

„Powstawanie agregatów białek i produktów glikacji u *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae* narażonych na stres związany z wysuszeniem-rehydratacją”
mgr Soroosh Monem

W środowisku naturalnym bakterie często przechodzą w stan anhydrobiozy z powodu utraty wody. Wysuszenie powoduje zagęszczenie makrocząsteczek i rozerwanie błony komórkowej. Redukcja otoczki hydratacyjnej wokół białek powoduje ich inaktywację, rozfałdowanie i agregację. Utrata stabilności białek i zagęszczenie sprzyjają szkodliwym reakcjom, w tym nieenzymatycznej glikozylacji (glikacji lub reakcji Maillarda), która prowadzi do nieodwracalnego sieciowania makrocząsteczek i gromadzenia zaawansowanych produktów glikacji (AGEs). Wstępne badania wykazały, że chociaż glikacja może indukować agregację białek *in vitro*, agregaty powstające w komórkach *Escherichia coli* narażonych na wysuszenie zawierały stosunkowo niski poziom AGEs w porównaniu z rozpuszczalną frakcją białkową.

Agregacja białek u bakterii wywołana różnymi czynnikami wewnętrznymi lub stresem środowiskowym prowadzi do zaburzenia proteostazy i wywołuje szkodliwe skutki: utratę funkcji, niespecyficzne oddziaływanie z makrocząsteczkami, sekwestrację białek funkcjonalnych i uszkodzenie błony komórkowej. Ostatnie badania wykazały, że w określonych warunkach bakteryjne agregaty białkowe mogą pełnić rolę ochronną jako funkcjonalne kompartmenty. Wstępne doświadczenia sugerowały, że to glikacja, a nie agregacja białek, jest główną przyczyną śmierci *E. coli* podczas wysuszenia.

Celem niniejszej pracy była weryfikacja tej hipotezy i rozszerzenie badań nad agregacją i glikacją białek indukowaną stresem u *E. coli* i *Klebsiella pneumoniae*. Zbadano między innymi wpływ osmolitów (karnozyny, glicyny-betainy i trehalozy) na żywotność bakterii, agregację i glikację białek. Stwierdzono, że agregacja białek była hamowana lub indukowana w zależności od zastosowanego osmolitu i jego stężenia. Niższe stężenia karnozyny, betainy i trehalozy hamowały tworzenie agregatów białkowych i produktów glikacji, zwiększając tym samym przeżywalność *E. coli* podczas stresu związanego z wysuszeniem i rehydratacją. Chociaż wysokie stężenia betainy i trehalozy znacząco zwiększały agregację białek, glikacja była nadal hamowana, a komórki *E. coli* przetrwały stres związany z wysuszeniem lepiej niż bakterie hodowane bez osmolitów. Niezależnie od stężenia, wszystkie osmolity powodowały wzmożoną agregację białek i podwyższały żywotność *K. pneumoniae* MKP103. Zatem wyniki te potwierdziły, że to glikacja, a nie agregacja białek, jest główną przyczyną śmierci bakterii podczas wysuszenia.

Dalsze doświadczenia wykazały, że u *E. coli* acetylacja N ϵ -lizyny może zapobiegać tworzeniu karboksymetylolizyny (CML), niefluorescencyjnego produktu AGE, zwiększając w ten sposób przeżywalność bakterii podczas wysuszenia i rehydratacji. Jako jedno z najsilniej glikowanych białek w *E. coli* zidentyfikowano porynę OmpC.

Zbadano również związek między przeżywalnością komórek, agregacją białek i glikacją, wykorzystując makrokolonie klinicznego izolatu *K. pneumoniae* 577-BA. Makrokolonie tworzyły dwie subpopulacje: mukoidalne centrum z otoczką i niemukoidalny/bezotoczkowy pierścień. Porównanie genomów centrum i pierścienia wykazało, że pojawienie się niemukoidalnej subpopulacji wynikało z przerwania genu *wbaP* przez insercję IS5. Gen *wbaP* koduje enzym katalizujący pierwszy etap syntezy otoczki, fosfotransferazę undekaprenylofosforanu galaktozy. Utrata otoczki była korzystna dla subpopulacji pierścienia, ponieważ umożliwiała tworzenie biofilmu. Subpopulacja pierścienia charakteryzowała się wyższą żywotnością, niższym poziomem AGEs i zwiększoną agregacją białek niż centrum makrokolonii. Podsumowując, wyniki te potwierdziły, że główną przyczyną utraty żywotności bakterii podczas stresu jest glikacja, a nie agregacja białek, co sugeruje, że agregaty mogą pełnić funkcje ochronne.