

## **Wpływ naturalnie występujących izotiocyjanianów na wirulencję *Vibrio cholerae*** **mgr Klaudyna Krause**

*Vibrio cholerae* jest Gram-ujemnym patogenem, żyjącym w środowisku wodnym bądź przewodzie pokarmowym zwierząt. Zakażenie *V. cholerae* występuje głównie w krajach rozwijających się i prowadzi do ostrej choroby układu pokarmowego. Głównym czynnikiem wirulencji tej bakterii, odpowiedzialnym za objawy choroby, jest toksyna cholery. Powszechnie przyjęty sposób leczenia zakażeń *V. cholerae* polega na nawodnieniu doustnym, jednakże nie prowadzi to do wyeliminowania patogenu z organizmu. W tym celu wykorzystuje się antybiotyki, jednak zwiększająca się antybiotykooporność szczepów *V. cholerae* utrudnia kurację. Dlatego też tak istotne jest poszukiwanie nowych substancji przeciwbakteryjnych. Rośliny są bogatym źródłem takich substancji, a jednym z ich przykładów są glukozynolany. Jest to grupa związków należąca do tioglikozydów obecna w roślinach kapustowatych. W wyniku hydrolizy glukozynolanów przez mirozynazę powstają izotiocyjaniany (ITC), substancje o właściwościach chemoprewencyjnych i antibakteryjnych oraz przeciwzapalnych.

Głównym celem mojej pracy doktorskiej było zbadanie wpływu wybranych izotiocyjanianów na rozwój i wirulencję bakterii *V. cholerae*. W swojej pracy badałam działanie dwóch ITC aromatycznych, tj. benzylu (BITC) i fenetylu (PEITC) oraz sulforafanu (SFN), będącego izotiocyjanianem alifatycznym.

Jednym z etapów dysertacji było określenie wpływu badanych związków na żywotność bakterii. Na podstawie wartości minimalnych stężeń hamujących wzrost bakterii (MIC) i minimalnych stężeń bakteriobójczych (MBC) ustaliłam, że każdy z wybranych przeze mnie izotiocyjanianów posiadał potencjał antibakteryjny. Określiłam również, że najefektywniejsze działanie wobec *V. cholerae* wykazywał BITC (MIC 0,5 mM), a najsłabsze PEITC (MIC 2 mM). Ponadto, każdy ITC hamował wzrost hodowli bakterii, a ograniczenie tego wzrostu było zależne od stosowanych stężeń. Stwierdziłam również, że ITC zmniejszały zdolność *V. cholerae* do tworzenia biofilmu, a także ograniczały aktywność metaboliczną komórek tworzących biofilm.

Badane ITC prowadziły do zmniejszenia syntezy zarówno DNA, jak i RNA. Zjawisko gwałtownego zahamowania syntezy RNA w komórkach bakteryjnych związane jest z indukcją odpowiedzi ścisłej. Jest to jeden z kluczowych mechanizmów adaptujących komórkę bakteryjną do warunków stresowych. W odpowiedzi ścisłej udział biorą dwa

podstawowe białka: syntetaza RelA oraz dwufunkcyjne białko SpoT posiadające właściwości syntetazy i hydrolazy cztero- i pięcioletfosforanów guanozyny ((p)ppGpp). Białka te w wyniku niekorzystnych warunków środowiskowych, takich jak głód aminokwasowy, niedobór węgla, fosforu czy żelaza prowadzą do syntezy i akumulacji (p)ppGpp. Alarmon ten pośrednio i bezpośrednio wpływa na regulację transkrypcji wielu genów komórkowych u bakterii. W moich badaniach wykazałam, iż każdy z badanych ITC prowadził do akumulacji alarmonów (p)ppGpp. Ponadto, w obecności nadmiaru specyficznych aminokwasów (Ala, Trp, Met, Asp, Leu, Cys, Izo, Phe, His, Tyr) obserwowałam odwrócenie efektu indukcji odpowiedzi ścisłej przez izotiocyjany i zahamowanie akumulacji alarmonów (p)ppGpp. Może to wskazywać na wpływ działania ITC na metabolizm aminokwasów czy proces translacji.

Na podstawie analizy qPCR określiłam, że dodanie do hodowli *V. cholerae* PEITC jak i SFN prowadziło do efektywnego zahamowania transkrypcji genów związanych z wirulencją patogenu. Na podstawie podobieństwa w zahamowaniu transkrypcji tych genów w wyniku głodu aminokwasowego oraz przez ITC, mogę przypuszczać, że badane związki działają poprzez indukcję odpowiedzi ścisłej.

Co więcej, analiza Western blot potwierdziła, że PEITC oraz SFN obniżały poziom syntezy form podjednostki  $\beta$  toksyny cholery. Bardzo istotnym wynikiem mojej pracy jest obserwacja, iż w obecności badanych ITC w hodowli lizaty bakteryjne wykazywały obniżoną toksyczność wobec linii komórkowych HeLa i Vero.

Podsumowując, badane ITC hamują wzrost bakterii *V. cholerae*, a także wpływają na ograniczenie masy i żywotności komórek w biofilmach. Ponadto ITC prowadzą do upośledzenia ekspresji genów zaangażowanych w wirulencję patogenu oraz bezpośrednio na zahamowanie syntezy podjednostek toksyny cholery.

Proponowany mechanizm działania związków polega na indukcji odpowiedzi ścisłej i akumulacji (p)ppGpp w komórkach, prowadząc do efektywnego zahamowania ekspresji genów odpowiedzialnych za wirulencję oraz zmniejszenia toksyczności *V. cholerae*.