

Wpływ czynników hamujących lub indukujących wewnątrzkomórkową agregację białek na powstawanie bakterii tolerujących antybiotyki

Daria Leszczyńska

Bakterie przetrwałe (ang. *persisters*) są komórkami tolerującymi antybiotyki i stanowią zwykle niewielką część populacji bakteryjnych. Metabolizm bakterii przetrwałych jest ograniczony, komórki nie dzielą się wcale lub dzielą się bardzo wolno. W przeciwieństwie do bakterii opornych na antybiotyki, komórki przetrwałe nie są mutantami lecz rodzajem komórek typu dzikiego, które po odzyskaniu zdolności do szybkiego wzrostu stają się ponownie wrażliwe na leki. Powstawanie komórek przetrwałych mogą indukować różne czynniki stresowe, np. głodzenie, stres oksydacyjny i cieplny oraz aktywacja modułów toksyna-antytoksyna. Szczególnie wysoki poziom komórek przetrwałych można stwierdzić w biofilmach i w późnej stacjonarnej fazie wzrostu bakterii. Cechą charakterystyczną starzejących się hodowli bakteryjnych, oprócz obecności komórek przetrwałych jest agregacja endogennych białek. Postanowiłam sprawdzić czy istnieje związek pomiędzy poziomem komórek tolerujących antybiotyki i agregacją białek w stacjonarnych hodowlach *E. coli*. Stwierdziłam, że hamowanie agregacji białek w hodowlach stacjonarnych przez wybrane związki osmotycznie czynne (trehalozę, betainę, glukozę, glicerol) lub 40 mM MOPS pH 7,4 powodowało obniżenie poziomu komórek tolerujących ampicylinę, kanamycynę i ofloksacynę. Natomiast indukcja agregacji białek przez octan sodu lub wyższe stężenia osmolitów była związana z podwyższonym poziomem bakterii przetrwałych. Wykazałam, że liczba komórek tolerujących antybiotyki nie zależy od poziomu utlenionych białek, stężenia ATP oraz poziomu bakterii martwych i VBNC (*viable but not culturable*) w hodowlach *E. coli*. Okazało się, że MOPS i związki osmotycznie czynne mogą uwrażliwiać wyizolowane bakterie przetrwałe na kanamycynę i ampicylinę. Najsilniejszy efekt obserwowałam w obecności trehalozy - aż ok. 80% bakterii przetrwałych stało się wrażliwych na kanamycynę. Wpływ trehalozy na powstawanie komórek przetrwałych potwierdziłam badając efekt mutacji w genie *otsA* kodującym syntazę trehalozo-6 fosforanu. Brak syntezy trehalozy w komórkach $\Delta otsA$ powodował wyraźny wzrost poziomu bakterii przetrwałych już we wczesnej fazie stacjonarnej. Ponadto indukcja komórek przetrwałych po szoku cieplnym i zimnym była znacznie wyższa w hodowli $\Delta otsA$ niż w szczepie WT.

Jednym z głównych problemów dotyczących bakterii przetrwałych jest brak odpowiednich metod umożliwiających izolację dużej liczby tych komórek bez konieczności

stosowania antybiotyków. Wykazałam, że stosując wirowanie bakterii *E. coli* poddanych szokowi cieplnemu w gradiencie gęstości Percollu można uzyskać subpopulacje wzbogacone o komórki przetrwałe.

Kolejne doświadczenia przeprowadziłam wykorzystując izolaty kliniczne uropatogennych *E. coli* oraz szczepy *Pseudomonas aeruginosa* PAO1-L WT i $\Delta 4$. Szczep *P. aeruginosa* $\Delta 4$ jest pozbawiony czterech operonów kodujących systemy toksyna-antytoksyna i w związku z tym wytwarza niewielką ilość komórek przetrwałych. Wykazałam, że trehaloza hamowała powstawanie komórek tolerujących ampicylinę w przypadku jednego z dwóch badanych uropatogennych szczepów *E. coli*. Stwierdziłam również, że trehaloza i inne związki osmotycznie czynne obniżały poziom komórek przetrwałych w hodowlach *P. aeruginosa* WT, nie powodowały natomiast dalszego spadku poziomu komórek tolerujących antybiotyki w szczepie *P. aeruginosa* $\Delta 4$. Wynik ten sugeruje, że związki osmotycznie czynne obniżają poziom komórek przetrwałych hamując pośrednio lub bezpośrednio aktywację systemów toksyna-antytoksyna.