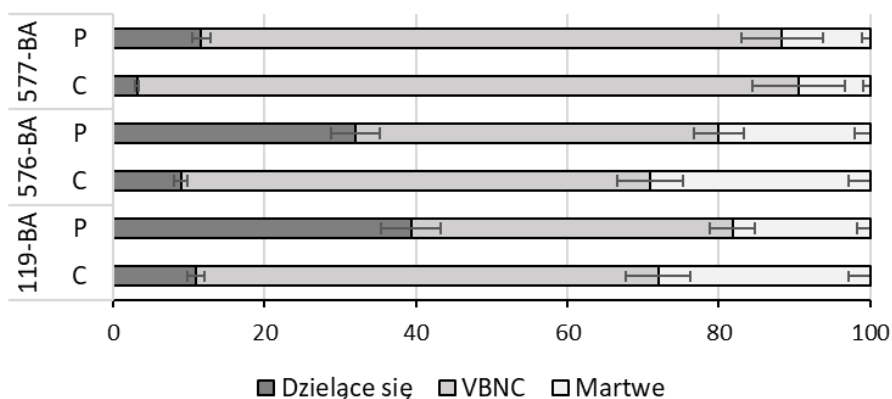
Rys. 29. Morfotypy 72 h makrokolonii *K. pneumoniae* na podstawie barwienia czerwieni Kongo i kalkofluorem.

PAS (pink and smooth) – celuloza⁺/curli⁻, SAW (smooth and white) – celuloza⁻/curli⁻, BAS (brown and smooth) – celuloza⁻/curli⁺, RAS (violet and smooth) – celuloza⁺/curli⁺. Identyfikacja morfotypów wg Anes et al., 2017; Bokranz et al., 2005.

7.3.2. Subpopulacje w makrokolonjach *K. pneumoniae* różnią się poziomem bakterii dzielących się, VBNC, heteroopornych oraz przetrwałych

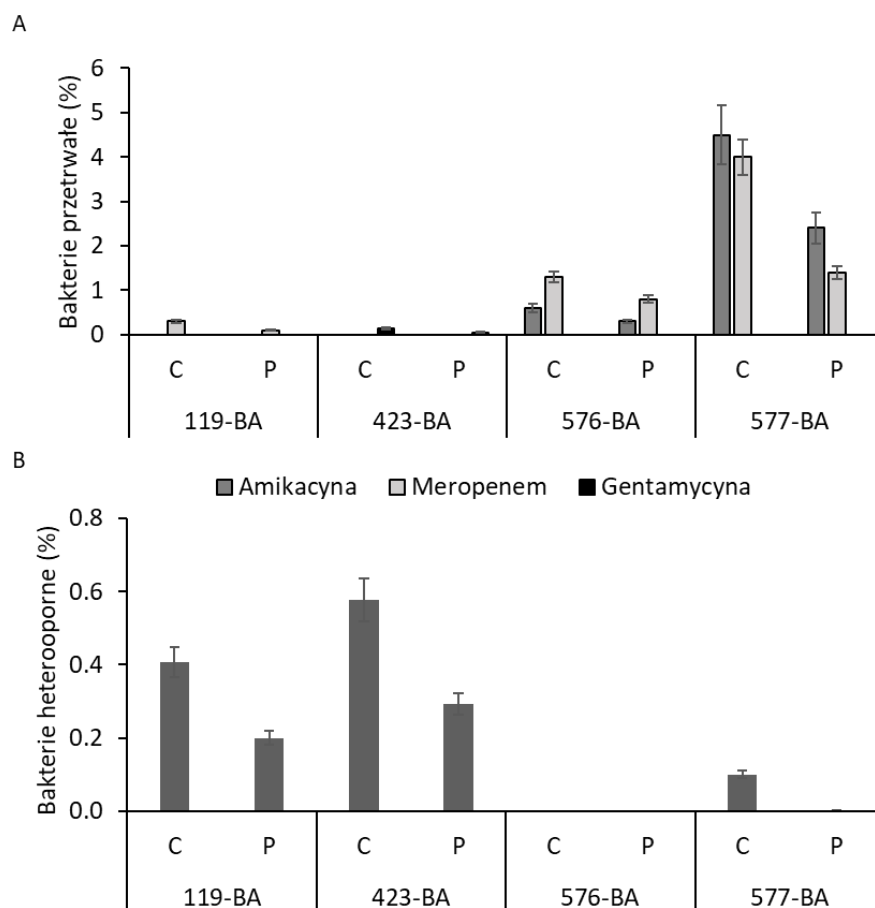
W kolejnym doświadczeniu chciałam sprawdzić czy formy mukoidalne (centrum) i niemukoidalne (pierścień) różnią się poziomem bakterii dzielących się, VBNC i martwych oraz wrażliwością na antybiotyki. Było to możliwe wyłącznie dla szczepów z wyraźnie zaznaczonymi subpopulacjami o odpowiednio dużej powierzchni umożliwiającej pobranie próby (119-BA, 576-BA i 577-BA).

W pierwszym kroku zastosowałam barwienie LIVE/DEAD i stwierdziłam, że bakterie VBNC stanowiły największą część w obu subpopulacjach, natomiast w pierścieniu znajdowało się trzykrotnie więcej komórek żywych zdolnych do podziału niż w części centralnej makrokolonii (Rys. 30). W szczepach 119-BA oraz 576-BA zawartość komórek martwych była wyższa w centrum niż w pierścieniu, natomiast w obu subpopulacjach 577-BA komórki martwe stanowiły porównywalną część całej hodowli.



Rys. 30. Zawartość procentowa komórek żywych zdolnych do podziału, martwych i VBNC w subpopulacjach makrokolonii. P-pierścień, C-centrum.

Stwierdziłam również, że w centrum makrokolonii liczba bakterii przetrwałych tolerujących amikacynę, meropenem lub gentamycynę była od 1,6 do 4 razy wyższa niż w pierścieniu (Rys. 31A). Podobnie, liczba komórek heteroopornych, które przeżyły działanie kolistyny (10×MIC) była ok. dwukrotnie wyższa w centrum niż w pierścieniu (Rys. 31B).

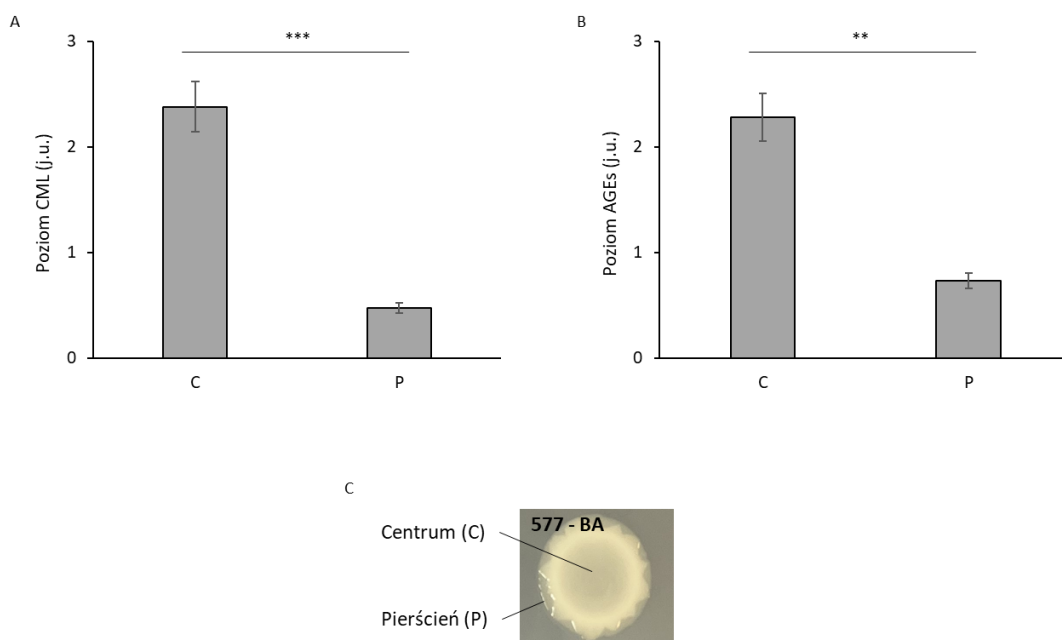


Rys. 31. **Poziom bakterii przetrwałych i heteroopornych w subpopulacjach makrokolonii.** (A) Poziom bakterii przetrwałych oznaczono po 7 godzinach inkubacji z antybiotykami ($10 \times \text{MIC}$). Szczepy 119-BA, 576-BA i 577-BA traktowano amikacyną i meropenemem. Szczep 423-BA, który jest oporny na oba te antybiotyki, poddano działaniu gentamycyny. (B) Poziom bakterii heteroopornych oznaczono po 7 godzinach inkubacji z kolistyną. Aby potwierdzić czy bakterie są heterooporne, kolonie były ponownie wysiewane na podłoże z kolistyną. C – centrum, P – pierścień. 100% - CFU/ml przed dodaniem antybiotyku.

7.3.3. Poziom glikowanych białek w subpopulacji C (centrum) jest wyższy niż w subpopulacji P (pierścień)

Do dalszych analiz wykorzystałam szczep *K. pneumoniae* 577-BA, który charakteryzował się najwyższym poziomem bakterii przetrwałych.

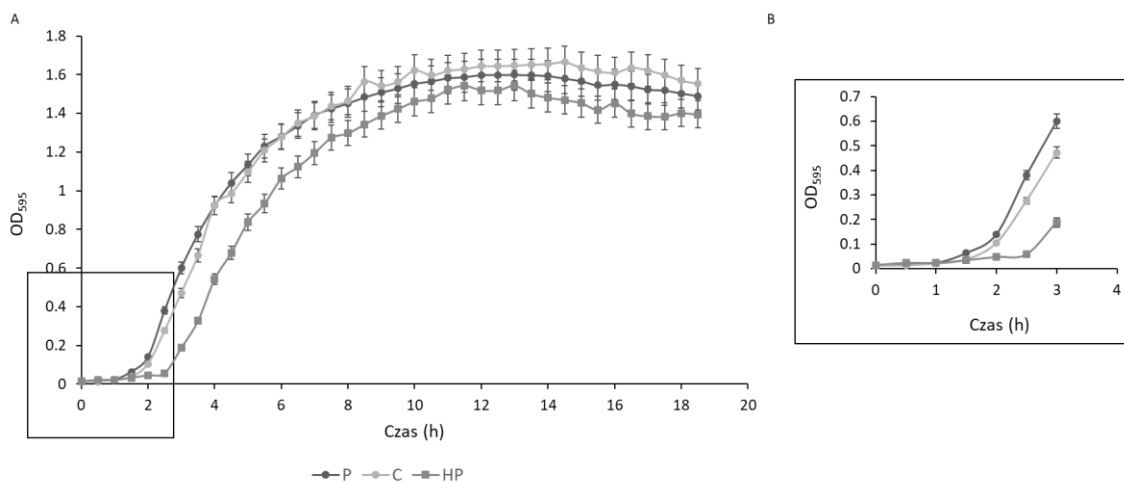
Doświadczenia z *E. coli* wykazały, że wysuszenie/rehydratacja (Rys. 13B,C) oraz wzrost w formie makrokolonii (Rys. 20D) indukują glikację białek. Ponieważ w pierścieniu *K. pneumoniae* 577-BA znajdowało się znacznie więcej żywych - dzielących się komórek niż w centrum, można było spodziewać się, że subpopulacje te różnią się również poziomem glikowanych białek. Rzeczywiście, poziom CML i produktów AGEs był odpowiednio 5-krotnie i 3-krotnie wyższy w centrum makrokolonii niż w pierścieniu (Rys. 32A,B).



Rys. 32. **Poziom glikowanych białek w centrum (C) i pierścieniu (P) *K. pneumoniae* 577-BA.** Białka rozdzielono w 12% żelu poliakrylamidowym i poddano immunodetekcji z udziałem przeciwciał anti-CML (B) i anti-AGEs (C) Poziom glikowanych białek oznaczono densytometrycznie (program ImageJ). (C) Morfologia makrokolonii *K. pneumoniae* 577-BA.

7.3.4. Bakterie pochodzące z subpopulacji centrum i pierścienia różnią się długością fazy lag w pożywce płynnej

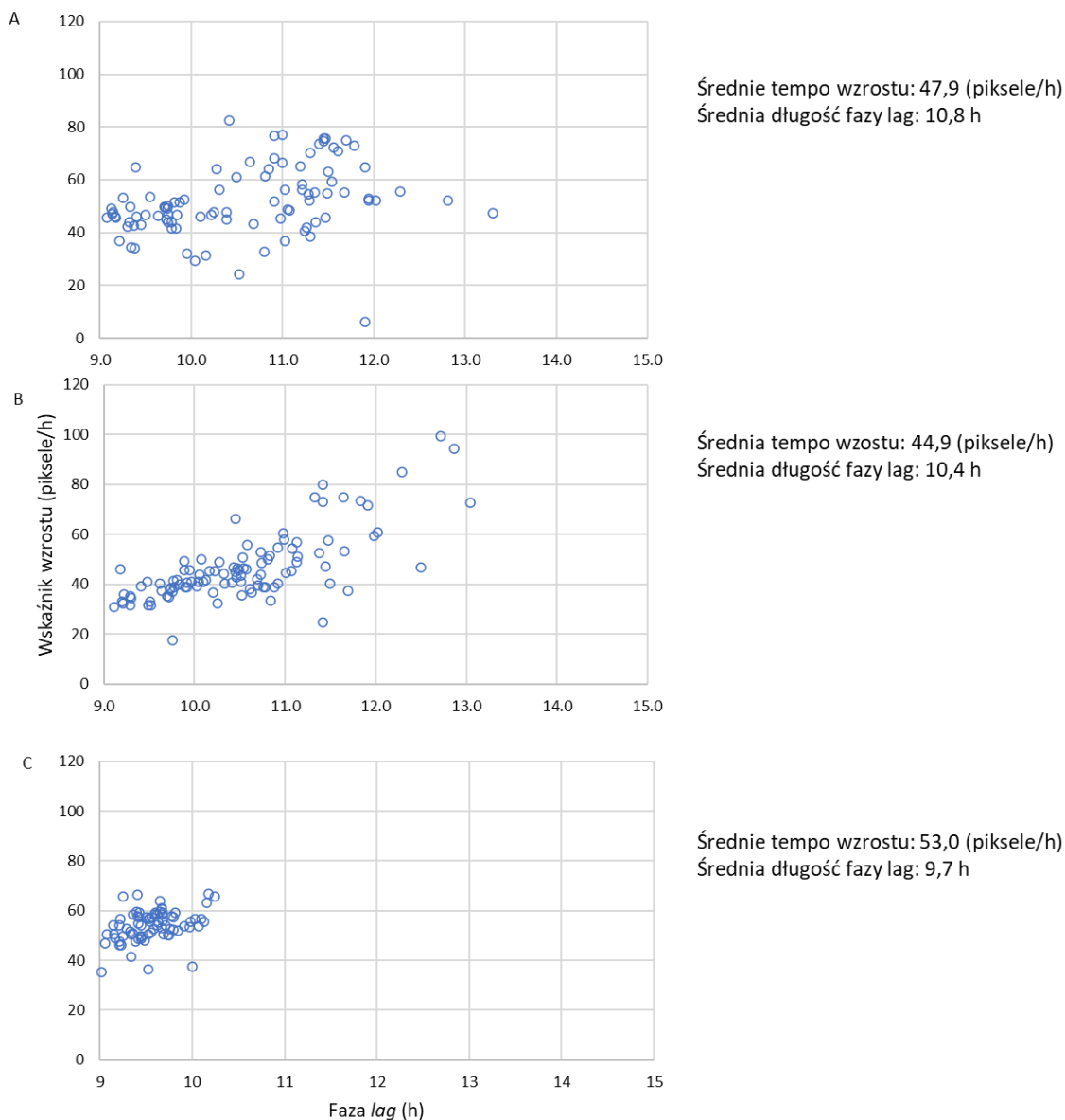
W związku z tym, że subpopulacje w makrokolonii różniły się między sobą wrażliwością na antybiotyki oraz poziomem glikowanych białek, postanowiłam sprawdzić czy może to wpływać na dalszy wzrost bakterii po przeniesieniu do świeżej pożywki. W tym celu pobrałam odpowiednią ilość bakterii z centrum oraz pierścienia makrokolonii i umieściłam w świeżej pożywce LB, tak by uzyskać zbliżone wartości wyjściowego OD_{595} . Jako kontrolę zastosowałam płynną 72 h hodowlę stacjonarną. Przypuszczałam, że skoro więcej glikowanych białek jest w centrum makrokolonii subpopulacja ta będzie charakteryzowała się dłuższą fazą lag i wolniejszym tempem wzrostu niż pierścień, który zawierał więcej dzielących się komórek. Subpopulacja centrum rzeczywiście wykazywała nieco dłuższą fazę lag (~1,5 h) w porównaniu z subpopulacją P (~1h) (Rys. 33B). Jednak po osiągnięciu fazy logarytmicznej tempo wzrostu obu subpopulacji było porównywalne. Co ciekawe, bakterie z kontrolnej hodowli płynnej charakteryzowały się najdłuższą fazą lag (Rys. 33).



Rys. 33. **Wzrost subpopulacji 577-BA w 37°C w pożywce płynnej LB.** HP – 72 h płynna hodowla stacjonarna, C – subpopulacja bakterii z centrum makrokolonii, P – subpopulacja bakterii z pierścienia makrokolonii. (B) Powiększenie części wykresu A.

7.3.5. Subpopulacje centrum i pierścień charakteryzują się porównywalną długością fazy lag i tempem wzrostu na podłożu stałym

Dodatkowo postanowiłam sprawdzić czy bakterie pochodzące z różnych subpopulacji różnią się długością fazy lag i tempem wzrostu na podłożu stałym. W tym celu przygotowywałam i analizowałam próby pochodzące z centrum, pierścienia oraz hodowli płynnej zgodnie z opisem w Materiałach i metodach (6.11). Mimo, że średnia długość fazy lag subpopulacji centrum (10,8 h) była nieco dłuższa w porównaniu z pierścieniem (10,4 h) (Rys. 34A, B), różnica ta nie była istotna statystycznie. Analiza jednoczynnikowa ANOVA (z testem *post-hoc* z korektą Bonferroniego) wykazała, że długość fazy lag oraz tempo wzrostu było porównywalne w obu subpopulacjach. Bakterie z pierścienia makrokolonii stanowiły najbardziej heterogenną subpopulację zawierającą półprzezroczyste kolonie o znacząco zróżnicowanym tempie wzrostu (od ~18 do 100 pikseli/h). Co ciekawe, bakterie z hodowli stacjonarnej, które rosły bardzo wolno w pożywce płynnej (Rys. 33), w tym doświadczeniu, na podłożu stałym, wykazywały szybsze tempo wzrostu w porównaniu z subpopulacjami centrum i pierścienia ($p < 0.05$) (Rys. 34C). Dodatkowe analizy statystyczne wykazały, że w obu subpopulacjach istnieje umiarkowana pozytywna korelacja pomiędzy długością fazy lag a tempem wzrostu kolonii (współczynnik Spearmana ρ 0.48 dla C i 0.74 dla P). Im dłużej trwała faza lag tym szybszy był wzrost kolonii. W hodowli płynnej ta korelacja była bardzo słaba ($\rho = 0.2$).



Rys. 34. Długość fazy lag i tempo wzrostu kolonii *K. pneumoniae* 577-BA pochodzących z (A) centrum makrokolonii, (B) pierścienia makrokolonii oraz (C) 72 h hodowli płynnej.

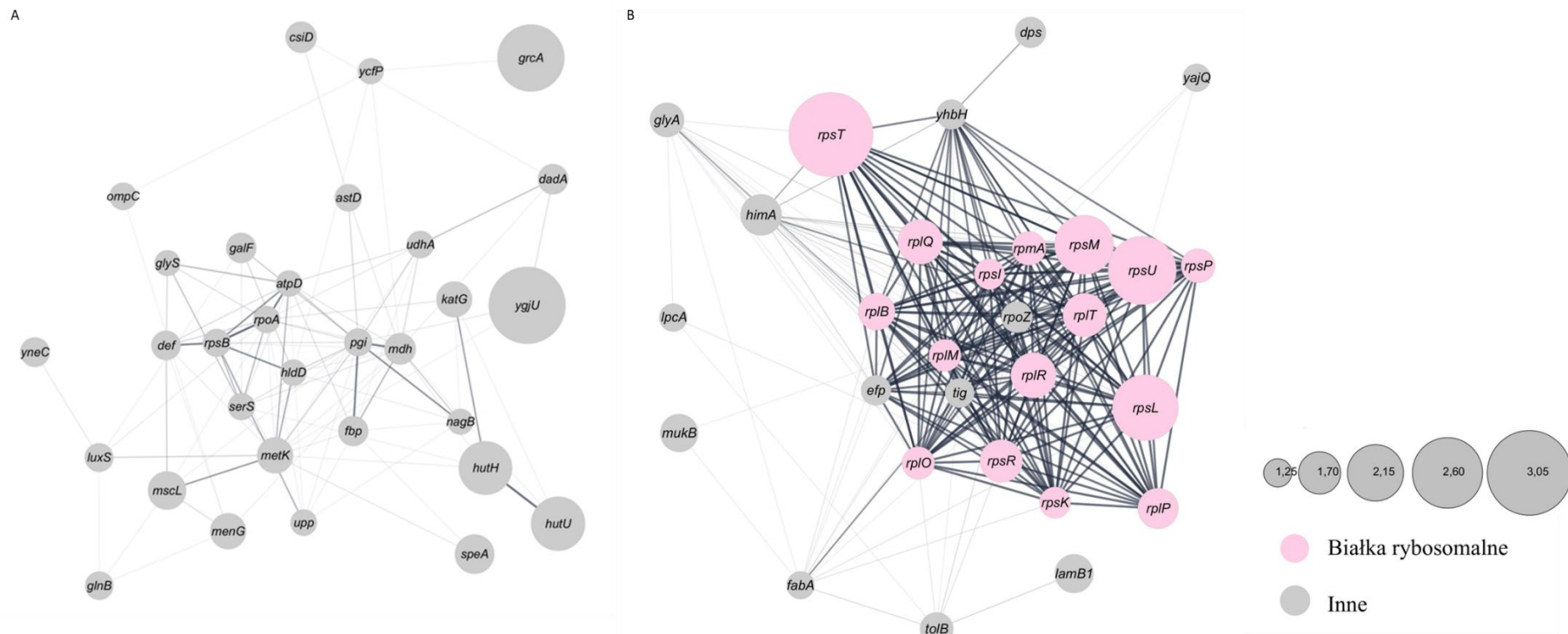
Podsumowując wyniki przedstawione w punktach 7.3.4. i 7.3.5 można stwierdzić, że mimo różnic w poziomie żywych, martwych i przetrwałych komórek oraz w poziomie glikowanych białek obie subpopulacje makrokolonii zachowywały się podobnie po przeniesieniu do świeżej pożywki płynnej lub na podłoże stałe. Pozytywną korelację pomiędzy długością fazy lag a tempem wzrostu można wytłumaczyć różnymi procesami naprawczymi, które zachodzą w komórce przed pierwszym podziałem. Prawdopodobnie dłuższa faza lag umożliwia bardziej skuteczne usunięcie z komórki nagromadzonych w trakcie rozwoju makrokolonii uszkodzeń, np. glikowanych

i zagregowanych białek. Gdy podział nastąpi zbyt szybko, potomne komórki dziedziczą część tych uszkodzeń – ich usunięcie spowalnia wzrost i kolejne podziały bakterii.

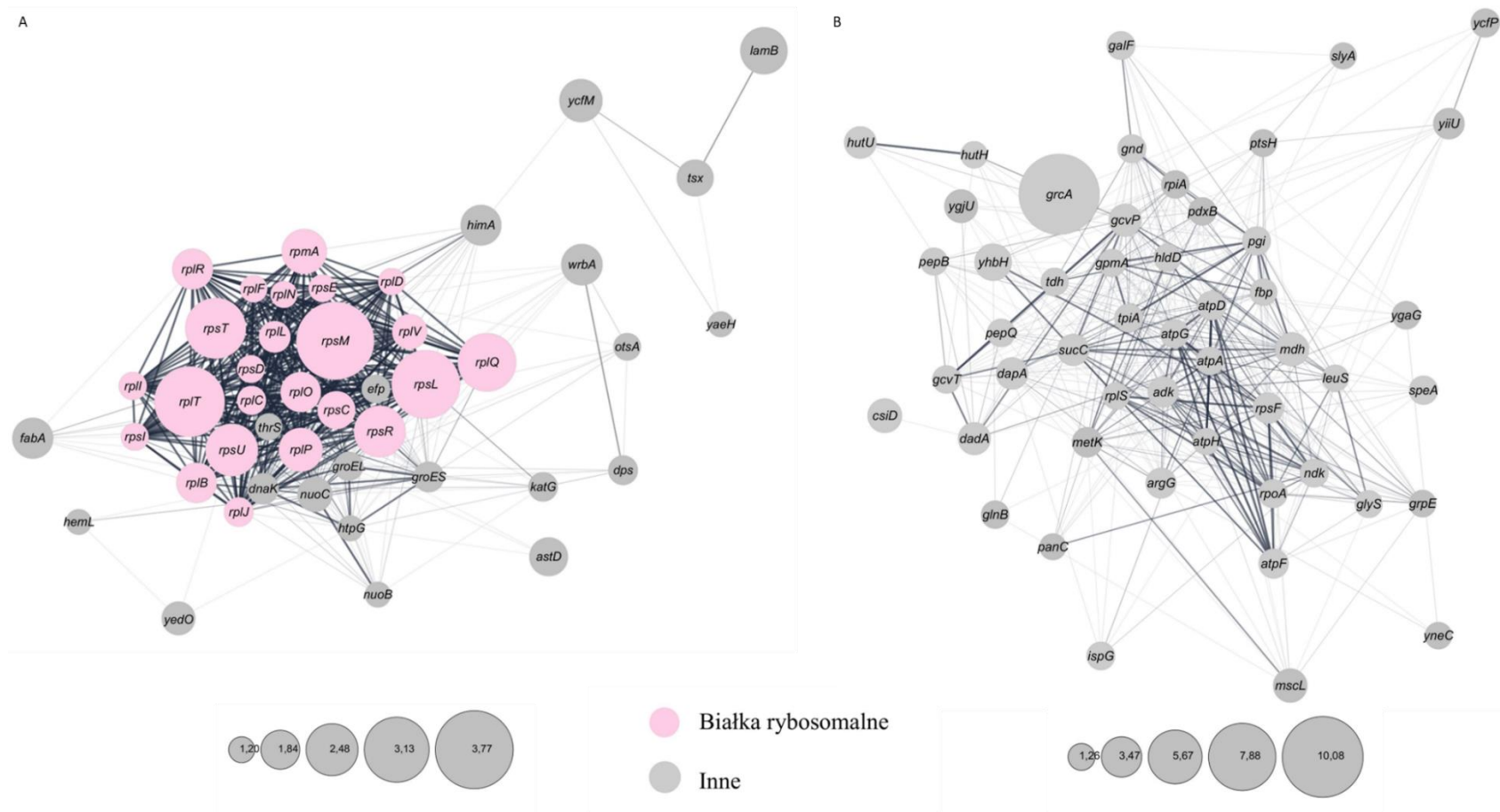
7.3.6. Subpopulacje centrum i pierścienia różnią się profilem białkowym

Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że środowisko makrokolonii 577-BA sprzyjało powstawaniu bakterii przetrwałych i heteroopornych bardziej niż faza stacjonarna. Ponadto, w porównaniu z pierścieniem, centrum makrokolonii charakteryzowało się produkcją celulozy (Rys. 29) oraz zwiększonym poziomem bakterii przetrwałych i heteropornych (Rys. 31). Aby wyjaśnić przynajmniej częściowo molekularne podłoże tych różnic, zostały porównane proteomy bakterii pochodzących z subpopulacji makrokolonii oraz hodowli płynnej. Identyfikację i porównanie poziomu białek w badanych próbach wykonano za pomocą spektrometrii mas i analizy SWATH w Zespole Laboratoriów Specjalistycznych Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed. Tabele 3-8 oraz rysunki 35-37 przedstawiają podsumowanie uzyskanych wyników. Najbardziej wyraźne różnice dotyczyły:

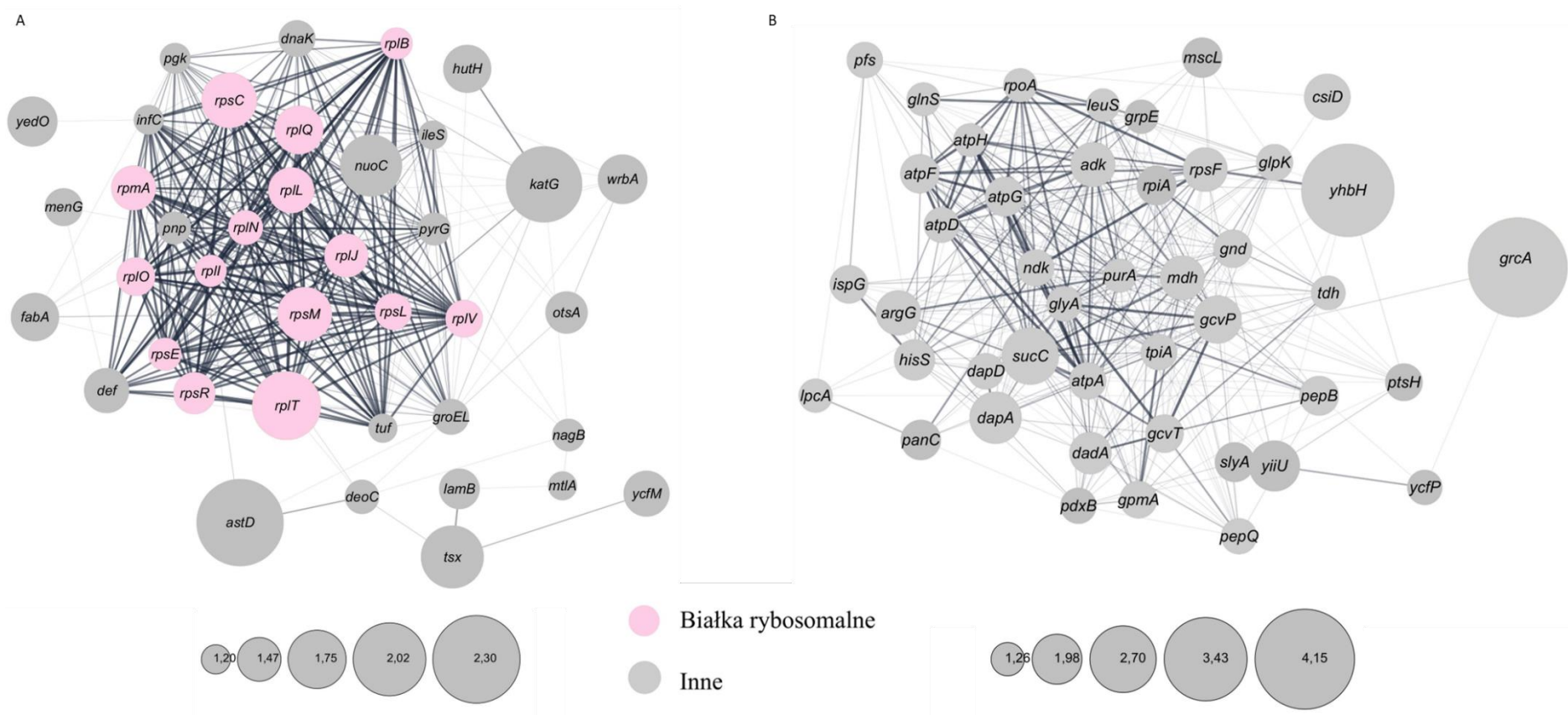
1. białek rybosomalnych, których poziom był wyższy w pierścieniu w porównaniu z centrum, oraz w hodowli płynnej w porównaniu z subpopulacjami makrokolonii;
2. czynnika promującego hibernację rybosomów YhbH/Hpf; jego poziom był wyższy w centrum w stosunku do pierścienia i hodowli płynnej;
3. białka GrcA (YfiD, ang. *autonomous glycyI radical cofactor*), którego poziom był 10-krotnie wyższy w centrum niż w hodowli płynnej oraz 4-krotnie wyższy w pierścieniu w porównaniu z hodowlą płynną.



Rys. 35. **Różnice w poziomie białek występujących w subpopulacjach centrum i pierścienia.** Do przedstawienia powiązań między białkami oraz krotności zmiany ich poziomu (fold change) wykorzystałam program String v: 12.0 oraz Cytoscape_v3.10.1. (A) Białka charakteryzujące się wyższym poziomem w centrum niż w pierścieniu. (B) Białka, których poziom jest wyższy w pierścieniu niż centrum.



Rys. 36. **Różnice w poziomie białek występujących w subpopulacji centrum i hodowli płynnej**. Do przedstawienia powiązań między białkami oraz krotności zmiany ich poziomu (fold change) wykorzystano program String v: 12.0 oraz Cytoscape_v3.10.1. (A) Białka charakteryzujące się wyższym poziomem w hodowli płynnej niż w centrum. (B) Białka, których poziom jest wyższy w centrum niż w hodowli płynnej.



Rys. 37. Różnice w poziomie białek występujących w hodowli płynnej i subpopulacji pierścienia. Do przedstawienia powiązań między białkami oraz krotności zmiany ich poziomu (fold change) wykorzystano program String v: 12.0 oraz Cytoscape_v3.10.1. (A) Białka charakteryzujące się wyższym poziomem w hodowli płynnej niż w pierścieniu. (B) Białka, których poziom jest wyższy w pierścieniu niż w hodowli płynnej.

Istnieją doniesienia wskazujące, że zarówno niski poziom białek rybosomalnych (Bruhn-Olszewska et al., 2018) oraz wyższy poziom czynnika promującego hibernację rybosomów (Song & Wood, 2020) są odpowiedzialne za powstawanie bakterii przetrwałych oraz VBNC. Z kolei, wiadomo, że białko GrcA jest zaangażowane w ochronę komórek przed stresem oksydacyjnym (Wagner et al., 2001). Wyrażna nadprodukcja tego białka w subpopulacjach centrum i pierścienia, może sugerować, że starzejące się komórki makrokolonii mogą być szczególnie narażone na stres oksydacyjny oraz, że GrcA jest jednym z głównych mechanizmów chroniących makrokolonie przed stresem oksydacyjnym. Szczegółową analizę wyników uzyskanych w tej części pracy przedstawiono w rozdziale Dyskusja.

Tab. 3. Zmiany poziomu białka w subpopulacji centrum (C) w stosunku do pierścienia (P). * Krotność zmiany (fold change) poziomu białka w C w stosunku do P.

Gen	Zmiany poziomu białka* w C w stosunku do P	nr Uniprot dla Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae (strain ATCC 700721/ MGH 78578)	Funkcja
<i>sstT</i>	2.73	A6TEC8	Symporter treoniny/seryny i Na ⁺ .
<i>grcA</i>	2.43	A6TCJ1	Enzym z resztą glicyny Gly102 w formie rodnika, przywracający aktywność liazy pirogronian-mrówczan.
<i>hutU</i>	2.04	A6T6L0	Bierze udział w metabolizmie histydyny, katalizuje przekształcenie urokiananu do 4-imidazolono-5-propionianu.
<i>hutH</i>	2.03	A6T6L1	Bierze udział w metabolizmie histydyny, przekształca histydyne do urokiananu i mocznika.
<i>speA</i>	1.61	A6TDV0	Katalizuje biosyntezę agmatyny z argininy.
<i>mscL</i>	1.58	A6TEU4	Kanał mechanoczuły reagujący na naprężenia w dwuwarstwie lipidowej; uczestniczy w regulacji ciśnienia osmotycznego w komórce
<i>metK</i>	1.52	A6TDV1	Katalizuje powstawanie S-adenozylometioniny z metioniny i ATP.
<i>rraA</i>	1.52	A6TGB9	Wpływa na całkowity poziom RNA poprzez regulację aktywności endonukleolitycznej Rnazy E.
<i>katG</i>	1.51	A6T9H9	Enzym dwufunkcyjny katalaza-peroksydaza.
<i>mdh</i>	1.37	A6TEQ3	Bierze udział w cyklu kwasu cytrynowego: katalizuje odwracalną reakcję utleniania jabłczanu do szczawiooctanu.
<i>glaH</i>	1.36	A6T540	Dioksygenaza zależna od alfa-ketoglutaranu, katalizuje hydroksylację glutaranu do L-2 hydroksyglutaranu.
<i>dadA</i>	1.34	A6TAW4	Bierze udział w oksydacyjnej deaminacji D-aminokwasów.
<i>galF</i>	1.33	A6TBG2	Katalizuje reakcję przekształcającą UTP i glukozy-1-fosforan w UDP-glukozę.
<i>fbp</i>	1.33	A6THE3	Bierze udział w glukoneogenezie, katalizuje usuwanie 1-fosforanu z fruktozo-1,6-bis-fosforanu z wytworzeniem fruktozo-6-fosforanu.
<i>lsrG</i>	1.32	A6TEB3	Bierze udział w degradacji cząsteczki autoinduktora AI-2 wytwarzanej podczas <i>quorum-sensing</i> .
<i>def</i>	1.31	A6TEU0	Deformylaza peptydowa. Usuwa grupę formylową z N-końcowej reszty metioniny nowo-syntetyzowanego białka.
<i>luxS</i>	1.30	A6TCV3	Bierze udział w syntezie autoinduktora 2 (AI-2), który jest wydzielany przez bakterie podczas <i>quorum sensing</i> .
<i>glnB</i>	1.29	A6TCG7	Bierze udział w regulacji wiązania azotu.
<i>rpsB</i>	1.26	A6T4X1	Białko rybosomalne S2
<i>pgi</i>	1.26	A6TGT4	Katalizuje odwracalną izomeryzację glukozy-6-fosforanu do fruktozy-6-fosforanu.
<i>sthA</i>	1.26	A6TGE6	Przekształca NADPH wytwarzany przez szlaki kataboliczne do NADH, który może brać udział w łańcuchu oddechowym.
<i>ompC</i>	1.26	A6TBT2	Poryna. Umożliwia pasywną dyfuzję małych cząsteczek przez błonę zewnętrzną.
<i>astD</i>	1.25	A6T7T5	Dehydrogenaza semialdehydu sukcyloglutaminianu, uczestniczy w metabolizmie argininy.
<i>serS</i>	1.24	A6T6Z0	Ligaza serylo-tRNA.
<i>rpoA</i>	1.24	A6TEU8	Podjednostka α polimerazy RNA.
<i>upp</i>	1.22	A6TCB0	Katalizuje przekształcenie uracylu i 5-fosfo- α -D-rybozy-1-difosforanu do UMP i difosforanu.
<i>ycfP</i>	1.22	A6T7G7	Funkcja nieznana.
<i>hldD</i>	1.21	A6TFL4	Katalizuje wzajemną konwersję pomiędzy ADP-D-glicero-beta-D-mannoheptozą i ADP-L-glicero-beta-D-mannoheptozą.
<i>atpD</i>	1.21	A6TG36	Podjednostka β syntazy ATP.
<i>nagB</i>	1.20	A6T6C1	Katalizuje odwracalną izomeryzację-deaminację 6-fosforanu glukozaminy z wytworzeniem 6-fosforanu fruktozy i jonu amonowego.
<i>glyS</i>	1.20	A6TFH4	Podjednostka β syntazy glicylo-tRNA.

Tab. 4. Zmiany poziomu białka w subpopulacji pierścienia (P) w stosunku do centrum (C). * Krotność zmiany (fold change) poziomu białka w P w stosunku do C.

Gen	Zmiany poziomu białka* w P w stosunku do C	nr Uniprot dla Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae (strain ATCC 700721 / MGH 78578)	Funkcja
<i>rpsT</i>	3.05	A6T4F8	Białko rybosomalne S20
<i>rpsU</i>	2.54	A6TE47	Białko rybosomalne S21
<i>rpsL</i>	2.46	A6TEY0	Białko rybosomalne S12
<i>rpsM</i>	2.25	A6TEV1	Białko rybosomalne S13
<i>rplR</i>	1.80	A6TEV6	Białko rybosomalne L18
<i>rplQ</i>	1.79	A6TEU7	Białko rybosomalne L17
<i>rplT</i>	1.75	A6TAI4	Białko rybosomalne L20
<i>rpsR</i>	1.72	A6THB3	Białko rybosomalne S18
<i>ihfA</i>	1.68	A6TAI1	<i>Integration Host Factor</i> , podjednostka α . Wiąże DNA, uczestniczy w rekombinacji oraz kontroli transkrypcji i translacji.
<i>rplP</i>	1.65	A6TEW5	Białko rybosomalne L16
<i>lamB</i>	1.60	A6T5L4	W formie trimeru tworzy pory w błonie zewnętrznej umożliwiając u <i>E. coli</i> dyfuzję maltodekstryny i innych cząsteczek hydrofilowych. Receptor faga λ .
<i>mukB</i>	1.58	A6T716	Odgrywa kluczową rolę w kondensacji i segregacji chromosomów podczas cyklu komórkowego. Działa jako homodimer, który jest niezbędny do podziału chromosomów.
<i>rplB</i>	1.53	A6TEW9	Białko rybosomalne L2
<i>glyA</i>	1.46	A6TCG5	Katalizuje odwracalną reakcję przekształcenia seryny w glicynę z udziałem tetrahydrofolianu, jako przenośnika grup jednowęglowej.
<i>rpsP</i>	1.44	A6TCL7	Białko rybosomalne S16
<i>rpmA</i>	1.44	A6TEK4	Białko rybosomalne L27
<i>tolB</i>	1.43	A6T6G6	Składnik systemu Tol/Pal, który uczestniczy w podziałach komórkowych i odpowiada za integralność zewnętrznej błony komórkowej.
<i>rplO</i>	1.39	A6TEV3	Białko rybosomalne L15
<i>rplM</i>	1.38	A6TEN9	Białko rybosomalne L13
<i>rpsK</i>	1.35	A6TEV0	Białko rybosomalne S11
<i>rpaZ</i>	1.35	A6TFP8	Podjednostka ω polimerazy RNA.
<i>dps</i>	1.35	A6T6Q6	<i>DNA protection during starvation protein</i> . Tworzy kompleksy z DNA, wiąże jony Fe^{2+} zapobiegając reakcji Fentona i chroniąc komórki przed stresem oksydacyjnym.
<i>rpsI</i>	1.33	A6TEN8	Białko rybosomalne S9
<i>efp</i>	1.32	A6TH65	Czynnik elongacyjny P. Uczestniczy w syntezie wiązań peptydowych.
<i>hpf (yhbh)</i>	1.32	A6TEM2	Bierze udział w hibernacji rybosomów.
<i>tig</i>	1.29	A6T5H9	<i>Trigger factor</i> . Białko opiekuńcze, chroni nowo-syntetyzowane łańcuchy polipeptydowe przed nieprawidłowym zwijaniem.
<i>gmhA</i>	1.26	A6T518	Katalizuje izomeryzację sedoheptulozo-7-fosforanu do D-glicero-D-mannoheptozo 7-fosforanu.
<i>yajQ</i>	1.26	A6T5G0	Homologiczne białko u <i>E. coli</i> wiąże nukleotydy.
<i>fabA</i>	1.25	A6T748	Dehydrataza 3-hydroksydekanoilo-ACP (<i>acyl carrier protein</i>), uczestniczy w biosyntezie kwasów tłuszczowych.

Tab. 5. Zmiany poziomu białka w hodowli płynnej (HP) w stosunku do subpopulacji pierścienia (P). * Krotność zmiany (fold change) poziomu białka w HP w stosunku do P.

Gen	Zmiany poziomu białka* w HP w stosunku do P	nr Uniprot dla <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> (strain ATCC 700721 / MGH 78578)	Funkcja
<i>astD</i>	2.30	A6T7T5	Dehydrogenaza semialdehydu sukcynglutaminianu, uczestniczy w metabolizmie argininy.
<i>katG</i>	2.09	A6T9H9	Enzym dwufunkcyjny katalaza-peroksydaza.
<i>rplT</i>	1.95	A6TAI4	Białko rybosomalne L20
<i>tsx</i>	1.84	A6T5E4	Kanał w błonie zewnętrznej transportujący do komórki nukleotydy oraz antybiotyk albicydynę – inhibitor gyrazy.
<i>nuoC</i>	1.82	A6TBX2	Podjednostka C/D oksydoreduktazy NADH-ubichinon, składnik łańcucha transportu elektronów.
<i>rpsC</i>	1.69	A6TEW6	Białko rybosomalne S3
<i>rpsM</i>	1.68	A6TEV1	Białko rybosomalne S13
<i>dcyD</i>	1.60	A6TB69	Desulfhydraza D-cysteiny
<i>wrbA</i>	1.59	A6T793	Oksydoreduktaza NAD(P)H : chinon.
<i>rplQ</i>	1.57	A6TEU7	Białko rybosomalne L17
<i>fabA</i>	1.56	A6T748	Dehydrataza 3-hydroksydekanoilo-ACP (<i>acyl carrier protein</i>), uczestniczy w biosyntezie kwasów tłuszczowych.
<i>hutH</i>	1.56	A6T6L1	Bierze udział w metabolizmie histydyny, przekształca histydynę do urokanianu i mocznika .
<i>lpoB</i>	1.52	A6T7G4	Regulator syntezy peptydoglikanu. Niezbędny dla funkcjonowania białka wiążącego penicylinę 1B (PBP1b).
<i>rplL</i>	1.51	A6TGN9	Białko rybosomalne L12
<i>def</i>	1.50	A6TEU0	Deformylaza peptydowa. Usuwa grupę formylową z N-końcowej reszty metioniny nowo-syntetyzowanego białka.
<i>rpmA</i>	1.49	A6TEK4	Białko rybosomalne L27
<i>rplJ</i>	1.48	A6TGN8	Białko rybosomalne L10
<i>otsA</i>	1.45	A6TB47	Syntaza trehalozo-6-fosforanu.
<i>rpsR</i>	1.44	A6THB3	Białko rybosomalne S18
<i>lamB</i>	1.42	A6T5L4	W formie trimery tworzy pory w błonie zewnętrznej umożliwiając u <i>E. coli</i> dyfuzję maltodekstryny i innych cząsteczek hydrofilowych. Receptor faga λ.
<i>rplO</i>	1.37	A6TEV3	Białko rybosomalne L15
<i>rraA</i>	1.37	A6TGB9	Wpływa na całkowity poziom RNA poprzez regulację aktywności endonukleolitycznej Rnazy E.
<i>rplV</i>	1.35	A6TEW7	Białko rybosomalne L22
<i>dnaK</i>	1.34	A6T4F4	Jedno z głównych białek opiekuńczych uczestniczące w zwijaniu/renaturacji nowosyntetyzowanych/uszkodzonych białek.
<i>rpsL</i>	1.34	A6TEY0	Białko rybosomalne S12
<i>groEL</i>	1.33	A6TH53	<i>Co-chaperonin</i> . Wraz z GroEL (<i>chaperonin</i>) bierze udział w zwijaniu/renaturacji nowosyntetyzowanych/uszkodzonych białek.
<i>rplN</i>	1.30	A6TEW2	Białko rybosomalne L14

cd. Tab. 5. **Zmiany poziomu białka w hodowli płynnej (HP) w stosunku do subpopulacji pierścienia (P).** * Krotność zmiany (fold change) poziomu białka w HP w stosunku do P.

Gen	Zmiany poziomu białka* w HP w stosunku do P	nr Uniprot dla <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> (strain ATCC 700721 / MGH 78578)	Funkcja
<i>deoC</i>	1.30	A6THZ6	Katalizuje odwracalną reakcję aldolową pomiędzy aldehydem octowym i 3-fosforanem aldehydu D-glicerynowego, w wyniku której powstaje 5-fosforan 2-deoksy-D-rybozy.
<i>pyrG</i>	1.27	A6TD54	Katalizuje zależną od ATP aminację UTP do CTP z L-glutaminą lub amoniakiem jako źródłem azotu.
<i>pnp</i>	1.27	A6TEI3	Nukleotydylotransferaza polirybonukleotydowa. Uczestniczy w degradacji mRNA.
<i>rpsE</i>	1.27	A6TEV5	Białko rybosomalne S5
<i>nagB</i>	1.27	A6T6C1	Katalizuje odwracalną izomeryzację-deaminację glukozamino-6-fosforanu z wytworzeniem fruktozo 6-fosforanu i jonu amonowego.
<i>rplI</i>	1.25	A6THB4	Jest składnikiem podjednostki 50S rybosomu.
<i>rplB</i>	1.25	A6TEW9	Jedno z głównych białek wiążących rRNA. Wymagane do połączenia podjednostek 30S i 50S w celu utworzenia rybosomu 70S, do wiązania tRNA i tworzenia wiązań peptydowych.
<i>pgk</i>	1.23	A6TDT1	Kinaza fosfoglicerynianowa. Uczestniczy w glikolizie.
<i>infC</i>	1.21	A6TAI6	Czynnik inicjacji translacji IF-3
<i>tufA</i> ; <i>tufB</i>	1.20	A6TEX7	Czynnik elongacyjny EF-Tu. Bierze udział w zależnym od GTP wiązaniu aminoacylo-tRNA z miejscem A rybosomów podczas biosyntezy białek.
<i>mtIA</i>	1.20	A6TFJ3	Permeaza mannitolu. Należy do zależnego od fosfoenolopirogronianu systemu transportującego cukry PTS (<i>sugar transporting phosphotransferase system</i>).
<i>ileS</i>	1.20	A6T4G0	Katalizuje przyłączenie izoleucyny do tRNA (Ile).

Tab. 6. Zmiany poziomu białka w subpopulacji pierścienia (P) w stosunku do hodowli płynnej (HP). * Krotność zmiany (fold change) poziomu białka w P w stosunku do HP.

Gen	Zmiany poziomu białka* w P w stosunku do HP	nr Uniprot dla <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> (strain ATCC 700721 / MGH 78578)	Funkcja
<i>grcA</i>	4.15	A6TCJ1	Enzym z resztą glicyny Gly102 w formie rodnika, przywracający aktywność liazy pirogronian-mrówczan.
<i>hpf (yhbh)</i>	3.86	A6TEM2	Bierze udział w hibernacji rybosomów.
<i>sucC</i>	2.30	A6T6F6	Enzym cyklu kwasu cytrynowego, podjednostka beta ligazy bursztynian-CoA.
<i>dapA</i>	2.07	A6TCA1	Syntaza hydroksytetrahydrodipikolinianu. Uczestniczy w biosyntezie lizyny i kwasu diaminopimelinowego biosyntezie L-lizyny.
<i>zapB</i>	2.03	A6TFR0	Białko odpowiedzialne za podziały komórkowe, współpracuje z FtsZ podczas formowania pierścienia Z.
<i>aacA4</i>	2.01	A6TIL5	Acetylotransferaza aminoglikozydowa. Katalizuje przeniesienie grupy acetylowej z acetylo-CoA na grupę aminową 6' w cząsteczce aminoglikozydu.
<i>gcvP</i>	1.90	A6TDR5	Katalizuje degradację glicyny.
<i>glaH</i>	1.83	A6T540	Dioksygenaza zależna od alfa-ketoglutaranu, katalizuje hydroksylację glutaranu do L-2 hydroksyglutaranu.
<i>argG</i>	1.77	A6TEJ0	Bierze udział w biosyntezie L-argininy.
<i>adk</i>	1.76	A6T5N7	Bierze udział w cyklu kwasu cytrynowego: katalizuje odwracalną reakcję utleniania jabłczanu do szczawiooctanu.
<i>mdh</i>	1.75	A6TEQ3	Bierze udział w cyklu Krebsa: katalizuje odwracalną reakcję utleniania jabłczanu do szczawiooctanu.
<i>rpsF</i>	1.75	A6THB1	Białko rybosomalne S6
<i>gnd</i>	1.68	A6TBE6	Katalizuje oksydacyjną dekarboksylację 6-fosfoglukonianu do rybulozo-5-fosforanu i CO ₂ , z jednoczesną redukcją NADP do NADPH.
<i>dadA</i>	1.65	A6TAW4	Bierze udział w oksydacyjnej deaminacji D-aminokwasów.
<i>hisS</i>	1.59	A6TCD3	Przyłącza histydynę do tRNA (His).
<i>panC</i>	1.58	A6T4S9	Uczestniczy w biosyntezie pantotenianu. Katalizuje kondensację pantoianu z beta-alaniną w reakcji zależnej od ATP.
<i>mscL</i>	1.57	A6TEU4	Kanał mechanoczuły reagujący na naprężenia w dwuwarstwie lipidowej; uczestniczy w regulacji ciśnienia osmotycznego w komórce.
<i>rpiA</i>	1.56	A6TDS5	Katalizuje odwracalne przekształcenie rybozo-5-fosforanu do rybulozo-5-fosforanu. Szlak pentozofosforanowy.
<i>slyA</i>	1.56	A6T9Z1	Czynnik transkrypcyjny. U <i>E. coli</i> indukuje między innymi ekspresję genów kodujących białka opiekuńcze.
<i>atpG</i>	1.54	A6TG37	Podjednostka γ syntazy ATP.
<i>pepB</i>	1.53	A6TCE4	Prawdopodobnie odgrywa ważną rolę w wewnątrzkomórkowej degradacji peptydów.
<i>atpF</i>	1.51	A6TG40	Podjednostka β syntazy ATP.
<i>gcvT</i>	1.47	A6TDR7	Aminometylotransferaza uczestnicząca w degradacji glicyny.
<i>ispG</i>	1.47	A6TCD4	Bierze udział w syntezie izoprenoidów. Przekształca 2,4-cyklodifosforan 2-C-metylo-D-erytrytolu w 4-difosforan 1-hydroksy-2-metylo-2-(E)-butenyłu.
<i>ptsH</i>	1.46	A6TC51	Katalizuje fosforylację substratów cukrowych umożliwiając ich translokację przez błonę komórkową.
<i>gpmA</i>	1.44	A6T6I3	Mutaza fosfoglicerynianowa zależna od 2,3-bisfosfoglicerynianu. Katalizuje przekształcenie 2-fosfoglicerynianu i 3-fosfoglicerynianu.
<i>atpA</i>	1.43	A6TG38	Podjednostka α syntazy ATP.
<i>ndk</i>	1.42	A6TCD7	Bierze udział w syntezie trifosforanów nukleozydów innych niż ATP.
<i>glpK</i>	1.42	A6TFR2	Kinaza glicerolowa.

cd. Tab. 6. **Zmiany poziomu białka w subpopulacji pierścienia (P) w stosunku do hodowli płynnej (HP).** * Krotność zmiany (fold change) poziomu białka w P w stosunku do HP.

Gen	Zmiany poziomu białka* w P w stosunku do HP	nr Uniprot dla <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> (strain ATCC 700721 / MGH 78578)	Funkcja
<i>pdxB</i>	1.39	A6TC06	Uczestniczy w biosyntezie pirydoksyno-5'-fosforanu. Katalizuje utlenianie erytrozo-4-fosforanu do 3-hydroksy-2-okso-4-fosfonooksybutanianu.
<i>tpiA</i>	1.39	A6TFQ6	Izomeraza triozofosforanowa. Bierze udział w glukoneogenezie.
<i>dapD</i>	1.39	A6T4W8	Udział w biosyntezie L-lizyny.
<i>mtnN</i>	1.38	A6T4W3	Katalizuje nieodwracalne rozszczepienie wiązania glikozydowego w 5'-metylotioadenozynie i S-adenozylhomocysteinie.
<i>pepQ</i>	1.37	A6TGM5	Dipeptydaza, rozcina dipeptydy z resztą proliową w pozycji C-końcowej.
<i>atpD</i>	1.36	A6TG36	Podjednostka β syntazy ATP.
<i>ycfP</i>	1.35	A6T7G7	Funkcja nieznana.
<i>glyA</i>	1.35	A6TCG5	Katalizuje odwracalną reakcję przekształcenia seryny w glicynę z udziałem tetrahydrofolianu, jako przenośnika grup jednowęglowej.
<i>tdh</i>	1.31	A6TFL2	Katalizuje zależne od NAD ⁺ utlenianie L-treoniny do 2-amino-3-ketomaślanu.
<i>grpE</i>	1.31	A6TCM1	<i>Co-chaperone</i> . Razem z DnaK uczestniczy w zwijaniu/renaturacji nowosynetyzowanych/zdenaturowanych białek.
<i>gmhA</i>	1.29	A6T518	Katalizuje izomeryzację sedoheptulozo-7-fosforanu do D-glicero-D-mannoheptozo 7-fosforanu.
<i>purA</i>	1.29	A6TH93	Syntetaza adenylobursztynianowa. Bierze udział w szlaku biosyntezy nukleotydów purynowych <i>de novo</i> .
<i>rpoA</i>	1.28	A6TEU8	Podjednostka α polimerazy RNA.
<i>glnS</i>	1.28	A6T6C3	Ligaza glutamyl-tRNA.
<i>atpH</i>	1.27	A6TG39	Podjednostka c syntazy ATP.
<i>leuS</i>	1.26	A6T6A3	Ligaza leucyl-tRNA.

Tab. 7. Zmiany poziomu białka w hodowli płynnej (HP) w stosunku do subpopulacji centrum (C). * Krotność zmiany (fold change) poziomu białka w HP w stosunku do C.

Gen	Zmiany poziomu białka* w HP w stosunku do C	nr Uniprot dla <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> (strain ATCC 700721 / MGH 78578)	Funkcja
rpsM	3.77	A6TEV1	Białko rybosomalne S13
rplT	3.41	A6TAI4	Białko rybosomalne L20
rpsL	3.31	A6TEY0	Białko rybosomalne S12
rpsT	2.92	A6T4F8	Białko rybosomalne S20
rplQ	2.81	A6TEU7	Białko rybosomalne L17
rpsU	2.52	A6TE47	Białko rybosomalne S2
rpsR	2.47	A6THB3	Białko rybosomalne S18
lamB	2.26	A6T5L4	W formie trimery tworzy pory w błonie zewnętrznej umożliwiając u <i>E. coli</i> dyfuzję maltodekstryny i innych cząsteczek hydrofilowych. Receptor faga λ.
rpmA	2.15	A6TEK4	Białko rybosomalne L27
rplP	2.09	A6TEW5	Białko rybosomalne L16
lpoB	2.06	A6T7G4	Regulator syntezy peptydoglikanu. Niezbędny dla funkcjonowania białka wiążącego penicylinę 1B (PBP1b).
wrbA	1.98	A6T793	Oksydoreduktaza NAD(P)H : chinon.
fabA	1.96	A6T748	Dehydrataza 3-hydroksydekanolo-ACP (<i>acyl carrier protein</i>), uczestniczy w biosyntezie kwasów tłuszczowych.
ihfA	1.94	A6TAI1	<i>Integration Host Factor</i> , podjednostka α. Wiąże DNA, uczestniczy w rekombinacji oraz kontroli transkrypcji i translacji.
rplR	1.93	A6TEV6	Białko rybosomalne L18
rplO	1.92	A6TEV3	Białko rybosomalne L15
rplB	1.91	A6TEW9	Białko rybosomalne L2
astD	1.85	A6T7T5	Dehydrogenaza semialdehydu sukcyloglutaminianu, uczestniczy w metabolizmie argininy.
rpsC	1.79	A6TEW6	Białko rybosomalne S3
tsx	1.75	A6T5E4	Kanał w błonie zewnętrznej transportujący do komórki nukleotydy oraz antybiotyki albicydynę – inhibitor gyrazy.
nuoC	1.66	A6TBX2	Podjednostka C/D oksydoreduktazy NADH-ubichinon, składnik łańcucha transportu elektronów.
rplV	1.66	A6TEW7	Białko rybosomalne L22
dcyD	1.59	A6TB69	Desulfhydrata D-cysteiny.
rplL	1.49	A6TGN9	Białko rybosomalne L12
dnaK	1.48	A6T4F4	Jedno z głównych białek opiekuńczych uczestniczące w zwijaniu/renaturacji nowosyntetyzowanych/uszkodzonych białek.
groES	1.45	A6TH52	Co-chaperonin. Wraz z GroEL (<i>chaperonin</i>) bierze udział w zwijaniu/renaturacji nowosyntetyzowanych/uszkodzonych białek.
dps	1.39	A6T6Q6	<i>DNA protection during starvation protein</i> . Tworzy kompleksy z DNA, wiąże jony Fe ²⁺ zapobiegając reakcji Fentona i chroniąc komórki przed stresem oksydacyjnym.
katG	1.39	A6T9H9	Enzym dwufunkcyjny katalaza-peroksydaza.
rplJ	1.38	A6TGN8	Białko rybosomalne L10

cd. Tab 7. **Zmiany poziomu białka w hodowli płynnej (HP) w stosunku do subpopulacji centrum (C).** * Krotność zmiany (fold change) poziomu białka w HP w stosunku do C.

Gen	Zmiany poziomu białka* w HP w stosunku do C	nr Uniprot dla <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> (strain ATCC 700721 / MGH 78578)	Funkcja
groEL	1.37	A6TH53	<i>Chaperonin</i> , wraz z GroES bierze udział w zwijaniu/renaturacji nowosyntetyzowanych/uszkodzonych białek.
rplC	1.35	A6TEX2	Białko rybosomalne L3
efp	1.33	A6TH65	Czynnik elongacyjny P. Uczestniczy w syntezie wiązań peptydowych.
rplI	1.31	A6THB4	Białko rybosomalne L9
otsA	1.29	A6TB47	Syntaza trehalozo-6-fosforanu.
rpsD	1.29	A6TEU9	Białko rybosomalne S4
rpsI	1.29	A6TEN8	Białko rybosomalne S9
rpsE	1.28	A6TEV5	Białko rybosomalne S5
rplF	1.27	A6TEV7	Białko rybosomalne L6
thrS	1.26	A6TAI7	Ligaza treonylo-tRNA
rplD	1.26	A6TEX1	Białko rybosomalne L4
rplN	1.25	A6TEW2	Białko rybosomalne L14
htpG	1.21	A6T5N6	Białko opiekuńcze, posiada aktywność ATP-azy.
nuoB	1.20	A6TBX3	Bierze udział w łańcuchu oddechowym. Podjednostka B oksydoreduktazy NADH-chinon.
UPF0325 protein KPN78578_01770	1.20	A6T4W7	Funkcja nieznaną.
hemL	1.20	A6T4V8	Aminomutaza uczestnicząca w syntezie aminolewulinianu. Metabolizm porfiryn.

Tab. 8. Zmiany poziomu białka w subpopulacji centrum (C) w stosunku do hodowli płynnej (HP). * Krotność zmiany (fold change) poziomu białka w C w stosunku do HP.

Gen	Zmiany poziomu białka* w C w stosunku do HP	nr Uniprot dla <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> (strain ATCC 700721 / MGH 78578)	Funkcja
<i>grcA</i>	10.08	A6TCJ1	Enzym z resztą glicyny Gly102 w formie rodnika, przywracający aktywność liazy pirogronian-mrówczan.
<i>hpf (yhbh)</i>	2.93	A6TEM2	Bierze udział w hibernacji rybosomów.
<i>mscL</i>	2.49	A6TEU4	Kanał mechanoczuły reagujący na naprężenia w dwuwarstwie lipidowej; uczestniczy w regulacji ciśnienia osmotycznego w komórce
<i>glaH</i>	2.49	A6T540	Dioksygenaza zależna od alfa-ketoglutaranu, katalizuje hydroksylację glutaranu do L-2 hydroksyglutaranu.
<i>sstT</i>	2.40	A6TEC8	Symporter treoniny/seryny i Na ⁺ .
<i>mdh</i>	2.39	A6TEQ3	Bierze udział w cyklu kwasu cytrynowego: katalizuje odwracalną reakcję utleniania jabłczanu do szczawiooctanu.
<i>gcvP</i>	2.21	A6TDR5	Katalizuje degradację glicyny.
<i>dadA</i>	2.20	A6TAW4	Bierze udział w oksydacyjnej deaminacji D-aminokwasów.
<i>hutU</i>	2.14	A6T6L0	Bierze udział w metabolizmie histydyny, katalizuje przekształcenie urokanianu do 4-imidazolono-5-propionianu.
<i>dapA</i>	2.12	A6TCA1	Syntaza hydroksytetrahydrodipikolinianu. Uczestniczy w biosyntezie lizyny i kwasu diaminopimelinowego biosyntezie L-lizyny.
<i>sucC</i>	2.08	A6T6F6	Enzym cyklu kwasu cytrynowego, podjednostka beta ligazy bursztynian-CoA.
<i>zapB</i>	2.02	A6TFR0	Białko odpowiedzialne za podziały komórkowe, współpracuje z FtsZ podczas formowania pierścienia Z.
<i>adk</i>	1.93	A6T5N7	Katalizuje odwracalne przeniesienie końcowej grupy fosforanowej pomiędzy ATP i AMP.
<i>rpsF</i>	1.91	A6THB1	Białko rybosomalne S6
<i>aacA4</i>	1.89	A6TIL5	Acetylotransferaza aminoglikozydowa. Katalizuje przeniesienie grupy acetylowej z acetylo-CoA na grupę aminową 6' w cząsteczce aminoglikozydu.
<i>argG</i>	1.88	A6TEJ0	Bierze udział w biosyntezie L-argininy.
<i>metK</i>	1.87	A6TDV1	Katalizuje powstawanie S-adenozylometioniny z metioniny i ATP.
<i>atpF</i>	1.76	A6TG40	Podjednostka β syntazy ATP.
<i>atpD</i>	1.65	A6TG36	Podjednostka β syntazy ATP.
<i>ycfP</i>	1.64	A6T7G7	Funkcja nieznaną.
<i>gnd</i>	1.60	A6TBE6	Katalizuje oksydacyjną dekarboksylację 6-fosfoglukonianu do rybulozo-5-fosforanu i CO ₂ , z jednoczesną redukcją NADP do NADPH.
<i>rpoA</i>	1.59	A6TEU8	Podjednostka α polimerazy RNA
<i>speA</i>	1.59	A6TDV0	Dekarbonylaza argininy, katalizuje biosyntezę agmatyny z argininy
<i>tpiA</i>	1.57	A6TFQ6	Izomeraza triozofosforanowa. Bierze udział w glukoneogenezie.
<i>atpG</i>	1.56	A6TG37	Podjednostka γ syntazy ATP.
<i>pgi</i>	1.55	A6TGT4	Katalizuje odwracalną izomeryzację glukozy-6-fosforanu do fruktozy-6-fosforanu.
<i>luxS</i>	1.55	A6TCV3	Bierze udział w syntezie autoinduktora 2 (AI-2), który jest wydzielany przez bakterie podczas <i>quorum sensing</i> .
<i>ndk</i>	1.54	A6TCD7	Bierze udział w syntezie trifosforanów nukleozydów innych niż ATP.
<i>rpiA</i>	1.53	A6TDS5	Katalizuje odwracalne przekształcenie rybozy-5-fosforanu do rybulozo-5-fosforanu. Szlak pentozofosforanowy

cd. Tab 8 **Zmiany poziomu białka w subpopulacji centrum (C) w stosunku do hodowli płynnej (HP).** * Krotność zmiany (fold change) poziomu białka w C w stosunku do HP.

Gen	Zmiany poziomu białka* w C w stosunku do HP	nr Uniprot dla <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> (strain ATCC 700721 / MGH 78578)	Funkcja
<i>galF</i>	1.52	A6TBG2	Katalizuje przekształcenie UTP i glukozy-1-fosforan w UDP-glukozę.
<i>glnB</i>	1.52	A6TCG7	Bierze udział w regulacji wiązania azotu.
<i>ispG</i>	1.51	A6TCD4	Bierze udział w syntezie izoprenoidów. Przekształca 2,4-cyklodifosforan 2-C-metylo-D-erytrytolu w 4-difosforan 1-hydroksy-2-metylo-2-(E)-butenyli.
<i>pdxB</i>	1.51	A6TC06	Katalizuje utlenianie erytrozo-4-fosforanu do 3-hydroksy-2-okso-4-fosfonooksybutanianu.
<i>atpA</i>	1.48	A6TG38	Podjednostka α syntazy ATP.
<i>gcvT</i>	1.47	A6TDR7	Aminometylotransferaza uczestnicząca w degradacji glicyny
<i>pepQ</i>	1.47	A6TGM5	Dipeptydaza, rozcina dipeptydy z resztą prolilową w pozycji C-końcowej.
<i>ptsH</i>	1.43	A6TC51	Katalizuje fosforylację substratów cukrowych umożliwiając ich translokację przez błonę komórkową.
<i>gpmA</i>	1.42	A6T6I3	Mutaza fosfoglicerynianowa zależna od 2,3-bisfosfoglicerynianu. Katalizuje przekształcenie 2-fosfoglicerynianu i 3-fosfoglicerynianu.
<i>tdh</i>	1.41	A6TFL2	Katalizuje zależne od NAD ⁺ utlenianie L-treoniny do 2-amino-3-ketomaślanu.
<i>pepB</i>	1.40	A6TCE4	Prawdopodobnie odgrywa ważną rolę w wewnątrzkomórkowej degradacji peptydów.
<i>glyS</i>	1.40	A6TFH4	Podjednostka β syntazy glicylo-tRNA.
<i>hldD</i>	1.39	A6TFL4	Epimeraza. Katalizuje wzajemne przekształcenie pomiędzy ADP-D-glicero-beta-D-mannoheptozą i ADP-L-glicero-beta-D-mannoheptozą.
<i>grpE</i>	1.38	A6TCM1	<i>Co-chaperone</i> . Razem z DnaK uczestniczy w zwijaniu/renaturacji nowosynetyzowanych/zdenaturowanych białek.
<i>lsrG</i>	1.36	A6TEB3	Bierze udział w degradacji cząsteczki autoinduktora AI-2 wytwarzanej podczas <i>quorum-sensing</i> .
<i>fbp</i>	1.34	A6THE3	Bierze udział w glukoneogenezie, katalizuje usuwanie 1-fosforanu z fruktozo-1,6-bis-fosforanu z wytworzeniem fruktozo-6-fosforanu.
<i>rplS</i>	1.30	A6TCL4	Białko rybosomalne L19
<i>hutH</i>	1.30	A6T6L1	Bierze udział w metabolizmie histydyny, przekształca histydynę do urokianinu i mocznika.
<i>slyA</i>	1.28	A6T9Z1	Czynnik transkrypcyjny. U <i>E. coli</i> indukuje między innymi ekspresję genów kodujących białka opiekuńcze.
<i>panC</i>	1.28	A6T4S9	Uczestniczy w biosyntezie pantotenianu. Katalizuje kondensację pantoinianu z beta-alaniną w reakcji zależnej od ATP.
<i>atpH</i>	1.28	A6TG39	Podjednostka γ syntazy ATP.
<i>leuS</i>	1.26	A6T6A3	Ligaza leucylo-tRNA.

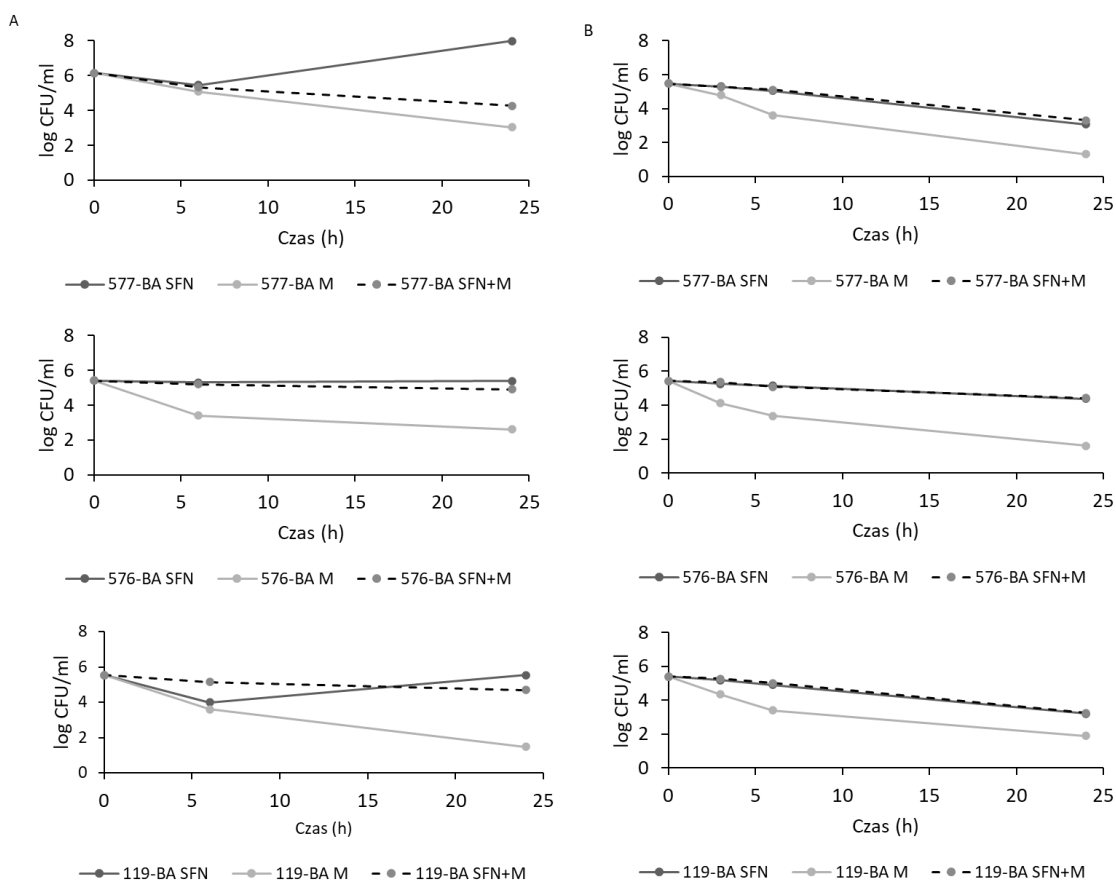
7.4. Wpływ sulforafanu i eutektyku *Reline* na bakterie przetrwałę *K. pneumoniae*

W związku z tym, że bakterie przetrwałę są przyczyną niepowodzenia antybiotykoterapii i nawracających infekcji coraz więcej badań skupia się na alternatywnych metodach ich eliminacji (Stojowska-Swędryńska et al., 2023). W ramach mojej pracy postanowiłam zbadać wpływ sulforafanu i eutektyku *Reline* na powstawanie bakterii przetrwałych.

7.4.1. Sulforafan (SFN)

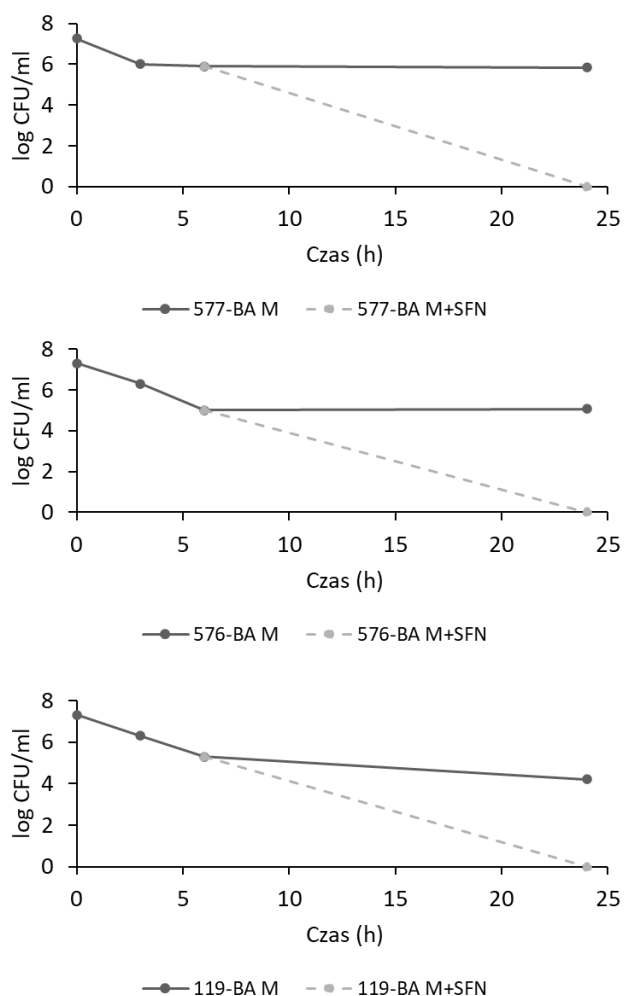
Wiele badań wskazuje, że należący do izotiocyjanianów sulforafan hamuje wzrost bakterii i posiada działanie antybakteryjne. Dane literaturowe sugerują, że u *E. coli* i *K. pneumoniae* mechanizm działania SFN opiera się na indukcji odpowiedzi ścisłej, natomiast u *P. aeruginosa* hamuje zjawisko *quorum sensing* i powstawanie biofilmu (Aires et al., 2009; Ganin et al., 2013; Nowicki et al., 2016, 2019; Romeo et al., 2018). Z powodu braku informacji w literaturze o działaniu SFN na bakterie przetrwałę wykonałam szereg doświadczeń, które miały wyjaśnić potencjalny wpływ SFN na stan przetrwały komórek.

W pierwszym etapie sprawdziłam jak SFN samodzielnie oraz w połączeniu z meropenem działa na całe hodowle bakteryjne. W tym celu do bakterii pochodzących z makrokolonii, dodawałam SFN i meropenem razem lub oddzielnie, a następnie inkubowałam próby w 37°C. Wszystkie badane szczepy produkowały bakterie przetrwałę tolerujące meropenem (Rys. 38, log CFU/ml > 1). SFN w stężeniu 2×MIC powodował niewielki spadek liczby CFU tylko w niektórych próbach (119-BA; 577-BA) i jedynie w ciągu pierwszych 4 godzin inkubacji (Rys. 38A). To samo stężenie sulforafanu znosiło efekt działania meropenemu (10×MIC) – poziom bakterii przetrwałych po inkubacji z SFN i meropenemem był wyraźnie wyższy we wszystkich badanych próbach w porównaniu z hodowlami traktowanymi tylko meropenemem. SFN w stężeniu 4×MIC całkowicie znosił efekt działania meropenemu – poziom bakterii przetrwałych po inkubacji z SFN i meropenemem był 10-100 razy wyższy niż w hodowlach traktowanych tylko meropenemem (Rys. 38B).



Rys. 38. **Wpływ sulforafanu na poziom bakterii przetrwałych *K. pneumoniae*.** Bakterie pochodzące z makrokolonii zawieszono w LB i inkubowano w obecności meropenemu, sulforafanu lub meropenemu i sulforafanu. (A) stężenie sulforafanu 2×MIC (B) stężenie sulforafanu 4×MIC. M – meropenem, SFN – sulforafan.

Sprawdziłam także czy sulforafan działa bakteriobójczo na bakterie przetrwałe wyizolowane z makrokolonii. W tym celu w pierwszym etapie bakterie inkubowałam z antybiotykiem (10×MIC), a następnie dodawałam sulforafan w stężeniu 4×MIC. Po 18 h inkubacji z sulforafanem (łącznie 24 h inkubacji z antybiotykiem i sulforafanem) odnotowałam całkowitą eliminację bakterii przetrwałych (Rys. 39). Wynik ten był zaskakujący, ponieważ dodanie sulforafanu w stężeniu 4×MIC razem z meropenem hamowało działanie antybiotyku (Rys. 38B).



Rys. 39. Wpływ sulforafanu na poziom bakterii przetrwałych *K. pneumoniae* po wstępnej inkubacji z meropenem. Bakterie pochodzące z makrokolonii zawieszano w LB i inkubowano z meropenem ($10\times MIC$) przez 6 h, następnie próby dzielono na dwie części: pierwszą nadal inkubowano z antybiotykiem, natomiast do drugiej dodawano sulforafan w stężeniu $4\times MIC$. M-meropenem, SFN- sulforafan.

Doświadczenia te wykazały, że wpływ sulforafanu na poziom bakterii przetrwałych może być różny w zależności od szczepu, stężenia sulforafanu oraz tego czy jest on dodawany do hodowli razem z antybiotykiem czy po działaniu antybiotyku.

7.4.2. Eutektyk *Reline* (chlorek choliny + mocznik)

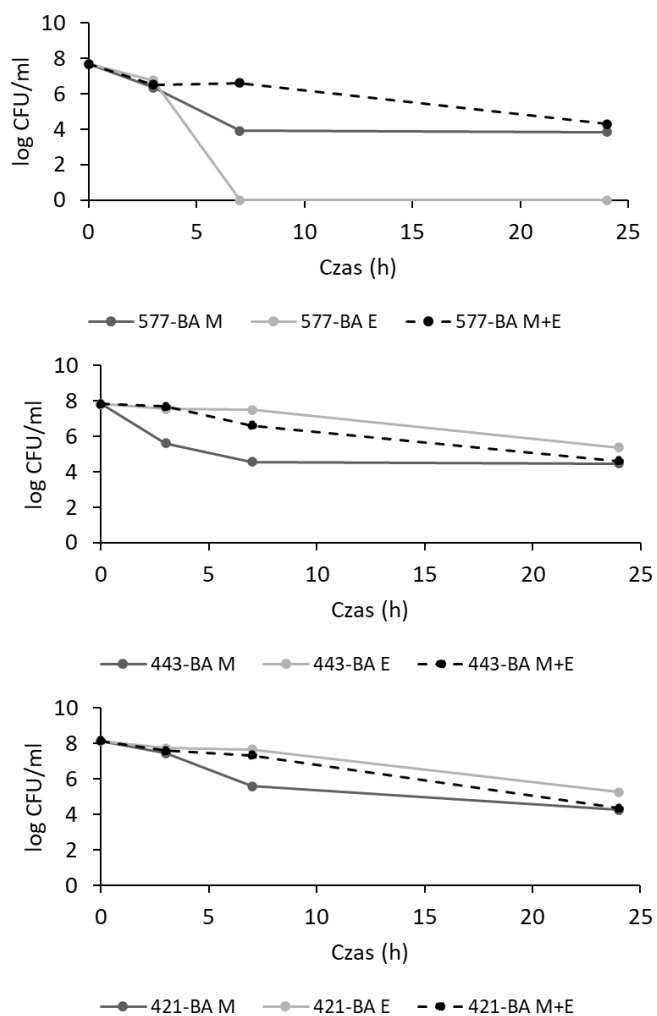
Kolejnym związkiem, który testowałam i określałam jego wpływ na bakterie przetrwałe była mieszanina głęboko eutektyczna złożona z chlorku choliny i mocznika (w stosunku molowym 1:2). Ciecze te uzyskuje się przez zmieszanie i wolne podgrzanie substancji wyjściowych w łaźni wodnej osiągając maksymalnie 120°C , a następnie ochłodzenie do temperatury pokojowej. Dane

literaturowe sugerują, że ciecze głęboko eutektyczne charakteryzują się właściwościami antybakteryjnymi (Akbar et al., 2023; Silva et al., 2019; Zakrewsky et al., 2016). Mieszanina eutektyczna, której właściwości badałam charakteryzowała się istotnie niższą wartością MIC niż wartości MIC oznaczone oddzielnie dla chlorku choliny i mocznika (Tab. 9).

Tab. 9. Wartości MIC eutektyku *Reline* oraz związków wyjściowych dla wybranych szczepów *K. pneumoniae*.

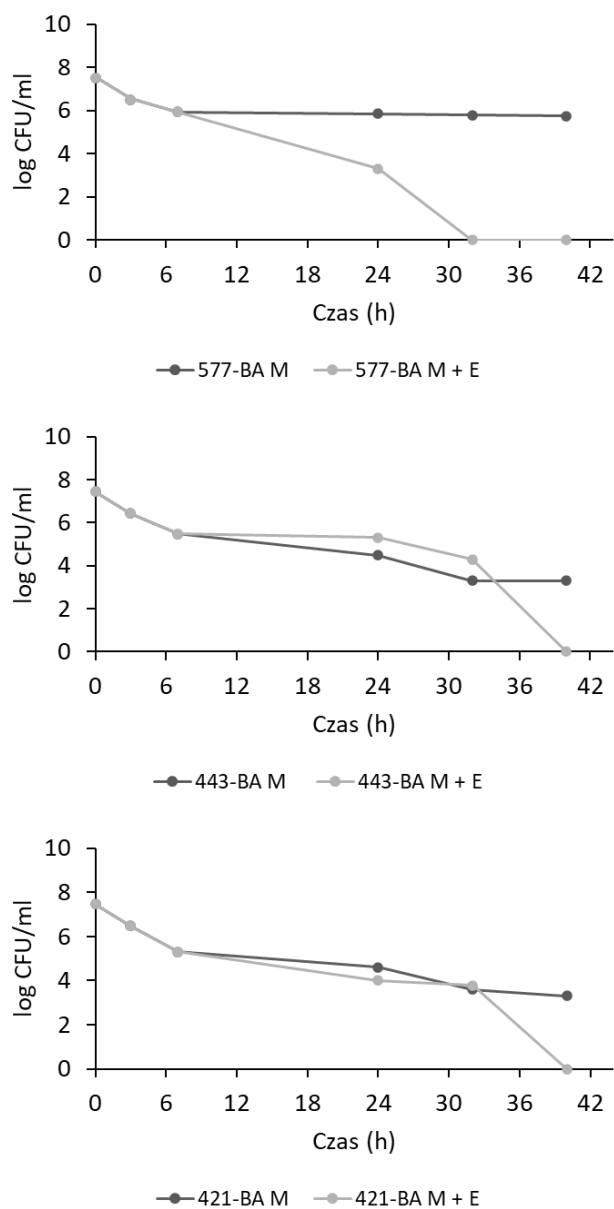
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	MIC [mM/mL]		
	Chlorek choliny	Mocznik	Reline
ATCC 13883	1.7	1.4	0.6
421-BA	0.8	1.4	0.6
423-BA	1.7	2.7	0.6
443-BA	1.7	1.4	0.6
577-BA	1.7	1.4	1.2

Pierwszym krokiem pozwalającym ocenić wpływ eutektyku (1×MIC) na bakterie przetrwać było przeprowadzenie badań na całych hodowlach bakteryjnych pochodzących z makrokolonii. Jedynym szczepem wrażliwym na *Reline* był 577-BA. Natomiast izolaty 443-BA i 421-BA wykazywały znaczną tolerancję na ten eutektyk (Rys. 40). W przypadku wszystkich trzech szczepów eutektyk wyraźnie opóźniał działanie meropenemu – w pierwszych godzinach inkubacji poziom CFU/ml był wyraźnie wyższy w hodowli z meropenemem i eutektykiem niż w hodowli z samym antybiotykiem. Wynik uzyskany dla szczepu 577-BA był zaskakujący - chociaż sam eutektyk całkowicie eliminował bakterie w ciągu 7 godzin, w połączeniu z meropenemem powodował w ciągu 24 h spadek CFU/ml do takiego samego poziomu jak w hodowli z samym antybiotykiem.



Rys. 40. Wpływ eutektyku na poziom bakterii przetrwałych *K. pneumoniae*. Bakterie pochodzące z makrokolonii zawieszano w LB i inkubowano w obecności meropenemu ($10\times\text{MIC}$), eutektyku ($1\times\text{MIC}$), lub meropenemu i eutektyku. E – eutektyk Reline, M – meropenem.

Następnie sprawdziłam czy eutektyk działa na bakterie przetrwałę wyizolowane z makrokolonii po inkubacji z meropenemem ($10\times\text{MIC}$). Stwierdziłam, że bakterie przetrwałę powstałe w wyniku działania meropenemu są wrażliwe na stosowany eutektyk (Rys. 41). Jednak czas inkubacji niezbędny do ich eliminacji wynosił, w zależności od szczepu, aż od 32 do 40 h.



Rys. 41. Wpływ eutektyku Reline na poziom bakterii przetrwałych *K. pneumoniae* po wstępnej inkubacji z meropenemem. Bakterie pochodzące z makrokolonii zawieszono w LB i inkubowano z meropenemem ($10\times MIC$) przez 6 h, następnie próby dzielono na dwie części: do jednej dawano eutektyk ($1\times MIC$), drugą pozostawiono z antybiotykiem i kontynuowano inkubację. M – meropenem, E- eutektyk Reline.

8. DYSKUSJA

1. Agregacja i glikacja białek *E. coli*

Wysuszenie i ponowne nawadnianie (rehydratacja) to procesy, na które komórki bakteryjne są często narażone w środowisku naturalnym. Wyniki naszego zespołu oraz dane literaturowe sugerowały, że szok osmotyczny związany z wysuszeniem-rehydratacją może być przyczyną glikacji białek, która powoduje ich agregację (Chakrabortee et al., 2007; Lebre et al., 2017; Moruno Algara et al., 2019), z kolei wysoki poziom agregatów przyczynia się do wejścia bakterii w stan przetrwały (Bollen et al., 2021; Gollan et al., 2019; Leszczynska et al., 2013). Wstępnym celem tej pracy było sprawdzenie, czy zależność pomiędzy glikacją i agregacją białek a bakteriami przetrwałymi występuje u dwóch przedstawicieli *Enterobacteriaceae*: *E. coli* i *K. pneumoniae*. Zaobserwowałam, że u *E. coli* szczególnie wzmożona agregacja białek następuje po rehydratacji (Rys. 12B), co łączy się z wyższym poziomem bakterii przetrwałych (Rys. 12C). Prawdopodobnie podczas rehydratacji dochodzi najpierw do częściowego rozpuszczenia agregatów i pojawienia się nie w pełni zwiniętych produktów pośrednich, które ulegają ponownej agregacji (Fink, 1998). Być może czas potrzebny na utworzenie agregatów jest zbyt krótki podczas wysuszenia i proces ten jest kontynuowany podczas ponownego nawodnienia komórek bakteryjnych (Chakrabortee et al., 2007). W związku z tym, że powstawanie AGEs może przyspieszać wewnątrzkomórkową agregację białek (Fournet et al., 2018; Iannuzzi et al., 2014; Rabbani & Thornalley, 2021), spodziewałam się, że większość produktów glikacji będzie znajdować się we frakcji nierozpuszczalnej. Przeprowadzone doświadczenia wykazały jednak, że powstałe agregaty *E. coli* zawierały niski poziom glikowanych białek w porównaniu z frakcją rozpuszczalną (Rys. 13B). Analiza poziomu agregatów białkowych, produktów glikacji oraz komórek dzielących się i VBNC w subpopulacjach *E. coli* uzyskanych po wirowaniu w gradiencie Perkolu (Rys. 14A) sugerowały, że agregaty mogą pełnić funkcję ochronną. Warto zaznaczyć, że wyizolowane komórki martwe i VBNC (frakcje W1 i R1) charakteryzowały się podwyższonym poziomem glikowanych białek, natomiast poziom agregatów białkowych był prawie taki sam jak w komórkach żywych (frakcja R3), co sugeruje, że przyczyną utraty żywotności *E. coli* była w większym stopniu glikacja niż agregacja białek.

Ochronna rola agregatów może polegać na zapobieganiu całkowitej denaturacji i inaktywacji białek. W literaturze istnieje wiele przykładów agregatów lub ciał inkluzyjnych, które zawierały nie tylko w różnym stopniu uszkodzone polipeptydy, ale również aktywne enzymy (Kuczyńska-

Wiśnik et al., 2016; Rinas et al., 2017). Agregaty mogą być również rezerwuarem białek, które ulegają szybkiej renaturacji po ustaniu warunków stresowych. Takie odzyskiwanie aktywnych białek może być bardziej korzystne dla komórki niż ich synteza *de novo*.

Dalsze badania prowadzone w Katedrze Biochemii Ogólnej i Medycznej dostarczyły nowych informacji o agregatach i częściowo potwierdziły hipotezę o ich ochronnej funkcji. Wyniki tych badań oraz wyniki opisane w Rozdziale 4.1. pracy doktorskiej zostały opublikowane w *Microbiological Research* (2023) 270: 127553. Wykazano między innymi, że agregaty charakteryzowały się wysoką zawartością białek podatnych na separację faz ciecz-ciecz (ang. *liquid-liquid phase separation*, LLPS) w porównaniu z całym proteomem *E. coli* (Łupkowska et al., 2023). Zjawisko to polega na wydzieleniu frakcji gęstej, przypominającej kropelki cieczy, z frakcji rzadkiej, która pozostaje homogenna (Alberti et al., 2019). Wysuszenie powoduje zagęszczenie cytoplazmy co ułatwia zajście LLPS i w konsekwencji może prowadzić do powstania agregatów białkowych (Feng et al., 2019). Skłonność do tworzenia LLPS jest zależna od zawartości białek zawierających regiony inherentnie nieuporządkowane (ang. *intrinsically disordered regions*, IDRs) oraz zmiany czynników fizykochemicznych: temperatury, pH, siły jonowej oraz modyfikacji potranslacyjnych (Hyman et al., 2014; J. Li et al., 2022; Uversky et al., 2015). W agregatach zidentyfikowano łącznie 547 białek głównie związanych z rybosomami, glikolizą, cyklem kwasów trójkarboksylowych, biosyntezą kwasów tłuszczowych, naprawą DNA i odpowiedzią na stres cieplny. Agregaty po rehydratacji zawierały jedynie 18 dodatkowych białek w porównaniu z agregatami powstałymi podczas wysuszenia, co wskazuje, że większość białek ulega agregacji już podczas suszenia (Łupkowska et al., 2023). Wykazano również, że najsilniej glikowanym było białko błony zewnętrznej OmpC. Należy zaznaczyć, że podczas izolacji agregatów, przy użyciu detergentu Triton-X100 błony ulegają rozpuszczeniu, więc białka błonowe, w tym OmpC, znajdowały się we frakcji rozpuszczalnej. Na Rys. 13B przedstawiającym immunodetekcję CML, białko OmpC jest widoczne jako najgrubszy prążek we frakcji rozpuszczalnej. Glikacja powoduje neutralizację ładunku dodatniego reszt lizyny w OmpC, co prawdopodobnie prowadzi do zaburzenia przepuszczalności błony, stanu VBNC, a następnie do śmierci komórki. OmpC i OmpF są głównymi porynami *E. coli*, które umożliwiają pasywny transport hydrofilnych związków niskocząsteczkowe, m.in. antybiotyków. Prace Liu i wsp. (2012) oraz Pu i wsp. (2016) wykazały niezależnie, że mutacja $\Delta ompC$ powoduje spadek wrażliwości *E. coli* na antybiotyki beta-laktamowe. Interesującym byłoby sprawdzenie czy również glikacja OmpC powoduje podobny efekt zanim ostatecznie nastąpi śmierć komórki.

2. Powstawanie i zwalczanie bakterii przetrwałych *K. pneumoniae*

Bakterie przetrwałe i VBNC są jedną z głównych przyczyn nawracających infekcji i niepowodzenia antybiotykoterapii (Mina & Marques, 2016; Rivers & Steck, 2001; Sun et al., 2008; Zeng et al., 2013). Dzięki spowolnionemu metabolizmowi antybiotyki nie są skuteczne w ich zwalczaniu i konieczne jest opracowanie nowych terapii zwalczających lekooporne infekcje. Analizując różne mechanizmy tolerancji na antybiotyki często zapomina się o tym, że bakterie przetrwałe mogą przekształcać się w komórki VBNC, których nie można wykryć stosując standardowe techniki laboratoryjne (Dewachter et al., 2021). Ponadto, bakterie przetrwałe w porównaniu z VBNC mogą stanowić niewielką część komórek, które przeżywają działanie antybiotyków (Dewachter et al., 2021; Kaldalu et al., 2016). Świadczą o tym również wyniki zaprezentowane w tej pracy - szczep *K pneumoniae* ATCC 13883 produkował w warunkach stresowych znikome ilości bakterii przetrwałych (0-0,03%, Rys. 15) w porównaniu z ogromną liczbą komórek VBNC, które przeżyły działanie antybiotyków (Rys. 16). Szczepy kliniczne również charakteryzowały się wysokim poziomem komórek VBNC (Rys. 30 Rys. 21). Należy również dodać, że obliczając procentową zawartość komórek przetrwałych, za 100% przyjmowałam liczbę komórek dzielących się (CFU/ml), a nie całkowitą liczbę bakterii (dzielących się, VBNC i martwych) przed dodaniem antybiotyku. Również inni autorzy oznaczają poziom bakterii przetrwałych w ten sposób (Bernier et al., 2013; Chowdhury et al., 2016; Manuse et al., 2021), ponieważ jest on prostszy i nie wymaga stosowania technik rozróżniających żywe i martwe bakterie. Dla pełnego obrazu należałoby jednak przedstawiać dane dotyczące wszystkich grup komórek (dzielące się, VBNC i martwe) przed i po dodaniu antybiotyku, zaznaczając, że do grupy komórek, które przeżyły działanie antybiotyku należą również VBNC (komórki przetrwałe + VBNC, Tab. 10).

Większość doświadczeń, w których analizowałam bakterie przetrwałe przeprowadziłam z użyciem meropenemu. Meropenem jest jednym z antybiotyków β -laktamowych „ostatniej szansy” w leczeniu zakażeń wywołanych przez *K. pneumoniae*, w związku z tym badania dotyczące wpływu tego związku na poziom bakterii przetrwałych są szczególnie ważne (Papp-Wallace et al., 2011).

Warto również zaznaczyć, że stosowane przeze mnie warunki hodowli (inkubacja w SGM, podwyższona temperatura) tylko częściowo naśladują warunki panujące w organizmie gospodarza. Podczas infekcji bakterie są narażone na szereg dodatkowych czynników stresowych: odpowiedź immunologiczną, zmienne natężenie i czas trwania stresu, co może wpływać na inny niż w warunkach laboratoryjnych sposób przystosowania się bakterii i wejście

w stan przetrwały lub VBNC. Znaczenie może mieć również specyficzne środowisko makrofagów, o czym wspomniano już we wstępie pracy (Helaine et al., 2014; Kaiser et al., 2014; Peyrusson et al., 2020).

W swojej pracy wykorzystałam sulforafan oraz ciecz głęboko eutektyczną jako związki potencjalnie eliminujące bakterie przetrwałe. Obecnie w literaturze nie ma dostępnych prac badających wpływ powyższych substancji na przeżywalność bakterii przetrwałych. Tworzenie biofilmu bakteryjnego *K. pneumoniae* odgrywa ważną rolę w indukcji powstawania bakterii przetrwałych, co w konsekwencji może prowadzić do nawrotu infekcji. Z tego powodu oceniłam zdolność tych związków w zwalczaniu bakterii przetrwałych powstałych w makrokoloniami. Wyniki przedstawione w tej pracy wskazują, że sulforafan w zależności od stężenia, szczepu i etapu doświadczenia na którym dodano sulforafan (razem z antybiotykiem lub po działaniu antybiotyku) może w różny sposób wpływać na poziom bakterii przetrwałych *K. pneumoniae*. Użycie sulforafanu (4×MIC) po wstępnej inkubacji *K. pneumoniae* z antybiotykiem całkowicie eliminowało bakterie przetrwałe (Rys. 39). Natomiast dodanie sulforafanu razem z antybiotykiem powodowało wzrost poziomu bakterii przetrwałych i znosiło efekt działania meropenemu (Rys. 38A,B). W tym przypadku prawdopodobnie następowała indukcja odpowiedzi ściślej u *K. pneumoniae* przez sulforafan (Nowicki et al., 2016), co stymulowało pojawianie się bakterii przetrwałych.

Eutektyki ze względu na właściwości bakteriobójcze, niski koszt produkcji, biodegradowalność oraz znikome właściwości toksyczne względem komórek ludzkich mają obiecujące zastosowanie w preparatach farmaceutycznych. Szereg badań wykazało, że różne ciecze głęboko eutektyczne mogą hamować powstawanie biofilmu (Nava-Ocampo et al., 2021; Nystedt et al., 2023; Silva et al., 2019). W pracach tych nie badano czy działanie eutektyków ma jakikolwiek wpływ na stan przetrwały i VBNC. Na podstawie wyników zaprezentowanych w tej pracy można stwierdzić, że działanie eutektyku w zależności od szczepu i obecności antybiotyku w różny sposób wpływa na poziom bakterii przetrwałych. Podobnie jak sulforafan, *Reline* może znosić efekt działania meropenemu powodując wzrost poziomu bakterii przetrwałych (Rys. 40). Dodanie *Reline* po wstępnej inkubacji z antybiotykiem, powodowało całkowitą eliminację bakterii. Warto jednak zwrócić uwagę, że wymagało to ponad 30 godzinnej inkubacji hodowli z eutektykiem (Rys. 41).

Chociaż wykonane przeze mnie doświadczenia miały wstępny charakter, uzyskane wyniki wykazały, że stosowanie izotiocyjanianów i cieczy głęboko eutektycznych może stanowić

poważny problem, jeżeli w trakcie terapii nie będzie kontrolowany poziom bakterii przetrwałych. Może też się okazać, że działanie izotiocyanianów i cieczy głęboko eutektycznych nie jest tak efektywne jak inne strategie zwalczania przetrwałych komórek *K. pneumoniae* opisane wcześniej we wstępie (Allison et al., 2011; Lee et al., 2019; Seo et al., 2024). Kontynuując badania należałoby oznaczyć poziom komórek VBNC oraz zastosować odpowiednie modele zwierzęce. Ważne jest również sprawdzenie kombinacji różnych stężeń isotiocyanianów lub eutektyków z antybiotykami, wykonanie testów typu *checkerboard* i wyznaczenie współczynnika FIC (*Fractional Inhibitory Concentration Index*), który umożliwia stwierdzenie czy badane kombinacje działają synergistycznie, antagonistycznie czy addytywnie.

3. Heterooporność *K. pneumoniae*

W populacji bakteryjnej charakteryzującej się heteroopornością można wyróżnić subpopulacje o różnym stopniu wrażliwości/oporności na antybiotyki. W odróżnieniu od bakterii przetrwałych szczepy heterooporne rosną w obecności antybiotyku. Wiele prac wskazuje, że heterooporność to częste zjawisko obserwowane wśród wielu gatunków bakterii (Band & Weiss, 2019; Dewachter et al., 2019). Jednym z najczęstszych przypadków u *K. pneumoniae* jest heterooporność na kolistynę. Kolistyna oddziałując z lipidem A lipopolisacharydu (LPS) wypiera jony Mg^{2+} i Ca^{2+} , co destabilizuje i zmienia przepuszczalność zewnętrznej błony komórkowej, skutkiem czego jest liza i śmierć komórki (El-Sayed Ahmed et al., 2020; Gogry et al., 2021). Kolistyna charakteryzuje się trzykrotnie większym powinowactwem do LPS niż dwuwartościowe jony Mg^{2+} i Ca^{2+} (Rhouma et al., 2016). U *K. pneumoniae* można wyróżnić kilka mechanizmów odpowiedzialnych za występowanie heterooporności na kolistynę, polegających głównie na dodaniu grup kationowych 4-amino-4-deoksy-L-arabinozy (L-Ara4N) i fosfoetanoloaminy (PEtN) do lipidu A (Elias et al., 2021; Sabnis et al., 2021). Ta modyfikacja może być wynikiem substytucji aminokwasowej (Asp191Tyr) w białku PhoP, które należy do dwuskładnikowego systemu PhoP-PhoQ. System PhoPQ reaguje na niskie stężenia Mg^{2+} , zmiany pH oraz peptydy przeciwdrobnoustrojowe, co skutkuje aktywacją i nadekspresją operonu *pmrHFIJKLM* odpowiedzialnego za syntezę L-Ara4N. W ostatnim etapie modyfikacji bierze udział transferaza PrmK. Dodanie L-Ara4N zmienia ładunek LPS wywołując oporność na kolistynę (Jayol et al., 2015). Aktywność układu PhoPQ jest zależna również od białka transbłonowego MgrB, będącego jego negatywnym regulatorem. Inaktywacja genu *mgrB* przez mutacje punktowe powoduje nadekspresję operonu *pmrHFIJKLM* lub skutkuje syntezą wielowarstwowej otoczki, która

uniemożliwia przenikanie kolistyny do wnętrza komórki bakteryjnej (Band & Weiss, 2019; Formosa et al., 2015). Heterooporność na kolistynę u *K. pneumoniae* może być także skutkiem mutacji punktowych w genach *pmrAB* lub *crrB*, kodujących również dwuskładnikowe systemy regulujące syntezę L-Ara4N oraz PetN (Cheong et al., 2019; Morales-León et al., 2020; Seo et al., 2021).

Utrzymanie heterooporności wymaga regulacji i aktywacji odpowiednich genów, jest więc dla komórki dodatkowym obciążeniem. Z tego powodu po usunięciu antybiotyku ze środowiska może dochodzić do zahamowania ekspresji genów zaangażowanych w heterooporność lub mutacji kompensacyjnych, dzięki którym bakterie powracają do wrażliwego fenotypu (Rys. 22) (Vogwill & Maclean, 2015). Do oznaczania heterooporności najczęściej stosowane są testy paskowe, krążkowo-dyfuzyjne oraz PAP. Test PAP uznany jest za „złoty standard” w określaniu heterooporności, ponieważ jest to ilościowa, powtarzalna i czuła metoda (Satola et al., 2011). Jednak ze względu na duży nakład pracy i czasu metoda ta nie ma zastosowania klinicznego w badaniach przesiewowych. Wykrycie heterooporności testami paskowymi lub krążkowo-dyfuzyjnymi polega na obserwacji pojedynczych kolonii w strefie zahamowania wzrostu, których pojawienie się zależne jest od częstości występowania subpopulacji opornych komórek. Istnieje szansa, że izolaty heterooporne o niskiej częstotliwości nie zostaną wykryte, co stanowi fałszywie negatywny wynik (El-Halfawy & Valvano, 2015; Sherman et al., 2019). Podsumowując, ze względu na niestabilność występowania, możliwość otrzymania różnych wyników w zależności od użytej metody detekcji oraz fakt, że zjawisko to dotyczy niewielkiej części populacji bakteryjnej trudno jest badać i wykryć szczepy heterooporne zarówno w warunkach szpitalnych jak i laboratoryjnych.

4. *Zróżnicowanie struktury makrokolonii*

Biofilm jest jedną ze strategii chroniących bakterie przed wysuszeniem, głównie dzięki obecności macierzy zewnątrzkomórkowej (EPS) (Eselin et al., 2018; Lebre et al., 2017). Jednak długotrwała inkubacja biofilmu powoduje stopniowe wysuszenie bakterii, co odzwierciedla naturalne warunki panujące np. na sprzętach medycznych lub związanych z przemysłem spożywczym. Dodatkowym argumentem skłaniającym do badań nad makrokoloniami jest wysoka heterogeniczność populacji – w środowisku biofilmu bakterie często tworzą subpopulacje o zróżnicowanym metabolizmie i tolerancji na czynniki stresowe (Jo et al., 2022; Yan & Bassler, 2019). Początkowo przyczynę zwiększonej tolerancji na antybiotyki wiązano

z zahamowaniem przenikania antybiotyków do wnętrza struktury biofilmu. Jednak wykazano, że mogą przenikać one przez macierz biofilmu (Kirker et al., 2014; Stewart et al., 2009). Obecnie przyczynę zwiększonej przeżywalności komórek tworzących biofilm na antybiotyki wiąże się ze zmianą fizjologii komórek i wejściu w stan uśpienia oraz występowaniem bakterii heteroopornych. Makrokolonie stanowią dobry model badawczy pozwalający na określenie struktury biofilmu. Morfologia makrokolonii bakterii jest zależna od obecności *curli* oraz celulozy. U *Enterobacteriaceae* geny odpowiedzialne za syntezę celulozy są kodowane przez operon *bcsABZC*, natomiast za ekspresję *curli* odpowiedzialny jest operon *csgBA* (Ahmad et al., 2016; Bandeira et al., 2017). Biosynteza *curli* i celulozy jest regulowana przez aktywator transkrypcji CsgD oraz cyklazę guanylanową AdrA (Bandeira et al., 2017; Zogaj et al., 2003). W szczepach delecyjnych $\Delta bscA$ makrokolonie na podłożu z kalkofluorem nie wykazują fluorescencji, natomiast szczep $\Delta csgA/B$ nie wiąże czerwieni Kongo (El Hag et al., 2017; Serra et al., 2013; Serra & Hengge, 2017). W moich badaniach przyporządkowanie określonych morfotypów do makrokolonie wybranych izolatów *K. pneumoniae* nie było jednoznaczne (Rys. 29). Wiązanie czerwieni Kongo, przy jednoczesnym braku fluorescencji wskazywał np. na obecność *curli* w subpopulacji pierścienia (ale nie centrum) *K. pneumoniae* 577-BA. Jednak analiza proteomiczna obu subpopulacji nie wykazała obecności głównego białka *curli* CsgA. Podobne wyniki, wskazujące na brak *curli* w szczepach klinicznych *K. pneumoniae* uzyskali Zogaj i wsp. (2003) oraz Anes i wsp. (2017). Co ciekawe, prezentowany morfotyp makrokolonii jest zależny od temperatury. Makrokolonie inkubowane w niższej temperaturze (25°C lub 28°C), charakteryzują się większym zróżnicowaniem oraz częstszą obecnością *curli* (Anes et al., 2017; Zogaj et al., 2003).

Tworzenie subpopulacji mukoidalnych i niemukoidalnych w obrębie makrokolonii tego samego izolatu klinicznego *K. pneumoniae* zostało wcześniej opisane przez Chiarelli i wsp. (2020). Wyniki zaprezentowane w tej pracy potwierdzają, że zdolność mukoidalnej subpopulacji do tworzenia niemukoidalnego pierścienia było zależne od badanego izolatu oraz czasu inkubacji makrokolonii. Podobnie, powstałe niemukoidalne subpopulacje zachowywały swój fenotyp podczas dalszych pasażi. Chiarelli i wsp. (2020) wykazali, że utrata mukoidalnego fenotypu jest związana z mutacjami (insercjami oraz mutacjami punktowymi w tym mutacjami nonsensowne i mutacjami typu *indel*) w genach *wcaJ*, *wzc*, *wzx* oraz *wzy*. U 87% badanych izolatów subpopulacje niemukoidalne charakteryzowały się niższym poziomem kwasu uronowego w porównaniu z odpowiednikiem mukoidalnym, wskazując, że utrata lub zmniejszenie syntezy otoczki jest odpowiedzialna za zmianę fenotypu. Forma niemukoidalna miała większą zdolność

do produkcji biofilmu. Obie subpopulacje różniły się ponadto wrażliwością na wybrane antybiotyki. U 50% testowanych izolatów forma niemukoidalna wykazała większą wrażliwość na testowane karbapenemy (meropenem, imipenem i ertapenem). Co ciekawe, niemukoidalny wariant izolatu CNR152A1 był bardziej odporny na działanie powyższych antybiotyków niż subpopulacja mukoidalna od której pochodził, prawdopodobnie na skutek utraty otoczki połączonej z mutacją w genie *wbbM*, który bierze udział w syntezie antygenu O. Z kolei na podstawie analizy sekwencji genomu Lee i wsp. (2018) stwierdzili, że powstanie formy niemukoidalnej jest związane z insercjami w genach należących do operonu *cps* lub substytucją jednego aminokwasu w genie *wcaJ*. U mutantów delecyjnych Δwza , $\Delta wz b$ oraz $\Delta wz c$ *K. pneumoniae* stwierdzono brak bądź zmniejszenie produkcji otoczki, co odpowiada formie niemukoidalnej. Dodatkowo utrata powyższych genów wiązała się ze zmniejszoną zjadliwością i wyższą podatnością na fagocytozę przez neutrofile (Lin et al., 2017). Brak otoczki i szorstki morfotyp kolonii został również zaobserwowany u *K. pneumoniae* z uszkodzonym genem *wcaJ*, który jest odpowiedzialny za syntezę kwasu kolanowego (Cai et al., 2019; Pal et al., 2019). Mutant ten w mniejszym stopniu aktywował makrofagi przez co mniej skutecznie ulegał fagocytozie w porównaniu ze szczepem tworzącym otoczkę oraz produkował więcej biofilmu na powierzchni abiotycznej (Pal et al., 2019). Całkiem inne wyniki zaprezentowali Lee i wsp. (2018), który wykazał, że forma niemukoidalna wybranych izolatów *K. pneumoniae* charakteryzowała się obniżoną wirulencją oraz zmniejszonym poziomem biofilmu. Liczne subpopulacje pochodzące z tej samej makrokolonii hodowanej na podłożu stałym zostały zaobserwowane u *Enterobacter hormaechei* subsp. *oharae* (Brust et al., 2019). Różniły się one wartościami MIC dla meropenemu, ceftazydemu, cyprofloksacyny oraz gentamycyny. Zwiększona wrażliwość na meropenem była związana z utratą genu *bla_{NDM-1}* kodującego metalo- β -laktamazę NDM (ang. *New Delhi metallo- β -lactamases-1*), będącą jedną z kluczowych karbapenemaz odpowiedzialnych za zakażenia szpitalne (Dortet et al., 2014). Subpopulacje pochodzące z jednej makrokolonii, które posiadały aktywny gen *mrkB* (związany z syntezą fimbrii typu 3), były w stanie tworzyć biofilm bakteryjny w przeciwieństwie do subpopulacji z delecją tego genu. Analizowane subpopulacje różniły się także zdolnością do infekowania larw *Galleria mellonella*.

Wyniki przedstawione w tej pracy (zebrane w Tab. 10) oraz dane literaturowe wskazują, że izolaty kliniczne *K. pneumoniae* mogą tworzyć zróżnicowane subpopulacje o różnej wrażliwości na antybiotyki, poziomie bakterii przetrwałych oraz heteroopornych, co może być przyczyną trudności w zwalczaniu i leczeniu infekcji bakteryjnych. Aby ustalić co jest przyczyną takiego zróżnicowania w makrokoloniiach *K. pneumoniae* 577-BA niezbędne jest sekwencjonowanie DNA

obu subpopulacji. Należy też zauważyć, że pomimo tak wyraźnych różnic między centrum a pierścieniem (Tab. 10) po przeniesieniu bakterii do świeżej pożywki lub na podłoże stałe obie subpopulacje charakteryzowały się zbliżoną długością fazy lag i podobnym tempem wzrostu (Rys. 33 i 34).

Tab. 10. Różnice między subpopulacjami centrum i pierścienia makrokolonii *K. pneumoniae* 577-BA.
^{a)} 100% odpowiada całkowitej liczbie komórek przed dodaniem antybiotyku; ^{b)} 100% - CFU/ml przed dodaniem kolistyny j.u. - jednostki umowne.

	Centrum	Pierścień
Wiązanie kalkofluoru (produkcja celulozy)	+	-
Wiązanie czerwieni Kongo (produkcja celulozy i <i>curli</i>)	-	+?
Bakterie przetrwałe + VBNC (%) ^a	88	77
Heterooporność na kolistynę (%) ^b	0,1	0,003
Białka rybosomalne	+	+++
GrcA (j.u)	2,4	1
Poziom CML (j.u)	2,5	0,5

5. Analiza danych proteomicznych - porównanie subpopulacji makrokolonii z hodowlą płynną

Powstawanie bakterii przetrwałych i VBNC może być związane ze zmniejszeniem liczby rybosomów w komórce, co może przejawiać się spadkiem poziomu białek rybosomalnych (Bruhn-Olszewska et al., 2018; Song & Wood, 2020). Spośród trzech badanych prób (kontrolna hodowla płynna, subpopulacje makrokolonii: centrum i pierścień) subpopulacja centrum charakteryzowała się najniższym poziomem białek rybosomalnych (Tab. 11) i najwyższą liczbą bakterii tolerujących antybiotyki (komórki VBNC + przetrwałe) (Rys. 30 i Rys. 31).

Tab. 11. Zmiana poziomu białek rybosomalnych w hodowli płynnej w stosunku do subpopulacji w makrokoloniach oraz subpopulacji centrum w stosunku do pierścienia.

Białko	Zmiana poziomu białka		
	Płynna vs pierścień	Płynna vs centrum	Centrum vs pierścień
L15	1,37	1,92	0,72
L16	1,27	2,09	0,61
L17	1,57	2,80	0,56
L18	1,07	1,93	0,55
L2	1,25	1,91	0,65
L20	1,95	3,40	0,57
L22	1,35	1,66	0,82
L27	1,49	2,14	0,69
L7/L12	1,51	1,49	1,02
S12	1,34	3,30	0,40
S13	1,68	3,77	0,44
S18	1,44	2,47	0,58
S20	0,96	2,90	0,33
S21	0,99	2,52	0,39
S3	1,69	1,91	0,94

Cho i wsp. (2015) wykazali, że w bakteriach przetrwałych *E. coli* translacja ulega spowolnieniu z powodu braku aktywnych rybosomów oraz degradacji rRNA i tRNA. Co więcej, stwierdzono, że bakterie przetrwałe *E. coli* zawierały mniej białek rybosomalnych (L25, S3, S5, S10, S11, S14 i S21) w porównaniu z wyjściową hodowlą. Tabela 12. przedstawia listę pozostałych białek, których poziom w badanych próbach różnił się znacząco (0,5-1,5 raza).

Tab. 12. Zmiana poziomu białek w hodowli płynnej w stosunku do subpopulacji makrokolonii.

	Białko	Zmiana poziomu białka		
		Płynna vs pierścień	Płynna vs centrum	Centrum vs pierścień
1	AacA4	0,50	0,53	0,90
2	AstD	2,30	1,85	1,20
3	DadA	0,60	0,45	1,33
4	DapA	0,48	0,47	1,00
5	DcyD	1,60	1,59	1,00
6	Def	1,50	1,15	1,30
7	FabA	1,56	1,96	0,80
8	GcvP	0,52	0,45	1,16
9	GlaH	0,55	0,40	1,36
10	GrcA	0,24	0,10	2,40
11	Hpf	0,26	0,34	0,76
12	HutH	1,56	0,77	2,03
13	HutU	0,96	0,47	2,04
14	IhfA	1,15	1,94	0,60
15	KatG	2,09	1,39	1,51
16	LamB	1,42	2,26	0,60
17	LpoB	1,52	2,06	0,70
18	MetK	0,81	0,53	1,52
19	MscL	0,64	0,40	1,58
20	NuoC	1,82	1,66	1,10
21	RraA	1,37	0,90	1,52
22	SpeA	1,00	0,63	1,61
23	SstT	1,14	0,42	2,73
24	SucC	0,44	0,48	0,90
25	Tsx	1,84	1,75	1,00
26	WrbA	1,59	1,98	0,80
27	ZapB	0,49	0,49	1,00

W tej grupie można wyróżnić:

1. białka, których poziom był wyraźnie niższy w hodowli płynnej niż w makrokoloniiach (zaznaczone na żółto),
2. białka, których poziom był wyraźnie wyższy w hodowli płynnej w porównaniu z makrokoloniami, (zaznaczone na zielono),
3. białka, których poziom był wyraźnie wyższy w centrum niż w pierścieniu (zaznaczone na niebiesko).

Białka, których poziom jest wyraźnie niższy w hodowli płynnej niż w makrokoloniiach (podane w nawiasach numery ID Uniprot odnoszą się do białek *K. pneumoniae* ATCC 700721 / MGH 78578)

AacA4 - [A6TIL5, *Aminoglycoside N(6')-acetyltransferase, Amikacin resistance protein, (AAC(6'))*], acetylotransferaza aminoglikozydowa; w szczepie *K. pneumoniae* ATCC 700721 / MGH

78578 kodowana przez gen *aacA4* znajdujący się na plazmidzie pKPN4 (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/A6TIL5/entry>). AacA4 katalizuje przeniesienie grupy acetylowej z acetylo-CoA na grupę aminową 6' w cząsteczce aminoglikozydu. W porównaniu z hodowlą płynną, podwyższony poziom AacA4 w makrokoloniach może mieć związek z większą liczbą komórek przetrwałych i VBNC tolerujących amikacynę produkowanych przez makrokolonie (Rys. 19A). Liczba bakterii tolerujących amikacynę (przetrwałych + VBNC) w centrum była wyraźnie wyższa niż w pierścieniu (Rys. 31A), mimo że obie subpopulacje charakteryzowały się podobnym poziomem AacA4 (Tab. 12.) Prawdopodobnie, oprócz AacA4 inne mechanizmy warunkują wzrost poziomu bakterii przetrwałych + VBNC w centrum. Możliwe, że aktywność acetylotransferazy była wyższa w subpopulacji centrum dzięki ochronnej funkcji białka GrcA (opisanego niżej).

DadA (A6TAW4) - dehydrogenaza/deaminaza D-aminokwasów, flawoproteina o szerokim spektrum substratów. D-aminokwasy są składnikami peptydoglikanu, odgrywają kluczową rolę w przebudowie ściany komórkowej podczas fazy stacjonarnej (Lam et al., 2009), są sygnałem inicjującym rozkład biofilmu (Kolodkin-Gal et al., 2010; Vahdati et al., 2022). Można przypuszczać, że wyższy poziom DadA (a więc niższy poziom D-aminokwasów) w makrokoloniach sprzyja stabilizacji struktury biofilmu, szczególnie w subpopulacji centrum (1,33 razy wyższy poziom DadA w centrum niż w pierścieniu).

DapA (A6TCA1) - syntaza hydroksytetrahydrodipikolinianu. Uczestniczy w biosyntezie lizyny i kwasu diaminopimelinowego, składnika ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P0A6L2/entry>). Wyższy poziom DapA w makrokoloniach może być związany z przebudową peptydoglikanu w trakcie formowania struktury biofilmu, co sugerują doświadczenia z *Pseudomonas aeruginosa* (Anderson et al., 2020).

GcvP (A6TDR5) - dehydrogenaza glicyny. Harden i wsp. (2015) sugerują, że GcvP może chronić komórki przed niskim pH. Uwalniany w trakcie reakcji dekarboksylacji glicyny amoniak umożliwiłby utrzymanie neutralnego pH w cytoplazmie. Do wyjaśnienia pozostaje czy bakterie w makrokoloniach są narażone na niskie pH i dlatego nadprodukcją GcvP.

GlaH (CsiD, A6T540) - hydroksylaza glutaranu; deoksygenaza przekształcająca glutaran w deoksyglutaran, enzym zaangażowany w katabolizm lizyny. U *E. coli* gen *csiD* jest częścią operonu (*csiD-lhgO-gabDTP*), który znajduje się pod kontrolą podjednostki sigma S, cAMP-CRP i LRP. Indukcja transkrypcji operonu zachodzi w trakcie stacjonarnej fazy wzrostu, w warunkach niedoboru węgla (Knorr et al., 2018). Można przypuszczać, że w trakcie późnej fazy wzrostu

makrokolonii bakterie (szczególnie te znajdujące się w centrum) są narażone na niedobór składników pokarmowych, co indukuje produkcję GluH.

Hpf (A6TEM2) - *Ribosome hibernation promoting factor*. W trakcie fazy stacjonarnej Hpf inicjuje dimeryzację rybosomów 70S prowadząc do zahamowania translacji. Song & Wood (2020) wykazali, że bakterie przetrwałe zawierają głównie nieaktywne rybosomy 100S. Powstawanie rybosomów 100S jest zależne nie tylko od Hpf, ale również od (p)ppGpp oraz dwóch dodatkowych białek RMF (*ribosome modulation factor*) i RaiA (*ribosome-associated inhibitor*). Wyższy poziom Hpf w makrokolonii może więc tłumaczyć dlaczego makrokolonie produkują więcej bakterii tolerujących antybiotyki (komórki przetrwałe + VBNC) niż hodowla płynna. Wiadomo, że Hpf chroni rybosomy 100S przed degradacją w komórkach *E. coli*. Hpf może pełnić podobną funkcję u *K. pneumoniae*. Warto zauważyć, że w centrum zarówno poziom Hpf jak i poziom większości białek rybosomalnych (Tab. 12.) są niższe niż w subpopulacji pierścienia.

SucC (A6T6F6) - enzym cyklu kwasu cytrynowego (TCA), podjednostka beta ligazy bursztynian-CoA. Katalizowana przez SucC hydroliza bursztynylo-CoA dostarcza ATP. Nadprodukcję enzymów cyklu kwasu cytrynowego stwierdzono w trakcie rozwoju biofilmu *Staphylococcus aureus* (Gaupp et al., 2010) i *Bacillus subtilis* (Pisithkul et al., 2019). Aktywacja TCA może być korzystna dla makrokolonii, ponieważ w warunkach niedoboru składników pokarmowych i tlenu TCA dostarcza komórce ATP oraz siły redukcyjnej w postaci NADH i FADH₂ (Gaupp et al., 2010).

ZapB (A6TFR0) - białko odpowiedzialne za podziały komórkowe, współpracuje z FtsZ podczas formowania pierścienia Z. Brakuje informacji o bezpośrednim związku ZapB z biofilmem lub bakteriami przetrwałymi. Można jedynie przypuszczać, że wyższy poziom ZapB w makrokolonii może przyspieszać podziały komórkowe i resuscytację bakterii przetrwałych/VBNC (stąd ich wyższy poziom w makrokolonii w porównaniu z pożywką płynną) oraz krótszą fazę lag po przeniesieniu komórek do świeżej pożywki (Rys. 33B).

Białka, których poziom jest wyższy w hodowli płynnej w porównaniu z makrokoloniami

AstD (A6T7T5) - dehydrogenaza semialdehydu sukcyloglutaminianu, uczestniczy w metabolizmie argininy. Guilhen i wsp. (2016) stwierdzili, że ilość transkryptu *astD* wzrasta w fazie stacjonarnej w hodowli planktonowej *K. pneumoniae*, natomiast w biofilmie pozostaje na poziomie porównywalnym z fazą logarytmiczną. Dane te są zgodne z uzyskanymi przeze mnie wynikami (Tab. 12.).

DcyD (A6TB69) - desulfhidraza D-cysteiny, w reakcji katalizowanej przez DcyD z D-cysteiny powstaje siarkowodór (wykorzystywany jako źródło siarki), amoniak i pirogronian. U *E. coli* syntaza DcyD (YedO) jest indukowana w odpowiedzi na niedobór siarki. DcyD chroni komórki przed toksycznym działaniem D-cysteiny, które polega na hamowaniu aktywności deaminazy treoniny (Soutourina et al., 2001).

Def (A6TEU0) - deformylaza peptydowa. Usuwa grupę formylową z N-końcowej reszty metioniny nowo-syntetyzowanego białka. U *E. coli* deformylaza (PDF) podczas translacji wiąże się do rybosomu w pobliżu białka L22, które znajduje się obok wyjścia z tunelu (McGrath et al., 2022). Prawdopodobnie niższy poziom Def i L22 w makrokolonii są ze sobą powiązane.

FabA (A6T748) - dehydrataza 3-hydroksydekanoilo-ACP (*acyl carrier protein*), uczestniczy w biosyntezie kwasów tłuszczowych. Ekspresja *fabA* u *E. coli* jest hamowana przez ppGpp/DksA (My et al., 2013). Być może również w makrokolonii *K. pneumoniae* wyższe stężenie ppGpp/DksA hamuje produkcję FabA.

IhfA (A6TAI1) - *Integration Host Factor, subunit alpha*. IHF wiąże DNA, uczestniczy w rekombinacji oraz kontroli transkrypcji i translacji. Nicolau & Lewis (2022) wykazali, że mutacja *ihf* powoduje nadprodukcję ATP i spadek liczby bakterii przetrwałych u *E. coli*. Natomiast delekcja *ihf* u *K. pneumoniae* jest związana z utratą zdolności tworzenia biofilmu (Fan et al., 2023). Uzyskane przeze mnie wyniki są częściowo zgodne z tymi obserwacjami. Warto zaznaczyć, że poziom IhfA był aż o 40% niższy w centrum (fold change 0,6) niż w pierścieniu. Mimo tego, poziom bakterii tolerujących antybiotyki (przetrwałych + VBNC) był najwyższy w centrum w porównaniu z pierścieniem i hodowlą płynną.

LamB (A6T5L4) - w formie trimeru tworzy pory w błonie zewnętrznej umożliwiając u *E. coli* dyfuzję maltodekstryny i innych cząsteczek hydrofilowych, w tym różnego rodzaju antybiotyków (Lin et al., 2014); jest również wykorzystywany jako receptor przez faga λ (Berkane et al., 2005). Obniżony poziom LamB może więc częściowo chronić makrokolonie przed bakteriofagiem λ oraz działaniem wybranych antybiotyków, co przejawia się wzrostem liczby bakterii przetrwałych i VBNC w porównaniu z hodowlą płynną (Rys. 19A, B).

LpoB (A6T7G4) - lipoproteina, regulator syntezy peptydoglikanu, niezbędny dla prawidłowego działania białka PBP1b (*penicillin binding protein 1B*), które jest odpowiedzialne za wbudowywanie D-aminokwasów do peptydoglikanu. Niższy poziom LpoB (podobnie jak większa ilość wcześniej opisanego DapA) w makrokolonii mogą mieć związek z przebudową peptydoglikanu w trakcie rozwoju tej formy biofilmu (Anderson et al., 2020).

NuoC (A6TBX2) - podjednostka C/D oksydoreduktazy NADH-ubichinon, składnik łańcucha transportu elektronów. Niższy poziom NuoC w makrokolonii może pośrednio chronić komórki przed stresem oksydacyjnym wywoływanym przez antybiotyki. Kohanski i wsp. (2007) wykazali, że produkcja reaktywnych form tlenu przez łańcuch transportu elektronów jest wspólnym dla różnych klas antybiotyków czynnikiem powodującym śmierć bakterii. Obniżona aktywność łańcucha transportu elektronów byłaby więc kolejnym sposobem, oprócz nadprodukcji GrcA, chroniącym makrokolonie przed ROS.

Tsx (A6T5E4) - kanał w błonie zewnętrznej transportujący do komórki nukleotydy oraz antybiotyk albicydynę – inhibitor gyrazy. Receptor bakteriofagów i kolicyn. Wykazano, że mutacje w Tsx powodują całkowitą oporność *E. coli* na wybrane bakteriofagi (Nieweglt & Bremer, 1997). Można więc przypuszczać, że makrokolonie dzięki obniżonemu poziomowi Tsx i LamB (o czym wspomniano wcześniej) mogą wykazywać mniejszą wrażliwość na bakteriofagi niż komórki z hodowli płynnej.

WrbA (A6T793) - dehydrogenaza NAD(P)H. Redukuje chinon do hydroksychinonu, co zapobiega oddziaływaniu semichinonu z O₂ i produkcji rodnika nadtlenkowego. Guilhen i wsp. (2016) również stwierdzili podwyższony poziom WrbA w komórkach planktonowych *K. pneumoniae* w stosunku do biofilmu. Ponadto wykazano, że brak WrbA u *E. coli* powoduje wzrost wrażliwości na ROS i zahamowanie tworzenia biofilmu (Rossi et al., 2021).

Białka, których poziom jest wyraźnie wyższy w centrum niż w pierścieniu

HutH (A6T6L1) – liaza histydynowa i **HutU** (A6T6L0) – hydratyzator urokianinu. U *K. pneumoniae* obecnych jest 6 genów odpowiedzialnych za przekształcanie histydyny do glutaminianu, amoniaku i mrówczanu: cztery geny kodujące enzymy HutU, HutH, HutI, HutG, gen *hutC* kodujący represor oraz *hutT* kodujący transporter urokianinu (Brameyer et al., 2022). W przypadku niektórych patogenów (*P. aeruginosa*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Xanthomonas oryzae*, *Brucella abortus*) geny *hut* są związane z wirulencją (Liang et al., 2018). Dostępne są nieliczne dane wskazujące na związek metabolizmu histydyny z biofilmem lub bakteriami przetrwałymi. Nadprodukcję hydratyzatora urokianinu wykryto w biofilmie *Stenotrophomonas maltophilia* (Di Bonaventura et al., 2023). Wykazano, że w szczepach *S. aureus* Δ *hemA* i Δ *hemB* nieprodukcujących hemu, poziom transkryptów *hutU* i *hutT* był znacznie obniżony, a powstawanie bakterii przetrwałych podczas stresu oksydacyjnego silnie zahamowane (Wang et al., 2021).

Z kolei, nadprodukcja HutU i HutI w szczepach *S. aureus* Δ hemA/B przywracała zdolność tworzenia bakterii przetrwałych.

MetK (A6TDV1) – syntaza S-adenozylometioniny (SAM), której substratami są metionina i ATP. Wykazano, że *metK* należy do genów, których ekspresja wzrasta podczas tworzenia biofilmu *E. coli* (Ren et al., 2004). *K. pneumoniae* wykorzystuje SAM między innymi do syntezy 4,5-dihydroksy-2,3-pentanodionu, prekursora autoinduktorów klasy 2(AI2), które biorą udział w zjawisku *quorum sensing* (Lazar et al., 2021). O roli *quorum sensing* w fizjologii bakterii wspomniano już we Wstępie. Brakuje jednak szczegółowych informacji o funkcji tego mechanizmu w powstawaniu biofilmu i bakterii przetrwałych/VBNC u *K. pneumoniae*. Warto zaznaczyć, że poziom liazy S-rybozylohomocysteinowej LuxS (YgaG, A6TCV3) uczestniczącej w syntezie AI2, był 1,3 razy wyższy w centrum niż w pierścieniu (Rys. 35). Wydaje się więc, że procesy zależne od AI2 (w tym powstawanie bakterii przetrwałych) zachodzą bardziej intensywnie w centrum niż w subpopulacji pierścienia.

MscL (A6TEU4) – kanał mechanoczuły reagujący na naprężenia w dwuwarstwie lipidowej; uczestniczy w regulacji ciśnienia osmotycznego w komórce. Lv i wsp. (2022) wykazali, że stosując szok hipotoniczny można uwrażliwić bakterie przetrwałe *E. coli* na antybiotyki aminoglikozydowe. Uszkodzenie błony cytoplazmatycznej przez szok powodowało aktywację kanałów MscL, przez które antybiotyki wnikały do wnętrza komórek przetrwałych. U *Actinobacillus pleuropneumoniae* MscL chroni komórki przed stresem osmotycznym, warunkuje wrażliwość na antybiotyki i dodatkowo bierze udział w tworzeniu biofilmu (Wan et al., 2024). MscL prawdopodobnie umożliwia wydzielanie białek z komórki, które stają się częścią EPS.

RraA (A6TGB9) – *Regulator of ribonuclease activity A*. RraA hamuje aktywność Rnazy E, która degradowuje większość RNA, w tym rRNA w komórce *E. coli* (Górna et al., 2010). Cho i wsp. (2015) wykazali, że w komórkach przetrwałych *E. coli* następuje powolna degradacja rRNA i rozkład rybosomów wynikający między innymi z podwyższonego poziomu RNAzy E. Być może proces ten zachodzi również u *K. pneumoniae* i jest częściowo hamowany w centrum makrokolonii dzięki nadprodukcji RraA.

SpeA (A6TDV0) – dekarboksylaza argininy, katalizuje biosyntezę agmatyny z argininy. U *E. coli* agmatyna jest wydzielana na zewnątrz powodując wzrost zewnątrzkomórkowego pH i chroniąc w ten sposób bakterie przed stresem związanym z kwaśnym pH (Brameyer et al., 2022). Synteza

wydzielanej agmatyny u *E. coli* jest jednak katalizowana przez inną dekarboksylazę argininy AdiA. Według bazy Uniprot, obecności AdiA u *K. pneumoniae* do tej pory nie stwierdzono.

SstT (A6TEC8) – symporter treoniny/seryny i Na⁺. W komórkach *E. coli* ekspresja *sstT* mRNA jest negatywnie regulowana przez sRNA GcvB. Po utworzeniu kompleksów *sstT* i sRNA docelowe mRNA (*sstT*) jest degradowane przez Rnażę E (Lalaoua et al., 2019). Ponieważ w centrum makrokolonii znajduje się więcej inhibitora Rnazy E -RraA, w porównaniu z subpopulacją pierścienia, mRNA *sstT* może być bardziej stabilne niż w subpopulacji pierścienia, co w efekcie prowadzi do nadprodukcji SstT.

Oddzielną kategorię mogą stanowić białka GrcA i KatG, których poziom znacznie różni się między hodowlą płynną i makrokoloniami, oraz między subpopulacjami centrum i pierścienia. Oba białka uczestniczą w ochronie komórek przed stresem oksydacyjnym, ale ich mechanizmy i miejsce działania (makrokolonie lub komórki planktonowe w hodowli płynnej) są różne.

KatG (A6T9H9) – dwufunkcyjny enzym katalaza-peroksydaza. Poziom KatG w hodowli płynnej był wyższy, odpowiednio dwukrotnie i 1,4 raza, w porównaniu z subpopulacjami pierścienia i centrum. KatG pełni funkcję wymiatacza H₂O₂, który jest efektem ubocznym metabolizmu tlenowego. Oprócz KatG, w komórkach *E. coli* podobną funkcję pełnią reduktaza wodorotlenku alkilu AhP i katalaza KatE (Liu et al., 2021).

GrcA/YfiD (A6TCJ1) *Autonomous glycyl radical cofactor*. Funkcja GrcA jest związana z aktywnością liazy pirogronian-mrówczan PflB. W trakcie przekształcania pirogronianu do mrówczanu i acetylo-CoA w miejscu aktywnym PflB powstaje rodnik glicyny. W obecności O₂ dochodzi do przecięcia łańcucha polipeptydowego w pobliżu rodnika i inaktywacji PflB. Rolą GrcA jest aktywacja utlenionej PflB i innych enzymów, w których pojawiają się rodniki glicyny (Bowman et al., 2019; Kammel & Sawers, 2022). Wzrost poziomu GrcA (YfiD) sugeruje, że w starzejących się makrokoloniach (szczególnie w ich centrum) zostały uruchomione mechanizmy chroniące bakterie przed stresem oksydacyjnym (Wagner et al., 2001). Stres oksydacyjny w centrum może mieć związek z podwyższonym poziomem produktów glikacji (Rys. 10 i 32). Poziom GrcA był aż 10-krotnie (4-krotnie) wyższy w centrum (pierścieniu) makrokolonii niż w hodowli płynnej, oraz 2,4 razy wyższy w centrum w porównaniu z pierścieniem makrokolonii.

Podsumowując wyniki uzyskane w tej pracy:

1. wykazano, że podczas wysuszania i rehydracji *E. coli* wewnątrzkomórkowe białka ulegają agregacji, co wiąże się ze wzrostem poziomu bakterii przetrwałych;
2. stwierdzono, że podczas stresu związanego z wysuszaniem/rehydracją poziom produktów glikacji w komórkach *E. coli* również rośnie, ale większość produktów glikacji znajduje się w frakcji rozpuszczalnej i nie ulega agregacji, co nie potwierdza wcześniejszych założeń (Rys. 10.);
3. uzyskane wyniki sugerują, że agregaty białkowe prawdopodobnie pełnią rolę ochronną w komórkach *E. coli* podczas warunków stresowych;
4. środowiskiem szczególnie sprzyjającym powstawaniu bakterii przetrwałych u *E. coli* i *K. pneumoniae* są makrokolonie;
5. izolaty kliniczne *K. pneumoniae* mogą tworzyć dwie odrębne subpopulacje w makrokoloniach, które różnią się poziomem bakterii tolerujących antybiotyki i heteroopornych, poziomem produktów glikacji oraz profilem białkowym.

Na podstawie analiz proteomicznych stwierdzono, że:

- a) wyższy poziom bakterii przetrwałych + VBNC w makrokoloniach w porównaniu z hodowlą płynną (oraz w subpopulacji centrum w porównaniu z subpopulacją pierścienia) może być związany pośrednio lub bezpośrednio z mniejszą liczbą rybosomów i nadprodukcją czynnika hibernacji rybosomów Hpf;
- b) inne zidentyfikowane białka różnicowe również mogą mieć związek ze stanem przetrwałym i VBNC (IhfA, HutH/U, LamB, MscL) lub resuscytacją uśpionych komórek (SucC, ZapB),
- c) makrokolonie nadprodukują białka, które mogą pełnić funkcje ochronne w różnych warunkach stresowych (np. w trakcie działania antybiotyków): GrcA, AacA4, GcvP, MscL, SpeA, ZapB.
- d) pozostałe zidentyfikowane białka różnicowe uczestniczą w przebudowie peptydoglikanu (DapA, DadA, LpoB) lub w formowaniu biofilmu (AstD, MetK, MscL, WrbA).

6. Wpływ sulforafanu i *Reline* na bakterie przetrwałe *K. pneumoniae* jest zależny od użytego stężenia, izolatu klinicznego i czasu inkubacji. Potencjalne zastosowanie sulforafanu i *Reline* do eliminacji bakterii przetrwałych wymaga dalszych badań.

DOROBEK NAUKOWY

Wyniki opisane w tej pracy zostały opublikowane w czasopiśmie *Microbiological Research*:

Łupkowska A, Monem S, Dębski J, Stojowska-Swędrzyńska K, Kuczyńska-Wiśnik D, Laskowska E. Protein aggregation and glycation in *Escherichia coli* exposed to desiccation-rehydration stress. *Microbiol Res.* 2023, 270:127335. doi: 10.1016/j.micres.2023.127335. (IF-6,7; 100 punktów MNiSW)

oraz prezentowane na konferencjach:

1. **Łupkowska Adrianna**, Stojowska-Swędrzyńska Karolina, Kuczyńska-Wiśnik Dorota, Musiał Natalia, Czaplewska Paulina, Laskowska Ewa. Formation of *K. pneumoniae* subpopulations differing in antibiotic tolerance. 2nd International Conference TRR 261 "Cellular Mechanisms of Antibiotic Action and Production". Bad Boll, Niemcy 2023.
2. **Łupkowska Adrianna**. Resistant, heteroresistant and persister cells are responsible for *Klebsiella pneumoniae* therapy failure. III Kongres Młodej Nauki, Gdańsk 2023.
3. **Łupkowska Adrianna**. Desiccation stress induces protein glycation and aggregation in *Escherichia coli*, 2022, II Kongres Młodej Nauki, Gdańsk 2022.

Badania dotyczące *K. pneumoniae* wykonano w ramach projektu NCN 2018/29/Z/NZ6/01040 „Fighting antibiotic-resistant superbugs with anti-persister compounds targeting the stringent response” (Joint Programming Initiative on Antimicrobial Resistance JPI EC AMR Call 2018).

Pozostały dorobek naukowy:

1. Stojowska-Swędrzyńska K, **Łupkowska A**, Kuczyńska-Wiśnik D, Laskowska E. Antibiotic Heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Mol Sci.* 2021, 23(1):449. doi: 10.3390/ijms23010449.
2. Monem S, Furmanek-Błaszczak B, **Łupkowska A**, Kuczyńska-Wiśnik D, Stojowska-Swędrzyńska K, Laskowska E. Mechanisms Protecting „*Acinetobacter baumannii*” against Multiple Stresses Triggered by the Host Immune Response, Antibiotics and Outside-Host Environment. *Int J Mol Sci.* 2020 Jul 31;21(15):5498. doi: 10.3390/ijms21155498.

9. LITERATURA

Abbott, A. P., Capper, G., Davies, D. L., Rasheed, R. K., & Tambyrajah, V. (2003). Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chemical Communications*, 1, 70–71. <https://doi.org/10.1039/b210714g>

Abokhalil, R. N., Elkhatib, W. F., Aboulwafa, M. M., & Hassouna, N. A. (2020). Persisters of *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis*: A Common Phenomenon and Different Behavior Profiles. *Current Microbiology*, 77(7), 1233–1244. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-01926-3>

Aguilar, C., Vlamakis, H., Losick, R., & Kolter, R. (2007). Thinking about *Bacillus subtilis* as a multicellular organism. *Current Opinion in Microbiology* 10(6), 638–643. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.09.006>

Ahmad, I., Rouf, S. F., Sun, L., Cimdins, A., Shafeeq, S., Guyon, S., Schottkowski, M., Rhen, M., & Römling, U. (2016). BcsZ inhibits biofilm phenotypes and promotes virulence by blocking cellulose production in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbial Cell Factories*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0576-6>

Aires, A., Mota, V. R., Saavedra, M. J., Rosa, E. A. S., & Bennett, R. N. (2009). The antimicrobial effects of glucosinolates and their respective enzymatic hydrolysis products on bacteria isolated from the human intestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, 106(6), 2086–2095. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04180.x>

Akbar, N., Khan, N. A., Ibrahim, T., Khamis, M., Khan, A. S., Alharbi, A. M., Alfahemi, H., & Siddiqui, R. (2023). Antimicrobial Activity of Novel Deep Eutectic Solvents. *Scientia Pharmaceutica*, 91(1). <https://doi.org/10.3390/scipharm91010009>

Alberti, S., Gladfelter, A., & Mittag, T. (2019). Considerations and Challenges in Studying Liquid-Liquid Phase Separation and Biomolecular Condensates. *Cell*, 176(3), 419–434. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.12.035>

Alberti, S., Lvarez, D., Merino, S., Casado, M. T., Vivanco, F., Tomas, J. M., & Benedi, V. J. (1996). Analysis of Complement C3 Deposition and Degradation on *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 64(11), 4726–4732.

Allegretta, G., Maurer, C. K., Eberhard, J., Maura, D., Hartmann, R. W., Rahme, L., & Empting, M. (2017). In-depth profiling of MvfR-regulated small molecules in *Pseudomonas aeruginosa* after Quorum Sensing inhibitor treatment. *Frontiers in Microbiology*, 24;8:924. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00924>

Allen, B. L., Gerlach, G.-F., & Clegg, S. (1991). Nucleotide Sequence and Functions of mrk Determinants Necessary for Expression of Type 3 Fimbriae in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, 173(2):916-20. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.916-920.1991>

Allison, K. R., Brynildsen, M. P., & Collins, J. J. (2011). Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides. *Nature*, 473(7346), 216–220. <https://doi.org/10.1038/nature10069>

Alonso, D. A., Baeza, A., Chinchilla, R., Guillena, G., Pastor, I. M., & Ramón, D. J. (2016). Deep Eutectic Solvents: The Organic Reaction Medium of the Century. *European Journal of Organic Chemistry* 4, 612–632. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201501197>

Amato, S. M., Orman, M. A., & Brynildsen, M. P. (2013). Metabolic Control of Persister Formation in *Escherichia coli*. *Molecular Cell*, 50(4), 475–487. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.04.002>

- Anderson, E. M., Sychantha, D., Brewer, D., Clarke, A. J., Geddes-McAlister, J., & Khursigara, C. M. (2020). Peptidoglycomics reveals compositional changes in peptidoglycan between biofilm- And planktonic-derived *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*, 295(2), 504–516. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010505>
- Anes, J., Hurley, D., Martins, M., & Fanning, S. (2017). Exploring the genome and phenotype of multi-drug resistant *Klebsiella Pneumoniae* Of clinical origin. *Frontiers in Microbiology*, 8 :1913. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01913>
- Atkinson, G. C., Tenson, T., & Hauryliuk, V. (2011). The RelA/SpoT Homolog (RSH) superfamily: Distribution and functional evolution of ppppp synthetases and hydrolases across the tree of life. *PLoS ONE*, 6(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023479>
- Ayrapetyan, M., Williams, T. C., & Oliver, J. D. (2014). Interspecific quorum sensing mediates the resuscitation of viable but nonculturable vibrios. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(8), 2478–2483. <https://doi.org/10.1128/AEM.00080-14>
- Ayrapetyan, M., Williams, T., & Oliver, J. D. (2018). Relationship between the viable but nonculturable state and antibiotic persister cells. *Journal of Bacteriology*, 200(20). <https://doi.org/10.1128/JB.00249-18>
- Baek, M. S., Chung, E. S., Jung, D. S., & Ko, K. S. (2020). Effect of colistin-based antibiotic combinations on the eradication of persister cells in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(4), 917–924. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz552>
- Baharoglu, Z., & Mazel, D. (2014). SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(6), 1126–1145. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12077>
- Balaban, N. Q. (2011). Persistence: Mechanisms for triggering and enhancing phenotypic variability. *Current Opinion in Genetics and Development*, 21(6), 768–775. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2011.10.001>
- Balaban, N. Q., Helaine, S., Lewis, K., Ackermann, M., Aldridge, B., Andersson, D. I., Brynildsen, M. P., Bumann, D., Camilli, A., Collins, J. J., Dehio, C., Fortune, S., Ghigo, J. M., Hardt, W. D., Harms, A., Heinemann, M., Hung, D. T., Jenal, U., Levin, B. R., Zinkernagel, A. (2019). Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. *Nature Reviews Microbiology*, 17(7), 441–448. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0196-3>
- Band, V. I., & Weiss, D. S. (2019). Heteroresistance: A cause of unexplained antibiotic treatment failure? *PLoS Pathogens*, 15(6). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007726>
- Bandeira, M., Borges, V., Gomes, J. P., Duarte, A., & Jordao, L. (2017). Insights on *Klebsiella pneumoniae* biofilms assembled on different surfaces using phenotypic and genotypic approaches. *Microorganisms*, 5(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms5020016>
- Barras, F., Aussel, L., & Ezraty, B. (2018). Silver and antibiotic, new facts to an old story. *Antibiotics*, 7(3). <https://doi.org/10.3390/antibiotics7030079>
- Berkane, E., Orlik, F., Charbit, A., Danelon, C., Fournier, D., Benz, R., & Winterhalter, M. (2005). Nanopores: Maltoporin channel as a sensor for maltodextrin and lambda-phage. *Journal of Nanobiotechnology*, 3. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-3-3>
- Bernier, S. P., Lebeaux, D., DeFrancesco, A. S., Valomon, A., Soubigou, G., Coppée, J. Y., Ghigo, J. M., & Beloin, C. (2013). Starvation, Together with the SOS Response, Mediates High Biofilm-Specific Tolerance to the Fluoroquinolone Ofloxacin. *PLoS Genetics*, 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003144>

- Bigger J. W. (1944) Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation. *Lancet*, 244 497–500. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)74210-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)74210-3)
- Bokranz, W., Wang, X., Tschäpe, H., & Römling, U. (2005). Expression of cellulose and curli fimbriae by *Escherichia coli* isolated from the gastrointestinal tract. *Journal of Medical Microbiology*, 54(12), 1171–1182. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46064-0>
- Bollen, C., Dewachter, L., & Michiels, J. (2021). Protein Aggregation as a Bacterial Strategy to Survive Antibiotic Treatment. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.669664>
- Boteva, E., & Mironova, R. (2019). Maillard reaction and aging: can bacteria shed light on the link? *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 33(1), 481–497. <https://doi.org/10.1080/13102818.2019.1590160>
- Bowman, S. E. J., Backman, L. R. F., Bjork, R. E., Andorfer, M. C., Yori, S., Caruso, A., Stultz, C. M., & Drennan, C. L. (2019). Solution structure and biochemical characterization of a spare part protein that restores activity to an oxygen-damaged glycol radical enzyme. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 24(6), 817–829. <https://doi.org/10.1007/s00775-019-01681-2>
- Brameyer, S., Schumacher, K., Kuppermann, S., & Jung, K. (2022). Division of labor and collective functionality in *Escherichia coli* under acid stress. *Communications Biology*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03281-4>
- Bruhn-Olszewska, B., Szczepaniak, P., Matuszewska, E., Kuczyńska-Wiśnik, D., Stojowska-Swędryńska, K., Moruno Algara, M., & Laskowska, E. (2018). Physiologically distinct subpopulations formed in *Escherichia coli* cultures in response to heat shock. *Microbiological Research*, 209, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.02.002>
- Brust, F. R., Boff, L., Trentin, D. D. S., Pedrotti Rozales, F., Luís Barth, A., & Macedo, A. J. (2019). Macrocolony of ndm-1 producing enterobacter hormaechei subsp. Oharae generates subpopulations with different features regarding the response of antimicrobial agents and biofilm formation. *Pathogens*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/pathogens8020049>
- Cai, R., Wang, G., Le, S., Wu, M., Cheng, M., Guo, Z., Ji, Y., Xi, H., Zhao, C., Wang, X., Xue, Y., Wang, Z., Zhang, H., Fu, Y., Sun, C., Feng, X., Lei, L., Yang, Y., Ur Rahman, S., Gu, J. (2019). Three capsular polysaccharide synthesis-related glucosyltransferases, GT-1, GT-2 and WcaI, are associated with virulence and phage sensitivity of *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01189>
- Cano, V., March, C., Insua, J. L., Aguiló, N., Llobet, E., Moranta, D., Regueiro, V., Brennan, G. P., Millán-Lou, M. I., Martín, C., Garmendia, J., & Bengoechea, J. A. (2015). *Klebsiella pneumoniae* survives within macrophages by avoiding delivery to lysosomes. *Cellular Microbiology*, 17(11), 1537–1560. <https://doi.org/10.1111/cmi.12466>
- Chakrabortee, S., Boschetti, C., Walton, L. J., Sarkar, S., Rubinsztein, D. C., & Tunnacliffe, A. (2007). Hydrophilic protein associated with desiccation tolerance exhibits broad protein stabilization function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 13;104(46):18073-8. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706964104>
- Chaturvedi, S. K., Siddiqi, M. K., Alam, P., & Khan, R. H. (2016). Protein misfolding and aggregation: Mechanism, factors and detection. *Process Biochemistry*, 51(9), 1183–1192. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.05.015>

- Chen, M., Yu, Q., & Sun, H. (2013). Novel strategies for the prevention and treatment of biofilm related infections. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), 18488–18501. <https://doi.org/10.3390/ijms140918488>
- Cheong, H. S., Kim, S. Y., Wi, Y. M., Peck, K. R., & Ko, K. S. (2019). Colistin heteroresistance in *Klebsiella Pneumoniae* isolates and diverse mutations of PmrAB and PhoPQ in resistant subpopulations. *Journal of Clinical Medicine*, 8(9). <https://doi.org/10.3390/jcm8091444>
- Chiaramello, A. E., & Zyskind, J. W. (1990). Coupling of DNA Replication to Growth Rate in *Escherichia coli*: a Possible Role for Guanosine Tetraphosphate. *Journal of Bacteriology*, 172(4):2013-9. <https://doi.org/10.1128/jb.172.4.2013-2019.1990>
- Chiarelli, A., Cabanel, N., Rosinski-Chupin, I., Zongo, P. D., Naas, T., Bonnin, R. A., & Glaser, P. (2020). Diversity of mucoid to non-mucoid switch among carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *BMC Microbiology*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-020-02007-y>
- Cho, J., Rogers, J., Kearns, M., Leslie, M., Hartson, S. D., & Wilson, K. S. (2015). *Escherichia coli* persister cells suppress translation by selectively disassembling and degrading their ribosomes. *Molecular Microbiology*, 95(2), 352–364. <https://doi.org/10.1111/mmi.12884>
- Choby, J. E., Howard-Anderson, J., & Weiss, D. S. (2020). Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* – clinical and molecular perspectives. *Journal of Internal Medicine* 287(3), 283–300. <https://doi.org/10.1111/joim.13007>
- Chowdhury, N., Kwan, B. W., & Wood, T. K. (2016). Persistence Increases in the Absence of the Alarmone Guanosine Tetraphosphate by Reducing Cell Growth. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep20519>
- Clements, A., Tull, D., Jenney, A. W., Farn, J. L., Kim, S. H., Bishop, R. E., McPhee, J. B., Hancock, R. E. W., Hartland, E. L., Pearse, M. J., Wijburg, O. L. C., Jackson, D. C., McConville, M. J., & Strugnell, R. A. (2007). Secondary acylation of *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide contributes to sensitivity to antibacterial peptides. *Journal of Biological Chemistry*, 282(21), 15569–15577. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701454200>
- Cohen, N. R., Lobritz, M. A., & Collins, J. J. (2013). Microbial persistence and the road to drug resistance. *Cell Host and Microbe*, 13(6), 632–642. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.05.009>
- Cohen-Or, I., Katz, C., & Ron, E. Z. (2013). Metabolism of AGEs - Bacterial AGEs Are Degraded by Metallo-Proteases. *PLoS ONE*, 8(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074970>
- Conlon, B. P., Rowe, S. E., Gandt, A. B., Nuxoll, A. S., Donegan, N. P., Zalis, E. A., Clair, G., Adkins, J. N., Cheung, A. L., & Lewis, K. (2016). Persister formation in *Staphylococcus aureus* is associated with ATP depletion. *Nature Microbiology*, 1(5). <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.51>
- Cornelissen, C. N. (2003). Transferrin-iron uptake by Gram-negative bacteria. *Frontiers in Bioscience*, 1(8), 36-47. <https://doi.org/10.2741/1076>.
- Cruz, A., Condinho, M., Carvalho, B., Arraiano, C. M., Pobre, V., & Pinto, S. N. (2021). The two weapons against bacterial biofilms: Detection and treatment. *Antibiotics*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121482>
- Dadole, I., Blaha, D., & Personnic, N. (2024). The macrophage–bacterium mismatch in persister formation. *Trends in Microbiology*, 4. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2024.02.009>
- Dahl, J. U., Gray, M. J., & Jakob, U. (2015). Protein quality control under oxidative stress conditions. *Journal of Molecular Biology*, 427(7), 1549–1563. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.02.014>

- Defraigne, V., Fauvart, M., & Michiels, J. (2018). Fighting bacterial persistence: Current and emerging anti-persister strategies and therapeutics. *Drug Resistance Updates*, 38, 12–26. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2018.03.002>
- Demarre, G. Ile, Prudent, V., Schenk, H., Rousseau, E., Bringer, M. A., Barnich, N., Van Nhieu, G. T., Rimsky, S., De Monte, S., & Espéli, O. (2019). The Crohn's disease-Associated Escherichia coli strain LF82 relies on SOS and stringent responses to survive, multiply and tolerate antibiotics within macrophages. *PLoS Pathogens*, 15(11). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008123>
- Dewachter, L., Bollen, C., Wilmaerts, D., Louwagie, E., Herpels, P., Matthay, P., Khodaparast, L., Khodaparast, L., Rousseau, F., Schymkowitz, J., & Michiels, J. (2021). *The dynamic transition of persistence towards the VBNC state during stationary phase is driven by protein aggregation*. <https://doi.org/10.1101/2021.02.15.431274>
- Dewachter, L., Fauvart, M., & Michiels, J. (2019). Bacterial Heterogeneity and Antibiotic Survival: Understanding and Combatting Persistence and Heteroresistance. *Molecular Cell* 76(2), 255–267. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.09.028>
- Di Bonaventura, G., Picciani, C., Lupetti, V., & Pompilio, A. (2023). Comparative Proteomic Analysis of Protein Patterns of *Stenotrophomonas maltophilia* in Biofilm and Planktonic Lifestyles. *Microorganisms*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020442>
- Diamant, S., Eliahu, N., Rosenthal, D., & Goloubinoff, P. (2001). Chemical Chaperones Regulate Molecular Chaperones in Vitro and in Cells under Combined Salt and Heat Stresses. *Journal of Biological Chemistry*, 276(43), 39586–39591. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103081200>
- Dimitrova, R., Mironova, R., & Ivanov, I. (2004). Glycation of proteins in escherichia coli: Effect of nutrient broth ingredients on glycation. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 18(2), 99–103. <https://doi.org/10.1080/13102818.2004.10817094>
- Dörr, T., Vulić, M., & Lewis, K. (2010). Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in Escherichia coli. *PLoS Biology*, 8(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000317>
- Dortet, L., Poirel, L., & Nordmann, P. (2014). Worldwide dissemination of the NDM-Type carbapenemases in Gram-negative bacteria. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/249856>
- Drlica, K., Malik, M., Kerns, R. J., & Zhao, X. (2008). Quinolone-mediated bacterial death. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52(2), 385–392. <https://doi.org/10.1128/AAC.01617-06>
- Ducrot, A., Chabalier, M., & Dukan, S. (2014). *Characterization and resuscitation of "non-culturable" cells of Legionella pneumophila*. <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/14/3>
- El Hag, M., Feng, Z., Su, Y., Wang, X., Yassin, A., Chen, S., Peng, D., & Liu, X. (2017). Contribution of the csgA and bcsA genes to Salmonella enterica serovar Pullorum biofilm formation and virulence. *Avian Pathology*, 46(5), 541–547. <https://doi.org/10.1080/03079457.2017.1324198>
- Elemam, A., Rahimian, J., & Mandell, W. (2009). Infection with panresistant Klebsiella pneumoniae: A report of 2 cases and a brief review of the literature. *Clinical Infectious Diseases*, 49(2), 271–274. <https://doi.org/10.1086/600042>
- El-Halfawy, O. M., & Valvano, M. A. (2015). Antimicrobial Heteroresistance: an Emerging Field in Need of Clarity. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(1):191-207. <https://doi.org/10.1128/CMR>

- Elias, R., Duarte, A., & Perdigão, J. (2021). A molecular perspective on colistin and *Klebsiella pneumoniae*: Mode of action, resistance genetics, and phenotypic susceptibility. *Diagnostics* 11(7). <https://doi.org/10.3390/diagnostics11071165>
- El-Sayed Ahmed, M. A. E. G., Zhong, L. L., Shen, C., Yang, Y., Doi, Y., & Tian, G. B. (2020). Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: an extended review (2000–2019). *Emerging Microbes and Infections*, 9(1), 868–885. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1754133>
- Esbelin, J., Santos, T., & Hébraud, M. (2018). Desiccation: An environmental and food industry stress that bacteria commonly face. *Food Microbiology* 69, 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.07.017>
- Fan, Z., Fu, T., Li, Z., Du, B., Cui, X., Zhang, R., Feng, Y., Zhao, H., Xue, G., Cui, J., Yan, C., Gan, L., Feng, J., Xu, Z., Yu, Z., Tian, Z., Ding, Z., Chen, J., Chen, Y., & Yuan, J. (2023). The role of integration host factor in biofilm and virulence of high-alcohol-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology Spectrum*, 11(5). <https://doi.org/10.1128/spectrum.01170-23>
- Feng, Z., Chen, X., Wu, X., & Zhang, M. (2019). Formation of biological condensates via phase separation: Characteristics, analytical methods, and physiological implications. *Journal of Biological Chemistry* 294(40), 14823–14835. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.007895>
- Ferreira, C., & Sarraguça, M. (2024). A Comprehensive Review on Deep Eutectic Solvents and Its Use to Extract Bioactive Compounds of Pharmaceutical Interest. *Pharmaceuticals* 17(1). <https://doi.org/10.3390/ph17010124>
- Fink, A. L. (1998). Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Fold Des.* 3(1), 9-23. [https://doi.org/10.1016/S1359-0278\(98\)00002-9](https://doi.org/10.1016/S1359-0278(98)00002-9)
- Finkelstein, R. A., Sciortino, C. V., & McIntosh, M. A. (1983). Role of Iron in Microbe-Host Interactions. *Reviews of Infectious Diseases*, 5 Suppl 4:S759-77. doi: 10.1093/clinids/5.supplement_4.s759
- Formosa, C., Herold, M., Vidailiac, C., Duval, R. E., & Dague, E. (2015). Unravelling of a mechanism of resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae* using atomic force microscopy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(8), 2261–2270. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv118>
- Foster, P. L. (2007). Stress-induced mutagenesis in bacteria. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 42(5), 373–397. <https://doi.org/10.1080/10409230701648494>
- Fournet, M., Bonté, F., & Desmoulière, A. (2018). Glycation damage: A possible hub for major pathophysiological disorders and aging. *Aging and Disease*, 9(5), 880–900. <https://doi.org/10.14336/AD.2017.1121>
- Fung, D. K. C., Chan, E. W. C., Chin, M. L., & Chan, R. C. Y. (2010). Delineation of a bacterial starvation stress response network which can mediate antibiotic tolerance development. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), 1082–1093. <https://doi.org/10.1128/AAC.01218-09>
- Ganin, H., Rayo, J., Amara, N., Levy, N., Krief, P., & Meijler, M. M. (2013). Sulforaphane and erucin, natural isothiocyanates from broccoli, inhibit bacterial quorum sensing. *MedChemComm*, 4(1), 175–179. <https://doi.org/10.1039/c2md20196h>
- Gaupp, R., Schlag, S., Liebeke, M., Lalk, M., & Götz, F. (2010). Advantage of upregulation of succinate dehydrogenase in *Staphylococcus aureus* biofilms. *Journal of Bacteriology*, 192(9), 2385–2394. <https://doi.org/10.1128/JB.01472-09>

- Gill, E. E., Franco, O. L., & Hancock, R. E. W. (2015). Antibiotic adjuvants: Diverse strategies for controlling drug-resistant pathogens. *Chemical Biology and Drug Design*, *85*(1), 56–78. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12478>
- Girgis, H. S., Harris, K., & Tavazoie, S. (2012). Large mutational target size for rapid emergence of bacterial persistence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(31), 12740–12745. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205124109>
- Gogry, F. A., Siddiqui, M. T., Sultan, I., & Haq, Q. M. R. (2021). Current Update on Intrinsic and Acquired Colistin Resistance Mechanisms in Bacteria. *Frontiers in Medicine* *8*. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.677720>
- Gollan, B., Grabe, G., Michaux, C., & Helaine, S. (2019). Annual Review of Microbiology Bacterial Persisters and Infection: Past, Present, and Progressing. *Annu Rev Microbiol.* *8*(73),359-385. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518>
- Goode, O., Smith, A., Łapińska, U., Bamford, R., Kahveci, Z., Glover, G., Attrill, E., Carr, A., Metz, J., & Pagliara, S. (2021). Heterologous Protein Expression Favors the Formation of Protein Aggregates in Persister and Viable but Nonculturable Bacteria. *ACS Infectious Diseases*, *7*(6), 1848–1858. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.1c00154>
- Górna, M. W., Pietras, Z., Tsai, Y. I. C., Callaghan, A. J., Hernández, H., Robinson, C. V., & Luisi, B. F. (2010). The regulatory protein RraA modulates RNA-binding and helicase activities of the E. coli RNA degradosome. *RNA*, *16*(3), 553–562. <https://doi.org/10.1261/rna.1858010>
- Govers, S. K., Mortier, J., Adam, A., & Aertsen, A. (2018). Protein aggregates encode epigenetic memory of stressful encounters in individual escherichia coli cells. *PLoS Biology*, *16*(8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.2003853>
- Guijarro, I., Sunde, M., Jones, J. A., Campbell, I. D., & Dobson, C. M. (1998). Amyloid fibril formation by an SH3 domain. *Biochemistry*, *95*, 4224–4228. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.8.4224>.
- Guilhen, C., Charbonnel, N., Parisot, N., Gueguen, N., Iltis, A., Forestier, C., & Balestrino, D. (2016). Transcriptional profiling of Klebsiella pneumoniae defines signatures for planktonic, sessile and biofilm-dispersed cells. *BMC Genomics*, *17*(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2557-xi>
- Hall, A. M., Gollan, B., & Helaine, S. (2017). Toxin–antitoxin systems: reversible toxicity. *Current Opinion in Microbiology*, *36*, 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.02.003>
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, *2*(2), 95–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>
- Harden, M. M., He, A., Creamer, K., Clark, M. W., Hamdallah, I., Martinez, K. A., Kresslein, R. L., Bush, S. P., & Slonczewski, J. L. (2015). Acid-adapted strains of Escherichia coli K-12 obtained by experimental evolution. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(6), 1932–1941. <https://doi.org/10.1128/AEM.03494-14>
- Haristoy, X., Angioi-Duprez, K., Duprez, A., & Lozniewski, A. (2003). Efficacy of Sulforaphane in Eradicating Helicobacter pylori in Human Gastric Xenografts Implanted in Nude Mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *47*(12), 3982–3984. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.12.3982-3984.2003>
- Harms, A., Brodersen, D. E., Mitarai, N., & Gerdes, K. (2018). Toxins, Targets, and Triggers: An Overview of Toxin-Antitoxin Biology. *Molecular Cell*, *70*(5), 768–784. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.01.003>

- Harms, A., Maisonneuve, E., & Gerdes, K. (2016). Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. *Science*, 354(6318). <https://doi.org/10.1126/science.aaf4268>
- Hastings, C. J., Himmler, G. E., Patel, A., & Marques, C. N. H. (2023). Immune Response Modulation by *Pseudomonas aeruginosa* Persister Cells. *MBio*, 14(2). <https://doi.org/10.1128/mbio.00056-23>
- Hauryliuk, V., Atkinson, G. C., Murakami, K. S., Tenson, T., & Gerdes, K. (2015). Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 13, Issue 5, pp. 298–309). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3448>
- 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>
- Holden, V. I., & Bachman, M. A. (2015). Diverging roles of bacterial siderophores during infection. *Metalomics*, 7(6), 986–995. <https://doi.org/10.1039/c4mt00333k>
- Holt, K. E., Wertheim, H., Zadoks, R. N., Baker, S., Whitehouse, C. A., Dance, D., Jenney, A., Connor, T. R., Hsu, L. Y., Severin, J., Brisse, S., Cao, H., Wilksch, J., Gorrie, C., Schultz, M. B., Edwards, D. J., Van Nguyen, K., Nguyen, T. V., Dao, T. T., Thomson, N. R. (2015). Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(27), E3574–E3581. <https://doi.org/10.1073/pnas.1501049112>
- Houghton, C. A. (2019). Sulforaphane: Its “Coming of Age” as a Clinically Relevant Nutraceutical in the Prevention and Treatment of Chronic Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/2716870>
- Hufnagel, D. A., Depas, W. H., & Chapman, M. R. (2015). The Biology of the *Escherichia coli* Extracellular Matrix. *Microbiology Spectrum*, 3(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mb-0014-2014>
- Hyman, A. A., Weber, C. A., & Jülicher, F. (2014). Liquid-liquid phase separation in biology. In *Annual review of cell and developmental biology* (Vol. 30, pp. 39–58). <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013325>
- Iannuzzi, C., Irace, G., & Sirangelo, I. (2014). Differential effects of glycation on protein aggregation and amyloid formation. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 1. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2014.00009>
- Irving, S. E., & Corrigan, R. M. (2018). Triggering the stringent response: Signals responsible for activating (p)ppGpp synthesis in bacteria. *Microbiology* 164(3), 268–276. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000621>
- Jagnow, J., & Clegg, S. (2003). *Klebsiella pneumoniae* MrkD-mediated biofilm formation on extracellular matrix- and collagen-coated surfaces. *Microbiology*, 149(9), 2397–2405. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26434-0>
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., Hussain, T., Ali, M., Rafiq, M., & Kamil, M. A. (2018). Bacterial biofilm and associated infections. In *Journal of the Chinese Medical Association* 81(1), 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012>
- Jayol, A., Nordmann, P., Brink, A., & Poirel, L. (2015). Heteroresistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae* associated with alterations in the PhoPQ regulatory system. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(5), 2780–2784. <https://doi.org/10.1128/AAC.05055-14>

- Jo, J., Price-Whelan, A., & Dietrich, L. E. P. (2022). Gradients and consequences of heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00692-2>
- Jung, J. H., Choi, N. Y., & Lee, S. Y. (2013). Biofilm formation and exopolysaccharide (EPS) production by *Cronobacter sakazakii* depending on environmental conditions. *Food Microbiology*, *34*(1), 70–80. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.11.008>
- Jurénas, D., Fraikin, N., Goormaghtigh, F., & Van Melderen, L. (2022). Biology and evolution of bacterial toxin–antitoxin systems. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 20, Issue 6, pp. 335–350). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00661-1>
- Kaiser, P., Regoes, R. R., Dolowschiak, T., Wotzka, S. Y., Lengefeld, J., Slack, E., Grant, A. J., Ackermann, M., & Hardt, W. D. (2014). Cecum Lymph Node Dendritic Cells Harbor Slow-Growing Bacteria Phenotypically Tolerant to Antibiotic Treatment. *PLoS Biology*, *12*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001793>
- Kaldalu, N., Hauryliuk, V., & Tenson, T. (2016). Persisters—as elusive as ever. *Applied Microbiology and Biotechnology* *100*(15), 6545–6553. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7648-8>
- Kalia, D., Merey, G., Nakayama, S., Zheng, Y., Zhou, J., Luo, Y., Guo, M., Roembke, B. T., & Sintim, H. O. (2013). Nucleotide, c-di-GMP, c-di-AMP, cGMP, cAMP, (p)ppGpp signaling in bacteria and implications in pathogenesis. *Chemical Society Reviews*, *42*(1), 305–341. <https://doi.org/10.1039/c2cs35206k>
- Kamble, E., Sanghvi, P., & Pardesi, K. (2022). Synergistic effect of antibiotic combinations on *Staphylococcus aureus* biofilms and their persister cell populations. *Biofilm*, *4*. <https://doi.org/10.1016/j.biofilm.2022.100068>
- Kammel, M., & Sawers, R. G. (2022). The Autonomous Glycyl Radical Protein GrcA Restores Activity to Inactive Full-Length Pyruvate Formate-Lyase In Vivo. *Journal of Bacteriology*, *204*(5). <https://doi.org/10.1128/jb.00070-22>
- Karczewska, M., Strzelecki, P., Bogucka, K., Potrykus, K., Szalewska-Pałasz, A., & Nowicki, D. (2023). Increased Levels of (p)ppGpp Correlate with Virulence and Biofilm Formation, but Not with Growth, in Strains of Uropathogenic *Escherichia coli*. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(4). <https://doi.org/10.3390/ijms24043315>
- Kaur, J. N., Singh, N., Smith, N. M., Klem, J. F., Cha, R., Lang, Y., Chen, L., Kreiswirth, B., Holden, P. N., Bulitta, J. B., & Tsuji, B. T. (2024). Next generation antibiotic combinations to combat pan-drug resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Scientific Reports*, *14*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-53130-z>
- Kim, J. S., Heo, P., Yang, T. J., Lee, K. S., Cho, D. H., Kim, B. T., Suh, J. H., Lim, H. J., Shin, D., Kim, S. K., & Kweon, D. H. (2011). Selective killing of bacterial persisters by a single chemical compound without affecting normal antibiotic-sensitive cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *55*(11), 5380–5383. <https://doi.org/10.1128/AAC.00708-11>
- Kint, C. I., Verstraeten, N., Fauvart, M., & Michiels, J. (2012). New-found fundamentals of bacterial persistence. *Trends in Microbiology* *20* (12) 577–585. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.08.009>
- Kirker, K. R., Fisher, S. T., & James, G. A. (2014). Potency and penetration of telavancin in staphylococcal biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *46*(4), 451–455. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.05.022>

- Klemm, P., & Schembri, M. A. (2000). MINI-REVIEW Fimbrial surface display systems in bacteria: from vaccines to random libraries. *Microbiology*, *146*, 3025–3032. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-12-3025>
- Kline, K. A., Fälker, S., Dahlberg, S., Normark, S., & Henriques-Normark, B. (2009). Bacterial Adhesins in Host-Microbe Interactions. *Cell Host and Microbe*, *5*(6), 580–592. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.05.011>
- Knorr, S., Sinn, M., Galetskiy, D., Williams, R. M., Wang, C., Müller, N., Mayans, O., Schleheck, D., & Hartig, J. S. (2018). Widespread bacterial lysine degradation proceeding via glutarate and L-2-hydroxyglutarate. *Nature Communications*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07563-6>
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Hayete, B., Lawrence, C. A., & Collins, J. J. (2007). A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics. *Cell*, *130*(5), 797–810. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.049>
- Kolodkin-Gal, I., Romero, D., Cao, S., Clardy, J., Kolter, R., & Losick, R. (2010). D-Amino acids trigger biofilm disassembly. *Science*, *328*(5978), 627–629. <https://doi.org/10.1126/science.1188628>
- Korch, S. B., Henderson, T. A., & Hill, T. M. (2003). Characterization of the hipA7 allele of Escherichia coli and evidence that high persistence is governed by (p)ppGpp synthesis. *Molecular Microbiology*, *50*(4), 1199–1213. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03779.x>
- Kram, K. E., & Finkel, S. E. (2015). Rich medium composition affects Escherichia coli survival, glycation, and mutation frequency during long-term batch culture. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(13), 4442–4450. <https://doi.org/10.1128/AEM.00722-15>
- Krause, K., Pyrczak-felczykowska, A., Karczewska, M., Narajczyk, M., Herman-antosiewicz, A., Szalewska-pałasz, A., & Nowicki, D. (2021). Dietary isothiocyanates, sulforaphane and 2-phenethyl isothiocyanate, effectively impair vibrio cholerae virulence. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(19). <https://doi.org/10.3390/ijms221910187>
- Kuczyńska-Wiśnik, D., Moruno-Algara, M., Stojowska-Swędryńska, K., & Laskowska, E. (2016). The effect of protein acetylation on the formation and processing of inclusion bodies and endogenous protein aggregates in Escherichia coli cells. *Microbial Cell Factories*, *15*(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0590-8>
- Kumari, P., Shobhna, Kaur, S., & Kashyap, H. K. (2018). Influence of Hydration on the Structure of Reline Deep Eutectic Solvent: A Molecular Dynamics Study. *ACS Omega*, *3*(11), 15246–15255. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b02447>
- Kundra, S., Colomer-Winter, C., & Lemos, J. A. (2020). Survival of the Fittest: The Relationship of (p)ppGpp With Bacterial Virulence. *Frontiers in Microbiology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.601417>
- Kwiatkowska, J., Matuszewska, E., Kuczyńska-Wiśnik, D., & Laskowska, E. (2008). Aggregation of Escherichia coli proteins during stationary phase depends on glucose and oxygen availability. *Research in Microbiology*, *159*(9–10), 651–657. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2008.09.008>
- Lalaouna, D., Eyraud, A., Devinck, A., Prévost, K., & Massé, E. (2019). GcvB small RNA uses two distinct seed regions to regulate an extensive targetome. *Molecular Microbiology*, *111*(2), 473–486. <https://doi.org/10.1111/mmi.14168>
- Lam, H., Oh, D. C., Cava, F., Takacs, C. N., Clardy, J., De Pedro, M. A., & Waldor, M. K. (2009). D-amino acids govern stationary phase cell wall remodeling in bacteria. *Science*, *325*(5947), 1552–1555. <https://doi.org/10.1126/science.1178123>

- Lassak, J., Sieber, A., & Hellwig, M. (2022). Exceptionally versatile take II: Post-Translational modifications of lysine and their impact on bacterial physiology. *Biological Chemistry*, 403(8–9), 819–858. <https://doi.org/10.1515/hsz-2021-0382>
- Lazar, V., Holban, A. M., Curutiu, C., & Chifiriuc, M. C. (2021). Modulation of Quorum Sensing and Biofilms in Less Investigated Gram-Negative ESKAPE Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.676510>
- Lebre, P. H., De Maayer, P., & Cowan, D. A. (2017). Xerotolerant bacteria: Surviving through a dry spell. *Nature Reviews Microbiology* 15(5), 285–296. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.16>
- Lee, C., & Park, C. (2017). Bacterial responses to glyoxal and methylglyoxal: Reactive electrophilic species. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1). <https://doi.org/10.3390/ijms18010169>
- Lee, H., Baek, J. Y., Kim, S. Y., Jo, H. J., Kang, K. J., Ko, J. H., Cho, S. Y., Chung, D. R., Peck, K. R., Song, J. H., & Ko, K. S. (2018). Comparison of virulence between matt and mucoid colonies of *Klebsiella pneumoniae* coproducing NDM-1 and OXA-232 isolated from a single patient. *Journal of Microbiology*, 56(9), 665–672. <https://doi.org/10.1007/s12275-018-8130-3>
- Lee, J. S., Choi, J. Y., Chung, E. S., Peck, K. R., & Ko, K. S. (2019). Variation in the formation of persister cells against meropenem in *Klebsiella pneumoniae* bacteremia and analysis of its clinical features. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 95(3). <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.06.005>
- Leszczynska, D., Matuszewska, E., Kuczynska-Wisnik, D., Furmanek-Blaszczak, B., & Laskowska, E. (2013). The Formation of Persister Cells in Stationary-Phase Cultures of *Escherichia coli* Is Associated with the Aggregation of Endogenous Proteins. *PLoS ONE*, 8(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054737>
- Leung, V., & Lévesque, C. M. (2012). A stress-inducible quorum-sensing peptide mediates the formation of persister cells with noninherited multidrug tolerance. *Journal of Bacteriology*, 194(9), 2265–2274. <https://doi.org/10.1128/JB.06707-11>
- Levin-Reisman, I., Ronin, I., Gefen, O., Braniss, I., Shoresh, N., & Balaban, N. Q. (2017). *Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance*. *Science*, 24;355(6327), 826-830. <https://doi.org/10.1126/science.aaj2191>
- Lewis, K. (2001). Riddle of biofilm resistance. In *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45(4), 999–1007. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.999-1007.2001>
- Li, J., Zhang, M., Ma, W., Yang, B., Lu, H., Zhou, F., & Zhang, L. (2022). Post-translational modifications in liquid-liquid phase separation: a comprehensive review. *Molecular Biomedicine* 3(1). <https://doi.org/10.1186/s43556-022-00075-2>
- Li, Y., Zhang, L., Zhou, Y., Zhang, Z., & Zhang, X. (2018). Survival of bactericidal antibiotic treatment by tolerant persister cells of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Medical Microbiology*, 67(3), 273–281. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000680>
- Liang, X., Yu, X., Pan, X., Wu, J., Duan, Y., Wang, J., & Zhou, M. (2018). A thiazole reduces the virulence of *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* by inhibiting the histidine utilization pathway and quorum sensing. *Molecular Plant Pathology*, 19(1), 116–128. <https://doi.org/10.1111/mpp.12503>
- Lin, C. L., Chen, F. H., Huang, L. Y., Chang, J. C., Chen, J. H., Tsai, Y. K., Chang, F. Y., Lin, J. C., & Siu, L. K. (2017). Effect in virulence of switching conserved homologous capsular polysaccharide genes from *Klebsiella pneumoniae* serotype K1 into K20. *Virulence*, 8(5), 487–493. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1228508>

- Lin, J. S., Bekale, L. A., Molchanova, N., Nielsen, J. E., Wright, M., Bacacao, B., Diamond, G., Jensen, H., Santa Maria, P. L., & Barron, A. E. (2022). Anti-persister and Anti-biofilm Activity of Self-Assembled Antimicrobial Peptoid Ellipsoidal Micelles. *ACS Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.2c00288>
- Lin, X. min, Yang, M. jun, Li, H., Wang, C., & Peng, X. X. (2014). Decreased expression of LamB and Odp1 complex is crucial for antibiotic resistance in Escherichia coli. *Journal of Proteomics*, *98*, 244–253. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.12.024>
- Litvinovich, S. V, Brew, S. A., Aota, S., Akiyama, S. K., Haudenschild, C., & Ingham, K. C. (1998). Formation of Amyloid-like Fibrils by Self-association of a Partially Unfolded Fibronectin Type III Module. *J Mol Biol.*, *10*;280(2):245-58. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.1863>
- Liu, F., Min, R., Hong, J., Cheng, G., Zhang, Y., & Deng, Y. (2021). Quantitative proteomic analysis of ahpC/F and katE and katG knockout Escherichia coli—a useful model to study endogenous oxidative stress. *Appl Microbiol Biotechnol.*, *105*(6):2399-2410. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11169-2/Published>
- Liu, J., Gefen, O., Ronin, I., Bar-Meir, M., & Balaban, N. Q. (2020). Effect of tolerance on the evolution of antibiotic resistance under drug combinations. *Science*. 2020, *10*;367(6474):200-204. <https://doi.org/10.1126/science.aay3041>
- Liu, S., Wu, N., Zhang, S., Yuan, Y., Zhang, W., & Zhang, Y. (2017). Variable persister gene interactions with (p)ppGpp for persister formation in Escherichia coli. *Frontiers in Microbiology*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01795>
- Liu, Y. F., Yan, J. J., Lei, H. Y., Teng, C. H., Wang, M. C., Tseng, C. C., & Wu, J. J. (2012). Loss of outer membrane protein C in Escherichia coli contributes to both antibiotic resistance and escaping antibody-dependent bactericidal activity. *Infection and Immunity*, *80*(5), 1815–1822. <https://doi.org/10.1128/IAI.06395-11>
- Llobet, E., Martínez-Moliner, V., Moranta, D., Dahlström, K. M., Regueiro, V., Tomás, A., Cano, V., Pérez-Gutiérrez, C., Frank, C. G., Fernández-Carrasco, H., Insua, J. L., Salminen, T. A., Garmendia, J., & Bengoechea, J. A. (2015). Deciphering tissue-induced Klebsiella pneumoniae lipid A structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(46), E6369–E6378. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508820112>
- Lu TK, Collins JJ. (2009). Engineered bacteriophage targeting gene networks as adjuvants for antibiotic therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *24*;106(12):4629-34. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800442106>
- Łupkowska, A., Monem, S., Dębski, J., Stojowska-Swędryńska, K., Kuczyńska-Wiśnik, D., & Laskowska, E. (2023). Protein aggregation and glycation in Escherichia coli exposed to desiccation-rehydration stress. *Microbiological Research*, *270*. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127335>
- Lv B, Zeng Y, Zhang H, Li Z, Xu Z, Wang Y, Gao Y, Chen Y, Fu X. (2022). Mechanosensitive Channels Mediate Hypoionic Shock-Induced Aminoglycoside Potentiation against Bacterial Persisters by Enhancing Antibiotic Uptake. *Antimicrob Agents Chemother*, *15*;66(2):e0112521. <https://doi.org/10.1128/AAC.01125-21>
- Malaviya R, Ikeda T, Ross E, Abraham SN. (1996). Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. *Nature*, *2*;381(6577):77-80. <https://doi.org/10.1038/381077a0>

- Manina, G., Dhar, N., & McKinney, J. D. (2015). Stress and host immunity amplify mycobacterium tuberculosis phenotypic heterogeneity and induce nongrowing metabolically active forms. *Cell Host and Microbe*, *17*(1), 32–46. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.11.016>
- Manuse, S., Shan, Y., Canas-Duarte, S. J., Bakshi, S., Sun, W. S., Mori, H., Paulsson, J., & Lewis, K. (2021). Bacterial persisters are a stochastically formed subpopulation of low-energy cells. *PLoS Biology*, *19*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001194>
- March, C., Cano, V., Moranta, D., Llobet, E., Pérez-Gutiérrez, C., Tomás, J. M., Suárez, T., Garmendia, J., & Bengoechea, J. A. (2013). Role of Bacterial Surface Structures on the Interaction of *Klebsiella pneumoniae* with Phagocytes. *PLoS ONE*, *8*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056847>
- Marques, C. N. H., Morozov, A., Planzos, P., & Zelaya, H. M. (2014). The fatty acid signaling molecule cis-2-decenoic acid increases metabolic activity and reverts persister cells to an antimicrobial-susceptible state. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(22), 6976–6991. <https://doi.org/10.1128/AEM.01576-14>
- Marr, C. M., & Russo, T. A. (2019). Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: a new public health threat. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, *17*(2), 71–73. <https://doi.org/10.1080/14787210.2019.1555470>
- Martino, P. Di, Cafferini, N., Joly, B., & Darfeuille-Michaud, A. (2003). *Klebsiella pneumoniae* type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. *Research in Microbiology*, *154*, 9–16. www.elsevier.com/locate/resmic
- McGrath, H., Černeková, M., & Kolář, M. H. (2022). Binding of the peptide deformylase on the ribosome surface modulates the exit tunnel interior. *Biophysical Journal*, *121*(23), 4443–4451. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2022.11.004>
- Merino, S., Camprubi, S., Alberti, S., Benedi, V.-J., & Tomas, J. M. (1992). Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* Resistance to Complement-Mediated Killing. *Infection and Immunity*, *60*(6):2529-35. doi: 10.1128/iai.60.6.2529-2535.1992
- Michiels, J. E., Van den Bergh, B., Verstraeten, N., & Michiels, J. (2016). Molecular mechanisms and clinical implications of bacterial persistence. *Drug Resistance Updates*, *29*, 76–89. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2016.10.002>
- Mina, E. G., & Marques, C. N. H. (2016). Interaction of *Staphylococcus aureus* persister cells with the host when in a persister state and following awakening. *Scientific Reports*, *6*. <https://doi.org/10.1038/srep31342>
- Möker, N., Dean, C. R., & Tao, J. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* increases formation of multidrug-tolerant persister cells in response to quorum-sensing signaling molecules. *Journal of Bacteriology*, *192*(7), 1946–1955. <https://doi.org/10.1128/JB.01231-09>
- Monds, R. D., & O'Toole, G. A. (2009). The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends in Microbiology*, *17*(2), 73–87. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.11.001>
- Morales-León, F., Lima, C. A., González-Rocha, G., Opazo-Capurro, A., & Bello-Toledo, H. (2020). Colistin heteroresistance among extended spectrum β -lactamases-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Microorganisms*, *8*(9), 1–14. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091279>
- Moranta, D., Regueiro, V., March, C., Llobet, E., Margareto, J., Larrate, E., Garmendia, J., & Bengoechea, J. A. (2010). *Klebsiella pneumoniae* capsule polysaccharide impedes the expression of

β -defensins by airway epithelial cells. *Infection and Immunity*, 78(3), 1135–1146. <https://doi.org/10.1128/IAI.00940-09>

Moruno Algara, M., Kuczyńska-Wiśnik, D., Dębski, J., Stojowska-Swędryńska, K., Sominka, H., Bukrejewska, M., & Laskowska, E. (2019). Trehalose protects *Escherichia coli* against carbon stress manifested by protein acetylation and aggregation. *Molecular Microbiology*, 112(3), 866–880. <https://doi.org/10.1111/mmi.14322>

Mouton, J. M., Helaine, S., Holden, D. W., & Sampson, S. L. (2016). Elucidating population-wide mycobacterial replication dynamics at the single-cell level. *Microbiology (United Kingdom)*, 162(6), 966–978. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000288>

Moyed, H. S., & Bertrand, K. P. (1983). *hipA*, a Newly Recognized Gene of *Escherichia coli* K-12 That Affects Frequency of Persistence After Inhibition of Murein Synthesis. *Journal of Bacteriology*, 155(2):768-75. <https://doi.org/10.1128/jb.155.2.768-775.1983>

Mulani, M. S., Kamble, E. E., Kumkar, S. N., Tawre, M. S., & Pardesi, K. R. (2019). Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: A review. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00539>

Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)

My, L., Rekoske, B., Lemke, J. J., Viala, J. P., Gourse, R. L., & Bouveret, E. (2013). Transcription of the *Escherichia coli* fatty acid synthesis operon *FabHDG* is directly activated by *FadR* and inhibited by *ppGpp*. *Journal of Bacteriology*, 195(16), 3784–3795. <https://doi.org/10.1128/JB.00384-13>

Nava-Ocampo, M. F., Fuhaid, L. Al, Verpoorte, R., Choi, Y. H., van Loosdrecht, M. C. M., Vrouwenvelder, J. S., Witkamp, G. J., Farinha, A. S. F., & Bucs, S. S. (2021). Natural deep eutectic solvents as biofilm structural breakers. *Water Research*, 201. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117323>

Navon-Venezia, S., Kondratyeva, K., & Carattoli, A. (2017). *Klebsiella pneumoniae*: A major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews* 41(3), 252–275. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux013>

Neidhardt, F. C., Bloch, P. L., & Smith, D. F. (1974). Culture Medium for Enterobacteria. *Journal of Bacteriology*, 119(3):736-47. doi: 10.1128/jb.119.3.736-747.1974

Nguyen, D., Joshi-Datar, A., Lepine, F., Bauerle, E., Olakanmi, O., Beer, K., McKay, G., Siehnel, R., Schafhauser, J., Wang, Y., Britigan, B. E., & Singh, P. K. (2011). Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. *Science*, 334(6058), 982–986. <https://doi.org/10.1126/science.1211037>

Nicolau, S. E., & Lewis, K. (2022). The Role of Integration Host Factor in *Escherichia coli* Persister Formation. *mBio*, 22;13(1):e0342021. <https://doi.org/10.1128/mbio.03420-21>

Nicoloff, H., Hjort, K., Levin, B. R., & Andersson, D. I. (2019). The high prevalence of antibiotic heteroresistance in pathogenic bacteria is mainly caused by gene amplification. *Nature Microbiology*, 4(3), 504–514. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0342-0>

Nieweglt, A., & Bremer, E. (1997). The nucleoside-specific *Tsx* channel from the outer membrane of *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter aerogenes*: functional

- characterization and DNA sequence analysis of the *tsx* genes. *Microbiology*, *143*, 603–661. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-2-603>
- Nowicki, D., Maciąg-Dorszyńska, M., Bogucka, K., Szalewska-Pałasz, A., & Herman-Antosiewicz, A. (2019). Various modes of action of dietary phytochemicals, sulforaphane and phenethyl isothiocyanate, on pathogenic bacteria. *Scientific Reports*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50216-x>
- Nowicki, D., Maciąg-Dorszyńska, M., Kobiela, W., Herman-Antosiewicz, A., Węgrzyn, A., Szalewska-Pałasz, A., & Węgrzyn, G. (2014). Phenethyl isothiocyanate inhibits Shiga toxin production in enterohemorrhagic *Escherichia coli* by stringent response induction. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *58*(4), 2304–2315. <https://doi.org/10.1128/AAC.02515-13>
- Nowicki, D., Rodzik, O., Herman-Antosiewicz, A., & Szalewska-Pałasz, A. (2016). Isothiocyanates as effective agents against enterohemorrhagic *Escherichia coli*: Insight to the mode of action. *Scientific Reports*, *6*. <https://doi.org/10.1038/srep22263>
- Nucci, A., Janaszekiewicz, J., Rocha, E. P. C., & Rendueles, O. (2023). Emergence of novel non-aggregative variants under negative frequency-dependent selection in *Klebsiella variicola*. *MicroLife*, *4*. <https://doi.org/10.1093/femsm/luqad038>
- Nystedt, H. L., Grønlien, K. G., Rolfsnes, R. R., Winther-Larsen, H. C., Løchen Økstad, O. A., & Tønnesen, H. H. (2023). Neutral natural deep eutectic solvents as anti-biofilm agents. *Biofilm*, *5*. <https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2023.100114>
- Olivares, B., Martínez, F., Rivas, L., Calderón, C., M. Munita, J., & R. Campodonico, P. (2018). A Natural Deep Eutectic Solvent Formulated to Stabilize β -Lactam Antibiotics. *Scientific Reports*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33148-w>
- Paczosa, M. K., & Mecsas, J. (2016). *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *80*(3), 629–661. <https://doi.org/10.1128/mubr.00078-15>
- Pal, S., Verma, J., Mallick, S., Rastogi, S. K., Kumar, A., & Ghosh, A. S. (2019). Absence of the glycosyltransferase *wcaJ* in *Klebsiella pneumoniae* atcc13883 affects biofilm formation, increases polymyxin resistance and reduces murine macrophage activation. *Microbiology (United Kingdom)*, *165*(8), 891–904. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000827>
- Pan, H., & Ren, Q. (2023). Wake Up! Resuscitation of Viable but Nonculturable Bacteria: Mechanism and Potential Application. *Foods*, *12*(1). <https://doi.org/10.3390/foods12010082>
- Pan, Y. J., Lin, T. L., Chen, C. T., Chen, Y. Y., Hsieh, P. F., Hsu, C. R., Wu, M. C., & Wang, J. T. (2015). Genetic analysis of capsular polysaccharide synthesis gene clusters in 79 capsular types of *Klebsiella* spp. *Scientific Reports*, *5*. <https://doi.org/10.1038/srep15573>
- Papp-Wallace, K. M., Endimiani, A., Taracila, M. A., & Bonomo, R. A. (2011). Carbapenems: Past, present, and future. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *55*(11), 4943–4960. <https://doi.org/10.1128/AAC.00296-11>
- Park, H. J., & Prausnitz, M. R. (2015). Lidocaine-ibuprofen ionic liquid for dermal anesthesia. *AIChE Journal*, *61*(9), 2732–2738. <https://doi.org/10.1002/aic.14941>
- Patel, J., Yin, H. B., Bauchan, G., & Mowery, J. (2020). Inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* virulence factors by benzyl isothiocyanate. *Food Microbiology*, *86*. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103303>

- Patel, P. K., Russo, T. A., & Karchmer, A. W. (2014). Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Open Forum Infectious Diseases*, 1(1). <https://doi.org/10.1093/ofid/ofu028>
- Perna, F. M., Vitale, P., & Capriati, V. (2020). Deep eutectic solvents and their applications as green solvents. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* 21, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2019.09.004>
- Peyrusson, F., Varet, H., Nguyen, T. K., Legendre, R., Sismeiro, O., Coppée, J. Y., Wolz, C., Tenson, T., & Van Bambeke, F. (2020). Intracellular *Staphylococcus aureus* persists upon antibiotic exposure. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15966-7>
- Pisithkul, T., Schroeder, J. W., Trujillo, E. A., Yeesin, P., Stevenson, D. M., Chaiamarit, T., Coon, J. J., Wang, J. D., & Amador-Noguez, D. (2019). Metabolic remodeling during biofilm development of *Bacillus subtilis*. *MBio*, 10(3). <https://doi.org/10.1128/mBio.00623-19>
- Potrykus, K., Murphy, H., Philippe, N., & Cashel, M. (2011). ppGpp is the major source of growth rate control in *E. coli*. *Environmental Microbiology*, 13(3), 563–575. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02357.x>
- Pu, Y., Li, Y., Jin, X., Tian, T., Ma, Q., Zhao, Z., Lin, S. yuan, Chen, Z., Li, B., Yao, G., Leake, M. C., Lo, C. J., & Bai, F. (2019). ATP-Dependent Dynamic Protein Aggregation Regulates Bacterial Dormancy Depth Critical for Antibiotic Tolerance. *Molecular Cell*, 73(1), 143-156.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.10.022>
- Pu, Y., Zhao, Z., Li, Y., Zou, J., Ma, Q., Zhao, Y., Ke, Y., Zhu, Y., Chen, H., Baker, M. A. B., Ge, H., Sun, Y., Xie, X. S., & Bai, F. (2016). Enhanced Efflux Activity Facilitates Drug Tolerance in Dormant Bacterial Cells. *Molecular Cell*, 62(2), 284–294. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.03.035>
- Rabbani, N., & Thornalley, P. J. (2021). Protein glycation – biomarkers of metabolic dysfunction and early-stage decline in health in the era of precision medicine. *Redox Biology*, 42. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101920>
- Rahn, A., Drummelsmith, J., & Whitfield, C. (1999). Conserved Organization in the *cps* Gene Clusters for Expression of *Escherichia coli* Group 1 K Antigens: Relationship to the Colanic Acid Biosynthesis Locus and the *cps* Genes from *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, 181(7):2307-13. doi: 10.1128/JB.181.7.2307-2313.1999
- Ramos Pereira, P. I., Picão, R. C., Vespero, E. C., Pelisson, M., Goda Zuleta, L. F., Almeida, L. G., Gerber, A. L., Vasconcelos R, A. T., Gales, A. C., & Nicolás, M. F. (2012). Pyrosequencing-based analysis reveals a novel capsular gene cluster in a KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate identified in Brazil. *BMC Microbiology*, 11;12:173. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-173>
- Reichhardt, C., Jacobson, A. N., Maher, M. C., Uang, J., McCrate, O. A., Eckart, M., & Cegelski, L. (2015). Congo red interactions with curli-producing *E. coli* and native curli amyloid fibers. *PLoS ONE*, 10(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140388>
- Ren, D., Bedzyk, L. A., Thomas, S. M., Ye, R. W., & Wood, T. K. (2004). Gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(4), 515–524. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1517-y>
- Rhouma, M., Beaudry, F., Thériault, W., & Letellier, A. (2016). Colistin in pig production: Chemistry, mechanism of antibacterial action, microbial resistance emergence, and one health perspectives. *Frontiers in Microbiology* 11;7:1789. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01789>
- Richarme, G., Abdallah, J., Mathas, N., Gautier, V., & Dairou, J. (2018). Further characterization of the Maillard deglycase DJ-1 and its prokaryotic homologs, deglycase 1/Hsp31, deglycase 2/YhbO,

- and deglycase 3/YajL. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, 5;503(2):703-709. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.06.064>
- Rinas, U., Garcia-Fruitós, E., Corchero, J. L., Vázquez, E., Seras-Franzoso, J., & Villaverde, A. (2017). Bacterial Inclusion Bodies: Discovering Their Better Half. *Trends Biochem Sci.*, 42(9):726-737. doi: 10.1016/j.tibs.2017.01.005
- Rivers, B., & Steck, T. R. (2001). Viable but nonculturable uropathogenic bacteria are present in the mouse urinary tract following urinary tract infection and antibiotic therapy. *Urology Research and Practice*, 29(1):60-6. doi: 10.1007/s002400000151
- Romeo, L., Iori, R., Rollin, P., Bramanti, P., & Mazzon, E. (2018). Isothiocyanates: An overview of their antimicrobial activity against human infections. *Molecules*, 23(3). <https://doi.org/10.3390/molecules23030624>
- Ronneau, S., & Hallez, R. (2019). Make and break the alarmone: Regulation of (p)ppGpp synthetase/hydrolase enzymes in bacteria. *FEMS Microbiol Rev.*, 1;43(4):389-400. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz009>
- Rossi, F., Cattò, C., Mugnai, G., Villa, F., & Forlani, F. (2021). Effects of the quinone oxidoreductase wrba on escherichia coli biofilm formation and oxidative stress. *Antioxidants*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/antiox10060919>
- Rowe, S. E., Wagner, N. J., Li, L., Beam, J. E., Wilkinson, A. D., Radlinski, L. C., Zhang, Q., Miao, E. A., & Conlon, B. P. (2020). Reactive oxygen species induce antibiotic tolerance during systemic *Staphylococcus aureus* infection. *Nature Microbiology* 5(2):282-290. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0627-y>
- Ruhee, R. T., & Suzuki, K. (2020). The integrative role of sulforaphane in preventing inflammation, oxidative stress and fatigue: A review of a potential protective phytochemical. *Antioxidants*, 9(6):1–13. <https://doi.org/10.3390/antiox9060521>
- Sabnis, A., Hagart, K. L. H., Klöckner, A., Becce, M., Evans, L. E., Furniss, R. C. D., Mavridou, D. A. I., Murphy, R., Stevens, M. M., Davies, J. C., Larrouy-Maumus, G. J., Clarke, T. B., & Edwards, A. M. (2021). Colistin kills bacteria by targeting lipopolysaccharide in the cytoplasmic membrane. *ELife*, 10. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.65836>
- Sahly, H., Keisari, Y., Crouch, E., Sharon, N., & Ofek, I. (2008). Recognition of bacterial surface polysaccharides by lectins of the innate immune system and its contribution to defense against infection: The case of pulmonary pathogens. *Infection and Immunity*, 76(4), 1322–1332. <https://doi.org/10.1128/IAI.00910-07>
- Sánchez-León, I., García-Martínez, T., Diene, S. M., Pérez-Nadales, E., Martínez-Martínez, L., & Rolain, J. M. (2023). Heteroresistance to Colistin in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* Producing OXA-48. *Antibiotics*, 12(7). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12071111>
- Sassanfaq, M., & Roberts, J. W. (1990). Nature of the SOS-inducing Signal in *Escherichia coli* and the Involvement of DNA Replication. *Journal of Molecular Biology*, 5;212(1):79-96. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(90\)90306-7](https://doi.org/10.1016/0022-2836(90)90306-7)
- Satola, S. W., Farley, M. M., Anderson, K. F., & Patel, J. B. (2011). Comparison of detection methods for heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*, with the population analysis profile method as the reference method. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(1), 177–183. <https://doi.org/10.1128/JCM.01128-10>

- Saxena, D., Maitra, R., Bormon, R., Czekanska, M., Meiers, J., Titz, A., Verma, S., & Chopra, S. (2023). Tackling the outer membrane: facilitating compound entry into Gram-negative bacterial pathogens. *Npj Antimicrobials and Resistance*, 1(1). <https://doi.org/10.1038/s44259-023-00016-1>
- Schramm, F. D., Schroeder, K., & Jonas, K. (2019). Protein aggregation in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 44(1), 54–72. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz026>
- Schumacher, M. A., Balani, P., Min, J., Chinnam, N. B., Hansen, S., Vulić, M., Lewis, K., & Brennan, R. G. (2015). HipBA-promoter structures reveal the basis of heritable multidrug tolerance. *Nature*, 524(7563), 59–66. <https://doi.org/10.1038/nature14662>
- Schumacher, M. A., Piro, K. M., Xu, W., Hansen, S., Lewis, K., & Brennan, R. G. (2009). Molecular mechanisms of HipA-mediated multidrug tolerance and its neutralization by HipB. *Science*, 323(5912), 396–401. <https://doi.org/10.1126/science.1163806>
- Semanjski, M., Germain, E., Bratl, K., Kiessling, A., Gerdes, K., & Macek, B. (2018). The kinases HipA and HipA7 phosphorylate different substrate pools in *Escherichia coli* to promote multidrug tolerance. *Science Signal*, 11;11(547):eaat5750. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aat5750>
- Seo, J., Na, I. Y., & Ko, K. S. (2024). Antibiotic Efficacy in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Under Nutrient Limitation and Effectiveness of Colistin-Based Antibiotic Combinations to Eradicate Persister Cells. *Current Microbiology*, 81(1). <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03551-2>
- Seo, J., Wi, Y. M., Kim, J. M., Kim, Y. J., & Ko, K. S. (2021). Detection of colistin-resistant populations prior to antibiotic exposure in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *Journal of Microbiology*, 59(6), 590–597. <https://doi.org/10.1007/s12275-021-0610-1>
- Séro, L., Sanguinet, L., Blanchard, P., Dang, B. T., Morel, S., Richomme, P., Séraphin, D., & Derbré, S. (2013). Tuning a 96-well microtiter plate fluorescence-based assay to identify AGE inhibitors in crude plant extracts. *Molecules*, 18(11), 14320–14339. <https://doi.org/10.3390/molecules181114320>
- Serra, D. O., & Hengge, R. (2014). Stress responses go three dimensional - The spatial order of physiological differentiation in bacterial macrocolony biofilms. *Environmental Microbiology*, 16(6), 1455–1471. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12483>
- Serra, D. O., & Hengge, R. (2017). Experimental detection and visualization of the extracellular matrix in macrocolony biofilms. *Methods in Molecular Biology* 1657: 133–145. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7240-1_11
- Serra, D. O., Richter, A. M., & Hengge, R. (2013). Cellulose as an architectural element in spatially structured *Escherichia coli* biofilms. *Journal of Bacteriology*, 195(24), 5540–5554. <https://doi.org/10.1128/JB.00946-13>
- Shan, Y., Gandt, A. B., Rowe, S. E., Deisinger, J. P., Conlon, B. P., & Lewis, K. (2017). ATP-Dependent persister formation in *Escherichia coli*. *MBio*, 8(1). <https://doi.org/10.1128/mBio.02267-16>
- Sherman, E. X., Wozniak, J. E., & Weiss, D. S. (2019). Methods to evaluate colistin heteroresistance in *Acinetobacter baumannii*. *Methods in Molecular Biology*, 1946, 39–50. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9118-1_4
- Shu, H. Y., Fung, C. P., Liu, Y. M., Wu, K. M., Chen, Y. T., Li, L. H., Liu, T. T., Kirby, R., & Tsai, S. F. (2009). Genetic diversity of capsular polysaccharide biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *Microbiology*, 155(12), 4170–4183. <https://doi.org/10.1099/mic.0.029017-0>

- Silva, J. M., Silva, E., Reis, R. L., & Duarte, A. R. C. (2019). A closer look in the antimicrobial properties of deep eutectic solvents based on fatty acids. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 14. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2019.100192>
- Singh, G., Yadav, M., Ghosh, C., & Rathore, J. S. (2021). Bacterial toxin-antitoxin modules: classification, functions, and association with persistence. *Current Research in Microbial Sciences* 7(2). <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100047>
- Singh, M. B., Kumar, V. S., Chaudhary, M., & Singh, P. (2021). A mini review on synthesis, properties and applications of deep eutectic solvents. In *Journal of the Indian Chemical Society* 98(11). <https://doi.org/10.1016/j.jics.2021.100210>
- Song, S., & Wood, T. K. (2020). ppGpp ribosome dimerization model for bacterial persister formation and resuscitation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 523(2), 281–286. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.01.102>
- Soutourina, J., Blanquet, S., & Plateau, P. (2001). Role of D-Cysteine Desulfhydrase in the Adaptation of Escherichia coli to D-Cysteine. *Journal of Biological Chemistry*, 276(44), 40864–40872. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102375200>
- Spoering, A. L., & Lewis, K. (2001). Biofilms and planktonic cells of Pseudomonas aeruginosa have similar resistance to killing by antimicrobials. *Journal of Bacteriology*, 183(23), 6746–6751. <https://doi.org/10.1128/JB.183.23.6746-6751.2001>
- Starkey, M., Lepine, F., Maura, D., Bandyopadhyaya, A., Lesic, B., He, J., Kitao, T., Righi, V., Milot, S., Tzika, A., & Rahme, L. (2014). Identification of Anti-virulence Compounds That Disrupt Quorum-Sensing Regulated Acute and Persistent Pathogenicity. *PLoS Pathogens*, 10(8). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004321>
- Stewart, P. S., Davison, W. M., & Steenbergen, J. N. (2009). Daptomycin rapidly penetrates a Staphylococcus epidermidis biofilm. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(8), 3505–3507. <https://doi.org/10.1128/AAC.01728-08>
- Stojowska-Swędryńska, K., Kuczyńska-Wiśnik, D., & Laskowska, E. (2023). New Strategies to Kill Metabolically-Dormant Cells Directly Bypassing the Need for Active Cellular Processes. *Antibiotics*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12061044>
- Stojowska-Swędryńska, K., Łupkowska, A., Kuczyńska-Wiśnik, D., & Laskowska, E. (2022). Antibiotic heteroresistance in Klebsiella pneumoniae. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1). <https://doi.org/10.3390/ijms23010449>
- Subedi, K. P., Kim, I., Kim, J., Min, B., & Park, C. (2008). Role of GldA in dihydroxyacetone and methylglyoxal metabolism of Escherichia coli K12. *FEMS Microbiology Letters*, 279(2), 180–187. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.01032.x>
- Sun, F., Chen, J., Zhong, L., Zhang, X. H., Wang, R., Guo, Q., & Dong, Y. (2008). Characterization and virulence retention of viable but nonculturable Vibrio harveyi. *FEMS Microbiology Ecology*, 64(1), 37–44. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00442.x>
- Svigelj, R., Dossi, N., Grazioli, C., & Toniolo, R. (2021). Deep eutectic solvents (Dess) and their application in biosensor development. *Sensors* 21(13). <https://doi.org/10.3390/s21134263>
- Tupe, R. S., Vishwakarma, A., Solaskar, A., & Prajapati, A. (2019). Methylglyoxal induces glycation and oxidative stress in Saccharomyces cerevisiae. *Annals of Microbiology*, 69(11), 1165–1175. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01498-z>

- Uversky, V. N., Kuznetsova, I. M., Turoverov, K. K., & Zaslavsky, B. (2015). Intrinsically disordered proteins as crucial constituents of cellular aqueous two phase systems and coacervates. *FEBS Letters*, 589(1), 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.11.028>
- Vahdati, S. N., Behboudi, H., Navasatli, S. A., Tavakoli, S., & Safavi, M. (2022). New insights into the inhibitory roles and mechanisms of D-amino acids in bacterial biofilms in medicine, industry, and agriculture. *Microbiological Research*, 263. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127107>
- Van Delden, C., Comte, R., & Bally, M. (2001). Stringent response activates quorum sensing and modulates cell density-dependent gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 183(18), 5376–5384. <https://doi.org/10.1128/JB.183.18.5376-5384.2001>
- Verstraeten, N., Knapen, W. J., Kint, C. I., Liebens, V., Van den Bergh, B., Dewachter, L., Michiels, J. E., Fu, Q., David, C. C., Fierro, A. C., Marchal, K., Beirlant, J., Versées, W., Hofkens, J., Jansen, M., Fauvart, M., & Michiels, J. (2015). Opg and Membrane Depolarization Are Part of a Microbial Bet-Hedging Strategy that Leads to Antibiotic Tolerance. *Molecular Cell*, 59(1), 9–21. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.011>
- Vestby, L. K., Grønseth, T., Simm, R., & Nesse, L. L. (2020). Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease. *Antibiotics* 9(2). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020059>
- Vieira, T. F., Magalhães, R. P., Simões, M., & Sousa, S. F. (2022). Drug Repurposing Targeting *Pseudomonas aeruginosa* MvfR Using Docking, Virtual Screening, Molecular Dynamics, and Free-Energy Calculations. *Antibiotics*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/antibiotics11020185>
- Vogwill, T., & Maclean, R. C. (2015). The genetic basis of the fitness costs of antimicrobial resistance: A meta-analysis approach. *Evolutionary Applications*, 8(3), 284–295. <https://doi.org/10.1111/eva.12202>
- Völzing, K. G., & Brynildsen, M. P. (2015). Stationary-phase persisters to ofloxacin sustain DNA damage and require repair systems only during recovery. *MBio*, 6(5). <https://doi.org/10.1128/mBio.00731-15>
- Vuotto, C., Longo, F., Pascolini, C., Donelli, G., Balice, M. P., Libori, M. F., Tiracchia, V., Salvia, A., & Varaldo, P. E. (2017). Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. *Journal of Applied Microbiology*, 123(4), 1003–1018. <https://doi.org/10.1111/jam.13533>
- Wagner, A. F. V., Schultz, S., Bomke, J., Pils, T., Knappe, J., & Lehmann, W. D. (2001). YfiD of *Escherichia coli* and Y061 of bacteriophage T4 as autonomous glycyl radical cofactors reconstituting the catalytic center of oxygen-fragmented pyruvate formate-lyase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 285(2), 456–462. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5186>
- Wainwright, J., Hobbs, G., & Nakouti, I. (2021). Persister cells: formation, resuscitation and combative therapies. *Archives of Microbiology*, 203(10), 5899–5906. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02585-z>
- Walker, K. A., Miner, T. A., Palacios, M., Trzilova, D., Frederick, D. R., Broberg, C. A., Sepúlveda, V. E., Quinn, J. D., & Miller, V. L. (2019). A *Klebsiella pneumoniae* regulatory mutant has reduced capsule expression but retains hypermucoviscosity. *MBio*, 10(2), 1–16. <https://doi.org/10.1128/MBIO.00089-19>
- Wan, J., Dai, L., Xiao, H., Zhang, W., Zhang, R., Xie, T., Jia, Y., Gao, X., Huang, J., & Liu, F. (2024). Biological characteristics of mechanosensitive channels MscS and MscL in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, 206(3). <https://doi.org/10.1128/jb.00429-23>

- Wang, H., Yan, Y., Rong, D., Wang, J., Wang, H., Liu, Z., Wang, J., Yang, R., & Han, Y. (2016). Increased biofilm formation ability in *Klebsiella pneumoniae* after short-term exposure to a simulated microgravity environment. *MicrobiologyOpen*, 5(5), 793–801. <https://doi.org/10.1002/mbo3.370>
- Wang, J. D., Sanders, G. M., & Grossman, A. D. (2007). Nutritional Control of Elongation of DNA Replication by (p)ppGpp. *Cell*, 9;128(5):865-75. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.12.043>
- Wang, X., Cole, C. G., Dupai, C. D., & Davies, B. W. (2020). Protein aggregation is associated with *Acinetobacter baumannii* desiccation tolerance. *Microorganisms*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030343>
- Wang, X., Li, W., Wang, W., Wang, S., Xu, T., Chen, J., & Zhang, W. (2021). Involvement of Small Colony Variant-Related Heme Biosynthesis Genes in *Staphylococcus aureus* Persister Formation in vitro. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.756809>
- Weibezahn, J., Tessarz, P., Schlieker, C., Zahn, R., Maglica, Z., Lee, S., Zentgraf, H., Weber-Ban, E., Dougan, D., Tsai, F., Mogk, A., & Bukau, B. (2004). *Thermotolerance Requires Refolding of Aggregated Proteins by Substrate Translocation through the Central Pore of ClpB*.
- Wexselblatt, E., Oppenheimer-Shaanan, Y., Kaspy, I., London, N., Schueler-Furman, O., Yavin, E., Glaser, G., Katzhendler, J., & Ben-Yehuda, S. (2012). Relacin, a Novel Antibacterial Agent Targeting the Stringent Response. *PLoS Pathogens*, 8(9). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002925>
- Windels, E. M., Michiels, J. E., Van Den Bergh, B., Fauvart, M., & Michiels, J. (2019). Antibiotics: Combatting Tolerance To Stop Resistance. *mBio*, 10;10(5):e02095-19 <https://doi.org/10.1128/mBio>
- Wu, N., He, L., Cui, P., Wang, W., Yuan, Y., Liu, S., Xu, T., Zhang, S., Wu, J., Zhang, W., & Zhang, Y. (2015). Ranking of persister genes in the same *Escherichia coli* genetic background demonstrates varying importance of individual persister genes in tolerance to different antibiotics. *Frontiers in Microbiology*, 6(SEP). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01003>
- Wyres, K. L., Wick, R. R., Gorrie, C., Jenney, A., Follador, R., Thomson, N. R., & Holt, K. E. (2016). Identification of *Klebsiella* capsule synthesis loci from whole genome data. *Microbial Genomics*, 2(12), e000102. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000102>
- Xu, J., Zhao, Z., Ge, Y., & He, F. (2020). Rapid emergence of a pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST11 isolate in an inpatient in a teaching hospital in China after treatment with multiple broad-spectrum antibiotics. *Infection and Drug Resistance*, 13, 799–804. <https://doi.org/10.2147/IDR.S243334>
- Yamamoto, M., & Akira, S. (2009). Lipid A Receptor TLR4-Mediated Signaling Pathways. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 667:59-68. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1603-7_6
- Yan, J., & Bassler, B. L. (2019). Surviving as a Community: Antibiotic Tolerance and Persistence in Bacterial Biofilms. *Cell Host and Microbe*, 26, (1):15–21 <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.06.002>
- Yoshida, K., Matsumoto, T., Tateda, K., Uchida, K., Tsujimoto, S., & Yamaguchi, K. (2000). Role of bacterial capsule in local and systemic inflammatory responses of mice during pulmonary infection with *Klebsiella pneumoniae*. *J Med Microbiol*. 49(11):1003-1010. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-49-11-1003>
- Zakrewsky, M., Banerjee, A., Apte, S., Kern, T. L., Jones, M. R., Sesto, R. E. D., Koppisch, A. T., Fox, D. T., & Mitragotri, S. (2016). Choline and Geranate Deep Eutectic Solvent as a Broad-Spectrum Antiseptic Agent for Preventive and Therapeutic Applications. *Advanced Healthcare Materials*, 5(11), 1282–1289. <https://doi.org/10.1002/adhm.201600086>

- Zeng, B., Zhao, G., Cao, X., Yang, Z., Wang, C., & Hou, L. (2013). Formation and resuscitation of viable but nonculturable *Salmonella typhi*. *BioMed Research International*, 907170. <https://doi.org/10.1155/2013/907170>
- Zhang, T., Zhu, J., Xu, J., Shao, H., & Zhou, R. (2020). Regulation of (p)ppGpp and Its Homologs on Environmental Adaptation, Survival, and Pathogenicity of Streptococci. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01842>
- Zhang, X. H., Ahmad, W., Zhu, X. Y., Chen, J., & Austin, B. (2021). Viable but nonculturable bacteria and their resuscitation: implications for cultivating uncultured marine microorganisms. *Marine Life Science and Technology* 3(2), 189–203 <https://doi.org/10.1007/s42995-020-00041-3>
- Zheng, E. J., Stokes, J. M., & Collins, J. J. (2020). Eradicating Bacterial Persisters with Combinations of Strongly and Weakly Metabolism-Dependent Antibiotics. *Cell Chemical Biology*, 27(12), 1544-1552.e3. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2020.08.015>
- Zogaj, X., Bokranz, W., Nimtz, M., & Römling, U. (2003). Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family Enterobacteriaceae isolated from the human gastrointestinal tract. *Infection and Immunity*, 71(7), 4151–4158. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.7.4151-4158.2003>
- Zowawi, H. M., Forde, B. M., Alfaresi, M., Alzarouni, A., Farahat, Y., Chong, T. M., Yin, W. F., Chan, K. G., Li, J., Schembri, M. A., Beatson, S. A., & Paterson, D. L. (2015). Stepwise evolution of pandrug-resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Scientific Reports*, 19(5):15082. <https://doi.org/10.1038/srep15082>
- Zuo, Y., Wang, Y., & Steitz, T. A. (2013). The Mechanism of *E. coli* RNA Polymerase Regulation by ppGpp is suggested by the structure of their complex. *Molecular Cell*, 50(3), 430–436. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.03.020>