

# Genetyczne podstawy odpowiedzi bakterii na przeciwbakteryjne światło niebieskie: implikacje dla bezpieczeństwa i rozwoju oporności

mgr Beata Agnieszka Kruszewska-Naczka

Oporność mikroorganizmów na antybiotyki stanowi jedno z największych wyzwań dla sektorów opieki zdrowotnej, rolnictwa oraz przemysłu. Większość infekcji wywoływana jest przez patogeny odporne na antybiotyki pierwszego wyboru. Rosnąca liczba szczepów rozwija oporność na antybiotyki tzw. ostatniej szansy oraz staje się tolerancyjna na środki dezynfekcyjne, co ogranicza dostępne opcje leczenia. Jedną z najbardziej obiecujących alternatyw w zwalczaniu tych infekcji jest przeciwdrobnoustrojowe światło niebieskie (ang. *antimicrobial Blue Light* – aBL). Strategia ta opiera się na obecności w komórkach bakteryjnych endogennych fotosensybilizatorów, które są aktywowane przez światło o określonej długości fali w spektrum światła niebieskiego. W obecności tlenu aktywowane fotosensybilizatory generują reaktywne formy tlenu (RFT, ang. *reactive oxygen species* – ROS), uszkadzając struktury komórkowe i ostatecznie prowadząc do śmierci komórek bakteryjnych. Szczegółowy mechanizm działania aBL wciąż pozostaje słabo poznany, co wpływa na rzadsze zastosowanie tej metody w rutynowej praktyce klinicznej. Brak pełnego zrozumienia podstaw genetycznych odpowiedzi bakterii na aBL ogranicza możliwość opracowania bezpiecznych protokołów terapeutycznych, które minimalizowałyby ryzyko powstania oporności lub innych form adaptacji na tę terapię.

Niniejsza praca doktorska miała na celu identyfikację genów zaangażowanych w odpowiedź bakterii na aBL, ocenę ryzyka potencjalnego rozwoju oporności na aBL oraz analizę jej implikacji dla bezpieczeństwa stosowania tej metody. Praca doktorska opiera się na pięciu publikacjach. Pierwsza z nich stanowi przegląd aktualnego stanu wiedzy oraz identyfikuje luki badawcze, natomiast pozostałe cztery artykuły naukowe odnoszą się do głównych i szczegółowych celów opisanych w niniejszej pracy.

Przeprowadzono badanie przesiewowe z użyciem kolekcji mutantów Keio w pojedynczych genach *Escherichia coli* BW25113 w celu identyfikacji mutantów hiperwrażliwych na aBL w porównaniu z dzikim typem. Wyselekcjonowano sześćdziesiąt cztery mutanty i zidentyfikowano funkcje usuniętych z nich genów. Geny te biorą udział w kluczowych procesach komórkowych, takich jak naprawa DNA, produkcja energii, regulacja metabolizmu oraz odpowiedź na stres. Aby potwierdzić rolę zidentyfikowanych genów w odpowiedzi bakterii na aBL, przeprowadzono komplementację mutacji dla wybranych mutantów. Komplementacja mutacji skutkowała przywróceniem wrażliwości na aBL do poziomu wrażliwości dzikiego typu lub zmniejszeniem wrażliwości na aBL poniżej tego poziomu, co potwierdza ochronną rolę badanych genów wobec aBL. Dodatkowo sprawdzono poziom ekspresji wybranych genów po ekspozycji na aBL w dzikim typie *E. coli*, porównując dwie różne długości fal światła niebieskiego: 409 nm i 415 nm. Gen *ihfB* wybrano jako referencyjny, ponieważ zachowywał stabilny poziom ekspresji po naświetlaniu. Analiza qPCR wykazała zwiększony poziom ekspresji w próbkach poddanych działaniu aBL w porównaniu z kontrolami nienaświetlanymi dla pięciu spośród siedemnastu badanych genów: *dacA*, *fabH*, *rbfA*, *umuD* i *yihE*, dla obu długości fal. Dodatkowo geny *purA* i *rfaC* wykazały zwiększoną ekspresję wyłącznie przy 409 nm. Wyniki te sugerują, że nie wszystkie produkty genów chroniących przed aBL są zaangażowane w odpowiedź na aBL jednocześnie, a ich udział zależy od parametrów naświetlania, takich jak długość fali i dawka aBL. Następnie wszystkie mutanty zostały poddane działaniu pojedynczych stresorów generowanych przez aBL, a ich defekty wzrostu oceniono w celu wykazania potencjalnej roli ochronnej produktów usuniętych genów w odpowiedzi na określony warunek stresowy. Większość mutantów była najbardziej wrażliwa na rodniki hydroksylowe ( $\bullet\text{OH}$ ) oraz anion ponadtlenkowy ( $\text{O}_2^-$ ), co sugeruje, że większość zidentyfikowanych genów chroni bakterie głównie przed tymi stresorami. Co istotne, nie zaobserwowano korelacji między wrażliwością na aBL a na pojedyncze stresory generowane przez aBL. Podkreśla to, że antybakteryjne działanie aBL wynika z łącznego efektu wielu czynników, a nie pojedynczego stresora.

W ostatniej publikacji przedstawiono wyniki dotyczące bezpieczeństwa stosowania aBL w przemyśle spożywczym z wykorzystaniem *E. coli* jako modelu patogenu przenoszonego przez żywność. Uzyskano populacje z fenotypowo stabilną tolerancją na ciepło i aBL. Co ważne, wrażliwość na antybiotyki obu populacji tolerancyjnych nie uległa zmianom. Przeanalizowano także możliwość rozwoju tolerancji krzyżowej między tymi dwoma metodami inaktywacji drobnoustrojów. Analiza wykazała, że populacje bakteryjne tolerancyjne na aBL wykazują zwiększoną tolerancję na ciepło, ale wrażliwość na aBL u populacji tolerancyjnych na ciepło pozostała bez zmian. Dodatkowo krótkoterminowa i długoterminowa wstępna ekspozycja na ciepło zmniejszała wrażliwość badanego szczepu na aBL. Zidentyfikowano jedenaście genów potencjalnie zaangażowanych w adaptację krzyżową i zaproponowano jej możliwy mechanizm.

Podsumowując, wszystkie sześćdziesiąt cztery zidentyfikowane geny mogą potencjalnie przyczynić się do rozwoju oporności. Nie zidentyfikowano jednak żadnych pojedynczych genów, których usunięcie mogłoby powodować oporność na aBL, co sugeruje, że aBL ma wysoki potencjał jako bezpieczna alternatywa dla antybiotyków. Jednakże ważne jest, aby nadal monitorować wszystkie sześćdziesiąt cztery geny zaangażowane w ochronę komórek przed aBL, by móc odpowiednio wcześniej wykryć ewentualne oznaki adaptacji. Aspekt ten powinien być uwzględniony przy tworzeniu odpowiednich protokołów stosowania aBL.