



UNIWERSYTET JANA KOCHANOWSKIEGO W KIELCACH

SZKOŁA DOKTORSKA

SEKCJA NAUKI ŚCISŁE I PRZYRODNICZE

DYSCYPLINA NAUKI BIOLOGICZNE

Dorota Kuc-Ciepluch

**METODY PERMEABILIZACJI BŁONY KOMÓRKOWEJ BAKTERII
GRAM-UJEMNYCH WSPOMAGAJĄCE DZIAŁANIE BÓJCZE
REKOMBINOWANEJ ENDOLIZYNY FAGOWEJ**

**Praca doktorska napisana
pod kierunkiem**

dr hab. Michała Arabskiego, prof. UJK

Kielce rok 2023

Składam serdeczne podziękowania mojemu Promotorowi dr hab. Michałowi Arabskiemu, prof. UJK za umożliwienie mi pracowania w Pańskim zespole, podsuniecie ciekawego tematu badań, poświęcony czas i za obdarzenie mnie ogromnym zaufaniem.

Szczególne podziękowania składam mojemu mężowi Karolowi, za wiarę we mnie, cierpliwość, pomoc w trudnych momentach oraz nieocenione wsparcie bez, którego ta praca by nie powstała.

Badania zrealizowano w ramach projektu:

„**AKCELERATOR ROZWOJU** Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach”, nr POWR.03.05.00-00-Z212/18, współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.

OPUS UMO-2017/27/B/NZ6/00199 Gasdermina jako potencjalny czynnik permeabilizujący zewnętrzną błonę komórkową *Pseudomonas aeruginosa* i wspomagający aktywność bakterjobójczą rekombinowanych endolizyn fagowych (kierownik dr hab. Michał Arabski, prof. UJK).

Cześć wyników zawartych w rozprawie została opublikowana w pracach:

Kuc-Ciepluch Dorota, Gorzkiewicz Michał, Pędziwiatr-Werbicka Elżbieta, Barrios-Gumiel Andrea, Lasak Magdalena, Mariak Aleksandra, Sztandera Krzysztof, Gomez Rafael, de la Mata F. Javier, Lankoff Anna, Klajnert-Maculewicz Barbara, Bryszewska Maria, Arabski Michał, Ciepluch Karol. The effect of surface modification of dendronized gold nanoparticles on activation and release of pyroptosis-inducing pro-inflammatory cytokines in presence of bacterial lipopolysaccharide in monocytes, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2022; 217: 112652, ISSN 0927-7765. DOI: doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112652.

Punkty MNiSW: 100, IF=5.999, IF 5-letni=5,126

Kuc-Ciepluch Dorota, Ciepluch Karol, Arabski Michał. Rodzina białek gazdermin jako czynnik permeabilizujący błonę komórkową w procesie pyroptozy/Gasdermin family proteins as a permeabilization factor of cell membrane in pyroptosis process. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 2021; 75: 337-344, e-ISSN 1732-2693. DOI: 10.5604/01.3001.0014.8985.

Punkty MNiSW: 40, IF= 0,357, IF 5-letni= 0,708

Ciepluch Karol, Maciejewska Barbara, Gałczyńska Katarzyna, **Kuc-Ciepluch Dorota**, Bryszewska Maria, Appelhans Dietmar, Drulis-Kawa Zuzanna, Arabski Michał. The influence of cationic dendrimers on antibacterial activity of phage endolysin against *P. aeruginosa* cells. *Bioorganic Chemistry*, 2019; 91: 103121. ISSN: 0045-2068. DOI: 10.1016/j.bioorg.2019.103121.

Punkty MNiSW: 100, IF=4.831, IF 5-letni=5,087

Spis treści

Wykaz skrótów i oznaczeń	8
1. Wprowadzenie	10
2. Budowa ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych	11
3. Endolizyny fagowe w eradykacji bakterii Gram-ujemnych	13
3.2 Nanocząstki jako egzogenne czynniki wspomagające aktywność endolizyny	14
3.1.1 Dendrymery kationowe	15
3.1.2 Dendrytyczne nanocząstki złota	17
3.2 Pyroptoza jako mechanizm permeabilizacji błony komórkowej	18
4. Cel pracy	22
5. Materiały i metody	23
5.1 Materiały	23
5.2. Metody	25
5.2.1. Dichroizm kołowy	25
5.2.2. Aktywność enzymatyczna endolizyny w obecności dendrymerów PPI	26
5.2.3. Aktywność przeciwbakteryjna glikodendrymerów w obecności endolizyny	26
5.2.4. Permeabilizacja zewnętrznej błony bakteryjnej przez gazderminę D	26
5.2.5. Mikromacierze ekspresyjne	27
5.2.6. Ilościowy PCR z odwrotną transkrypcją (RT-qPCR)	29
5.2.7. Ocena atywności kaspaz -1 i -4	29
5.2.8 Test ELISA	30
5.2.9 Western blot	30
5.2.10. Ocena właściwości przeciwbakteryjnych	31
5.2.11. Analiza statystyczna wyników	31
6. Wyniki	33
6.1. Zastosowanie dendrymerów polikationowych jako egzogennych czynników permeabilizujących zewnętrzną błonę komórkową	33

6.1.1. Ocena oddziaływania endolizyny z dendrymerami polikationowymi zmierzona metodą dichroizmu kołowego	33
6.1.2. Ocena spektrofotometryczna degradacji peptydoglikanu przez endolizynę w obecności dendrymerów polikationowych.....	34
6.1.3. Ocena aktywności bójczej endolizyny w obecności dendrymerów polikationowych	35
6.2. Indukcja pyroptozy przez dendrytyczne nanocząstki złota oraz LPS jako endogenne mechanizm wspomagający permeabilizację zewnętrznej błony bakteryjnej.....	38
6.2.1. Oddziaływanie gazderminy D z zewnętrzną błoną bakterii i wpływ na aktywność enzymatyczną endolizyny	38
6.2.2. Efekt LPS-u na komórki eukariotyczne zmierzony metodą mikromacierzy ekspresyjnych.....	39
6.2.2.1. Efekt LPS-u na komórki linii A549 zmierzone metodą mikromacierzy ekspresyjnych.....	39
6.2.2.2. Efekt LPS-u na komórki linii HeLa zmierzone metodą mikromacierzy ekspresyjnych.....	41
6.2.2.3. Efekt LPS-u na komórki linii THP1-Xblue zmierzony metodą mikromacierzy ekspresyjnych.....	45
6.2.2.3.1. Efekt LPS-u na ekspresję <i>GSDMD</i> w komórkach linii THP1-Xblue zmierzony metodą RT-qPCR	51
6.2.2.3.2. Efekt LPS-u na poziom IL-1 β w komórkach linii THP1-Xblue zmierzony metodą ELISA.....	51
6.2.2.3.3. Produkcja <i>GSDMD</i> przez komórki THP1-Null2 w obecności LPS-u.....	52
6.2.2.3.4. Efekt LPS-u na poziom IL-1 β w komórkach linii THP1-Null2 zmierzony metodą ELISA.....	53
6.2.2.3.5. Ocena właściwości przeciwbakteryjnych endolizyny w obecności podłoża pochodowlanych THP1-Null2 po stymulacji pyroptozy LPS-em	54
6.2.3. Efekt dendrytycznych nanocząstek złota na aktywację procesu pyroptozy.....	55
6.2.3.1. Poziom ekspresji <i>NLRP3</i> w obecności dendrytycznych nanocząstek złota oraz LPS-u zmierzony RT-qPCR.....	55

6.2.3.2. Ocena spektrofotometryczna aktywacji kaspazy -1 i -4 przez dendrytyczne nanocząstki złota oraz LPS	56
6.2.3.3. Ocena produkcji interleukiny IL-1 β i IL-18 w obecności dendrytycznych nanocząstek złota oraz LPS-u	58
6.2.3.4. Analiza ekspresji GSDMD w obecności dendrytycznych nanocząstek złota oraz LPS-u zmierzona ilościowym PCR w czasie rzeczywistym i Western blot	60
7. Dyskusja	62
8. Wnioski.....	68
9. Streszczenie	69
10. Summary.....	71
11. Piśmiennictwo	73
12. Dorobek naukowy	79

Wykaz skrótów i oznaczeń

- ACTB** – beta aktyna (actin beta)
- AgNP** – nanocząstki srebra (silver nanoparticles)
- ALR** – receptory AIM-2 podobne (AIM2-like receptor ALR)
- AMP** – peptydy antybakteryjne (antimicrobial peptides)
- ASC** – adaptorowe białko apoptotyczne (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD)
- AuNP** – nanocząstki złota (gold nanoparticles)
- CARD** – domena rekrutująca i aktywująca kaspazy (caspase activation and recruitment domain)
- CBD** – domena C-końcowa, wiążąca się ze specyficznym receptorem ściany komórkowej bakterii (bacterial cell wall receptor)
- CL** – kardiolipina (cardiolipin)
- CLR** – receptory lektyny typu C (types C-type lectin receptors)
- CPS** – polisacharydy otoczki (capsule polysaccharides)
- DAMP** – wzorce molekularne związane ze zniszczeniami pochodzącymi z komórek gospodarza (damage-associated molecular pattern)
- EAD** – domena N-końcowa z aktywnością enzymatyczną (domain with enzymatic activity)
- EDTA** – sól disodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego (ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt)
- EPS** – zewnątrzkomórkowe polisacharydy (extracellular polysaccharides)
- GAPDH** – dehydrogenaza aldehydu 3- fosfoglicerynowego (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)
- GBP** – białko wiążące guanozynę (guanylate binding protein)
- GO** – ontologia genów (gene ontology)
- GSDM (family)** – rodzina białek zawierających domenę gasdermin (gasdermine-domain-containing protein family)
- LPS** – lipopolisacharyd
- IFN- γ** – interferon gamma (interferon gamma)
- IM** – błona wewnętrzna (inner membrane)
- IL-1 β** – interleukina-1beta (interleukin -1beta)
- IL-18** – interleukina 18 (interleukin-18)
- MDR** – bakterie wielolekooporne (multidrug resistance)
- MCRS** – bakterie lekooporne na kolistynę (mobilized colistin resistance strains)
- MRI** – rezonans magnetyczny (magnetic resonance imaging)
- NAMP** – wzorce molekularne związane z nanocząstkami (nanoparticle-associated molecular patterns)
- NBD** – domena centralna receptorów NOD-podobnych
- NF- κ B** – jądrowy czynnik transkrypcyjny (nuclear transcription factor)
- NLR** – receptory NOD-podobne (NOD-like receptor)

NLRP3 – domena pirynowa z rodziny NLR zawierająca 3 (NLR family pyrin domain containing 3)

NPN – N-fenyl-1-naftyloamina (N-phenyl-1-naphthylamine)

Occ - kanał karboksylanowy błony zewnętrznej (outer membrane carboxylate channel)

OM – błona zewnętrzna (outer membrane)

OMV – zewnątrzkomórkowe pęcherzyki (outer membrane vesicles)

PAMAM – dendrymery (poli(amidoaminowe) (poly (amidoamine))

PAMP – wzorce molekularne związane z patogenami (pathogen-associated molecular patterns)

PE – fosfatydyloetanolamina (phosphatidylethanolamine)

PFD – domeny tworzące pory (pore-forming domain)

PEG – polietylenoglikol (polyethyleneglycol)

PG – peptydoglikan (peptidoglycane)

PPI – polikationowe dendrymery polipropylenoiminowe (polypropilenimine)

PPI-OS – glikodendrymer modyfikowany maltozą (glycodendrimer modified with maltose)

PRR – receptory rozpoznające patogeny (pattern recognition receptors)

PYD – domena zawierająca pirynę (pyrin domains)

RIN – liczba integralności RNA (RNA integrity number)

RLR – receptory RIG-I-podobne (RIG-I-like receptors)

ROS – reaktywne formy tlenu (reactive oxygen species)

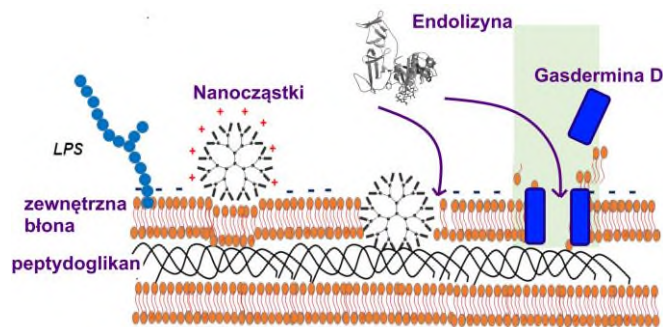
SDR – leki o przedłużonym uwalnianiu (prolonged release – PR, sustained release – SR)

SID – domena hamująca solubilizację (solubilizing inhibitory domain)

1. Wprowadzenie

Istotnym problemem współczesnej medycyny jest narastająca antybiotykooporność bakterii. Możliwości leczenia zakażeń bakteryjnych wywołanych przez szczepy odporne przy użyciu antybiotyków są ograniczone, co wiąże się ze wzrostem zachorowalności i obniżeniem skuteczności klasycznych terapii. Jednym z gatunków bakterii, której mechanizm oporności wobec klasycznych terapii stanowi problem o zasięgu światowym jest Gram-ujemna pałeczka ropy błękitnej *Pseudomonas aeruginosa* [1,2]. *P. aeruginosa* jest sklasyfikowana jako organizm grupy ESKAPE tzn. odporny wobec antybiotyków stosowanych w klasycznych terapiach. Oporność ta ma charakter zarówno wrodzony związany między innymi z nadekspresją pomp wyrzutowych, jak również nabyty poprzez mutacje w genach kodujących np. białka poryn [3].

Dane literaturowe z okresu ostatnich lat wskazują na intensyfikację badań mających na celu poszukiwanie nowych narzędzi walki z patogenami, alternatywnymi wobec klasycznej antybiotykoterapii np. wykorzystanie nanocząstek metali [4], organizmów probiotycznych [5], bakteriofagów [6], peptydów przeciwdrobnoustrojowych (AMPs) [7] czy koniugatów AMP-polimer [8]. Ważnym aspektem mechanizmu działania nowych preparatów jest permeabilizacja zewnętrznej błony bakteryjnej bakterii Gram-ujemnych. Opracowanie sposobu jej pokonania warunkuje skuteczność mechanizmów bójczych, co jest celem niniejszej pracy. W ramach rozprawy zaproponowano dwie możliwości permeabilizacji zewnętrznej błony bakteryjnej tj. poprzez nanocząstki oraz białka (gazderminy) tworzące kanały w błonie w trakcie pyroptozy. Powyższe metody opracowano w celu wzmocnienia właściwości przeciwbakteryjnych endolizyn fagowych degradujących peptydoglikan (Ryc. 1).



Rycina 1. Proponowany schemat permeabilizacji zewnętrznej błony komórkowej przez nanocząstki lub białko gazderminę D indukowaną w procesie pyroptozy, dla endolizyny fagowej degradującej peptydoglikan.

2. Budowa ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych

Ścianę komórkową bakterie Gram-ujemnych budują dwie warstwy błony komórkowej (zewnętrznej i wewnętrznej) pomiędzy którymi występuje przestrzeń z peptydoglikanem (mureiną). Zewnętrzną warstwę stanowi zewnętrzna błona (OM), która posiada funkcję ochronną i utrzymuje integralność komórek w zmiennych warunkach środowiskowych [3]. Błona ta zbudowana jest z symetrycznej dwuwarstwy fosfolipidowej i asymetrycznej warstwy wewnętrznej złożonej z fosfolipidów jak na przykład fosfatydyloglicerole (PG) i kardiolipina (CL) czy fosfatydyloetanoloamina (PE), które w zależności o gatunku bakterii występują w różnych proporcjach [9]. Warstwę zewnętrzną tej błony stanowią specyficzne białka i lipopolisacharyd (LPS) [9]. Błona zewnętrzna zawiera dwie klasy białek: lipoproteiny i białka β -baryłkowe - poryny [10], które tworzą kanały dyfuzyjne, umożliwiające wymianę małych cząsteczek, takich jak aminokwasy i niskocząsteczkowe sacharydy [3]. Poryny te ulegają pofałdowaniu w kształcie β -baryłek zbudowanych z antyrównoległych form β -kartki z hydrofobowymi aminokwasami, które skierowane są na zewnątrz i hydrofilowymi resztami skierowanymi do wewnątrz baryłki, wyściełającymi te pory. Ogólnie u bakterii Gram-ujemnych wyróżnia się dwie klasy kanałów dyfuzyjnych takie jak duże niespecyficzne poryny oraz poryny specyficzne dla danego substratu. Błona *P. aeruginosa* charakteryzuje się brakiem dużych poryn. Komórki *P. aeruginosa* charakteryzuje niska przepuszczalność błony zewnętrznej (około 8% przepuszczalności błony *E. coli*), w czym m in. upatruje się oporność na antybiotyki. Ponadto białka rodziny OprD (Occ) umożliwiają wychwyt szerokiego wachlarza małych cząsteczek o masie około 200 Da [11]. Jedną z ważniejszych poryn związanych z mechanizmem oporności na antybiotyki jest OmpH, która odpowiada za

oddziaływanie z LPS-em. Indukcja dwuskładnikowych systemów regulacyjnych PhoP-PhoQ i PmrA-PmrB przez niskie stężenie jonów Mg^{2+} i obecność antybiotyków prowadzi do aktywacji OmpH, a tym samym zwiększa oporność bakterii na antybiotyki jak polimyksyny i aminoglikozydy [2].

Składnikiem zewnętrznej błony komórkowej bakterii Gram-ujemnych jest endotoksyna (lipopolisacharyd; LPS). LPS składa się z lipidu A, części rdzeniowej oraz antygeny O, czyli łańcucha polisacharydowego, którego budowa jest zmienna na poziomie szczepów bakteryjnych. Lipid A jest odpowiedzialny za toksyczność LPS-u, a na jego konserwatywną budowę składa się szkielet N- i O-acylowany bisfosforan diglukozaminy [4-P- β -D-GlcpNII-(1 \rightarrow 6)- α -D-GlcpNI-(1 \rightarrow P)] i od czterech do siedmiu łańcuchów acylowych charakteryzujących się zmiennością obejmującą liczby pierwszorzędowych grup acylowych i rodzajów kwasów tłuszczowych. Lipid A łączy się kowalencyjnie z częścią rdzeniową zbudowaną z 8-12 cukrów, w strukturze której można wyodrębnić część zewnętrzną i wewnętrzną, która jest ufosforylowana i karboksylowana. Część wewnętrzna rdzenia składa się z dwóch reszt kwasu D-manno-okto-2-ulozonowego (KDO) oraz dwóch reszty L-glicero-D-manno-heptozy. Podstawniki fosforanowe mogą mieć charakter mono-, di- lub nawet trifosforanowy. W części rdzeniowej LPS-u niektórych szczepów *P. aeruginosa* obecne są również mono- lub difosforan etanoloaminy. Część zewnętrzna rdzenia LPS-u *P. aeruginosa* występuje w dwóch izoformach. Obie te formy zawierają resztę galaktozaminy, trzy reszty D-glukozy i jedną resztę L-ramnozy, której pozycja różni się w zależności od izoformy. W cukrach budujących te glikoformy grupy hydroksylowe ulegają O-acetylacji. Acetylowana jest również końcowa reszta L-ramnozy. Część rdzeniowa LPS-u połączona jest z antygenem O. LPS zawierający w swojej strukturze antygen O występuje na poziomie 10–50% [12]. Antygen O zbudowany jest z powtarzających się jednostek będących pochodnymi cukrowymi. Pomiędzy błonami w ścianie komórkowej bakterii Gram-ujemnych występuje peptydoglikan (mureina). Peptydoglikan jest sztywnym egzoszkieletem odpowiadającym za kształt komórki bakteryjnej zapewniając jej wytrzymałość mechaniczną i odporność na lizę osmotyczną. Peptydoglikan składa się z długich łańcuchów polisacharydowych, usieciowanych przez mostki peptydowe. Każdy łańcuch polisacharydowy zbudowany z cukrów i aminokwasów tj. disacharydu N-acetyloglukozaminy (NAG) i kwasu N-acetylmuraminowego (NAM) połączonych wiązaniem β -1,4-glikozydowym [10]. Do kwasu N-acetylmuraminowego dołączony jest natomiast zbudowany z 3-5 aminokwasów łańcuch oligopeptydowy, który usieciowany jest przez mostki peptydowe z łańcuchem peptydowym

sąsiadującej nici, tworząc trójwymiarową strukturę. U bakterii Gram-ujemnych warstwa peptydoglikanu ma około 7 nm grubości. Błona wewnętrzna (IM), jest dwuwarstwą fosfolipidową, która odpowiada m.in. za procesy transportowe związane z biosyntezą [3].

3. Endolizyny fagowe w eradykacji bakterii Gram-ujemnych

Endolizyny to enzymy z grupy hydrolaz kodowane przez bakteriofagi, zdolne do degradacji peptydoglikanu (PG; mureina), co umożliwia uwolnienie namnożonych wirionów z komórki bakteryjnej w późniejszej fazie cyklu litycznego. Endolizyny można podzielić na pięć grup w zależności od swoistości enzymatycznej degradacji wiązań w strukturze PG: N-acetylo- β -D-muramidazy i lityczne transglikozylazy, które rozszczepiają wiązanie w obrębie N-acetylmuramoilo- β -1,4-N-acetyloglukozaminy; N-acetylo- β -D-glukozaminidazy przecinające inne wiązania glikozydowe; amidazy N-acetylmuramoilo-L-alaniny mogące hydrolizować wiązanie amidowe między ugrupowaniami cukru i peptydu oraz endopeptydazy które rozszczepiają wiązania w obrębie tetrapeptydu PG [13].

W budowie chemicznej endolizyn degradujących PG bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych zaobserwowano różnice strukturalne. Gram-dodatnie endolizyny składają się z dwóch domen połączonych łącznikiem: domeny N-końcowej z aktywnością enzymatyczną (EAD) rozszczepiającej PG oraz domeny C-końcowej wiążącej się ze specyficznym receptorem ściany komórkowej bakterii (CBD) [14]. Endolizyny specyficzne dla bakterii Gram-ujemnych charakteryzuje funkcja katalityczna jednej domeny kulistej [15]. Wyjątkiem są endolizyny wobec niektórych bakterii Gram-ujemnych, m.in. *P. aeruginosa*, które również mają strukturę modułową z N-końcem CBD i C-końcem EAD [14].

Dane literaturowe dotyczące zastosowania endolizyn fagowych w eradykacji bakterii Gram-ujemnych wskazują na ich zróżnicowaną aktywność. Rekombinowana endolizyna LysSS kodowana przez bakteriofaga Salmonella SS3e działała przeciwbakteryjnie wobec *A. baumannii*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* czy *Salmonella* bez dodatkowych czynników zwiększających przepuszczalność zewnętrznej błony komórkowej [16]. Podobny efekt zaobserwowano wobec endolizyny PlyPAJD-1 przeciwko *P. aeruginosa*, endolizyn LysAm24, LysECD7 oraz LysSi3 wobec *A. baumannii*. SPN9CCa wobec *E. coli* oraz LysPA26 wobec *P. aeruginosa* [17].

Jednak pomimo powyższych doniesień, stosowanie większości rekombinowanych endolizyn fagowych wobec bakterii Gram-ujemnych wymaga użycia czynników zwiększających przepuszczalność błony, jak EDTA w połączeniu z endolizyną SPN9CC wobec *S. enterica*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. putida*, *S. boydii*, *S. flexneri*, *V. fischeri* i *V. vulnificus* [17], [18,19]. Kwasy organiczne jak kwas cytrynowy, jabłkowy, mlekowy czy kwas benzoesowy również wspomagają efekt bakteriobójczy endolizyn np. Lys68 oraz ABgp46 [17,18]. Wykazano, że skutecznym destabilizatorem błony bakteryjnej są również związki o aktywności jonoforów jak nigerycyna, która dodatkowo jest zdolna do aktywacji procesu pyroptozy [1].

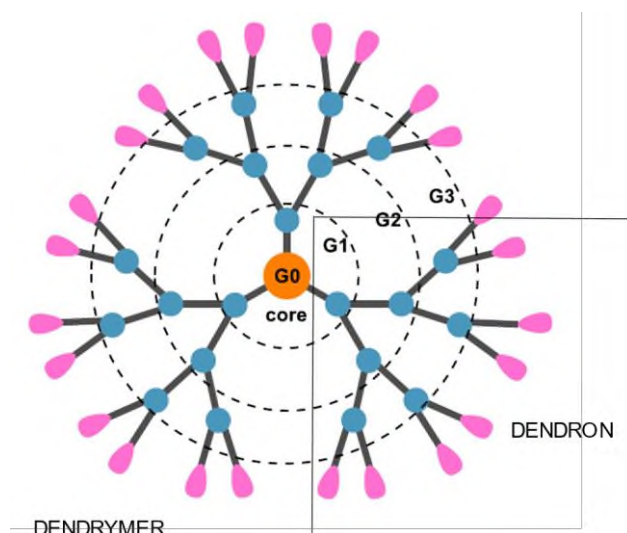
Zastosowanie permeabilizatorów błony jak EDTA, kwasy organiczne czy jonofory jest więc obiecującym narzędziem przeciw oporności bakteryjnej, ponieważ endolizyny fagowe jako białka bójcze wobec bakterii Gram-ujemnych do swojego działania wymagają dodatkowych czynników wspomagających ich aktywność hydrolityczną wobec PG, bezpośrednio związanych z zaburzeniem integralności zewnętrznej błony komórkowej. Czynniki te mogą mieć zarówno charakter egzogeny tj. zastosowanie związków chemicznych oddziałujących i zaburzających strukturę zewnętrznej błony komórkowej bakterii jak dendrymery czy nanozwiązki, jak również charakter endogeny związany z indukcją czynników permeabilizujących błonę np. w procesie pyroptozy zależnym od LPS-u bakteryjnego.

3.2 Nanocząstki jako egzogenne czynniki wspomagające aktywność endolizyny

Nanocząstki biomedyczne, zarówno nieorganiczne jak i organiczne (w tym dendrymery, nanowłókna i nanocząstki metali) ze względu na unikalne właściwości fizykochemiczne są obecnie postrzegane jako potencjalne czynniki terapeutyczne [20]. Są to doskonale monodispersyjne makrocząsteczki o precyzyjnie kontrolowanej budowie chemicznej. Wykazują ogromny potencjał aplikacyjny w terapiach genowych, systemach podaży leków o przedłużonym uwalnianiu (SDR) [21,22], obrazowaniu medycznym oraz jako związki o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych i przeciwwirusowych [23,24]. Ich cechy strukturalne, jak wysoka gęstość miejsca reaktywnego chemicznie na zewnętrznej powłoce [25] oraz możliwość modyfikacji powierzchni [26,27] w połączeniu z powtarzalnymi i

nowoczesnymi metodami ich otrzymywania (np. technika elektroprzędzenia jako platforma inżynierii tkanki kostnej) [28] zwiększają ich zastosowanie w biologii i medycynie [23].

Wśród najlepiej przebadanych nanocząstek można wyróżnić dendrymery. Dendrymery są to silnie rozgałęzione, monodispersyjne makrocząsteczki o precyzyjnie kontrolowanej budowie chemicznej, które zostały po raz pierwszy zsyntetyzowane przez Tomalię i wsp. oraz Newkome i wsp. [29,30]. Specyficzne właściwości dendrymerów cieszą się dużym zainteresowaniem w zakresie medycynie i biologii, w tym jako nośniki leków, wektory do transfekcji genów oraz jako czynniki rezonansu magnetycznego MRI (magnetic resonance imaging). Struktura dendrymerów oparta jest na zwielokrotnionych przyłączonych gałęziach tzw. dendronach do rdzenia cząsteczki (Ryc. 2). Każde kolejne rozgałęzienie dendronów tworzy wyższą generację dendrymeru.



Rycina 2. Ogólny schemat dendrymerów. G - kolejne generacje dendrymeru. Na powierzchni dendrymeru występują funkcjonalne grupy terminalne. Gałęzie (dendrony) przyłączone są do rdzenia [31].

3.1.1 Dendrymery kationowe

Szczególne właściwości bakteriobójcze związane z zaburzeniem integralności błony komórkowej posiadają dendrymery kationowe. Są one dendrytycznymi polimerami o kolistej strukturze, silnie rozgałęzionymi z dużą ilością końcowych grup funkcyjnych o hydrofobowym szkielecie, dobrze rozpuszczalne w wodzie, a ich budowa wpływa zarówno na oddziaływanie hydrofobowe, jak i hydrofilowe [32]. Dzięki możliwości modyfikacji ich rozmiaru, stopnia rozgałęzienia i podstawienia grupami funkcyjnymi, charakteryzują się

dużymi możliwościami oddziaływania w różnych warunkach fizyko-chemicznych [33,34] z zachowaniem biokompatybilności [32]. Większość polikationowych dendrymerów (poli(propylenoiminowych) (PPI) i (poli(amidoaminowych)) (PAMAM)), metalodendrymerów i glikodendrymerów wykazuje działanie przeciwbakteryjne wobec bakterii Gram-ujemnym w stężeniach powyżej 10 μM [35,36]. Jednak w tym samym stężeniu widoczny jest również efekt hemolityczny, dlatego też często konieczna jest modyfikacja poprzez przyłączenie ligandów ukierunkowana na oddziaływanie ze składnikami błony bakteryjnej [37] [38]. Jedną z takich modyfikacji powierzchni dendrymerów jest przyłączenie jednostek cukrowych, co zwiększa ich hydrofilowość, nie zaburzając ładunku dodatniego, który jest niezbędny do interakcji z resztami fosforanowymi lipidów błonowych. Powyższe glikolipidy charakteryzuje potencjalne zastosowanie biologiczne min. w immunoterapii opartej na DC przeciw wirusowi HIV [37] jako mimetyki strukturalne markerów antygeny T obecnych na powierzchni komórek raka piersi [39]. Zaobserwowano, iż dodatek maltozy do struktury dendrymerów zmniejsza ich hemolityczny efekt i cytotoksyczność [40]. Ponadto glikodendrymery mogą zachowywać się jak glikoproteiny na powierzchni komórki oddziałując z lektyną bakteryjną, przez co mogą być również stosowane jako makrocząsteczki przeciwadhezyjne [41].

Dendrymery polikationowe jako związki przeciwbakteryjne mogą być stosowane jako czynniki wspomagające właściwości bójcze innych preparatów. Powyższy efekt addytywny może stanowić alternatywę dla klasycznych metod eradykacji bakterii. Efekt ten zaobserwowano w układach dendrymerów polikationowych ze związkami permeabilizującymi błonę bakteryjną jak antybiotyki czy mezoporowate nanocząsteczki krzemionkowe [42,43]. Dendrymery PPI z amoksycyliną wykazują zwiększoną aktywność przeciwdrobnoustrojową w porównaniu z samym antybiotykiem. Kowalencyjne połączenie dendrymerów PPI z mezoporowatymi nanocząsteczkami krzemionki (obciążonych lewofloksacyną) pozwoliło na ich internalizację na powierzchni komórek bakterii Gram-ujemnych.

Mechanizm bójczy dendrymerów kationowych związany jest przede wszystkim z zaburzeniem integralności błony komórkowej [44,45]. Aktywność destabilizująca błonę przez dendrymery jest ściśle związana z ich strukturą supramolekularną i rozkładem ładunku [46]. Ich kationowy ładunek jest niezbędny do interakcji z błoną lipidową bakterii poprzez oddziaływania elektrostatyczne z grupami fosforanowymi LPS-u i zwiększenie przepuszczalności błony bakteryjnej przez zmianę równowagi kationów Mg^{2+} i Ca^{2+} , co umożliwia dendrymerom przejście przez błonę komórkową [46–48] oraz resztami

fosforanowymi lipidów błonowych. Dodatni ładunek dendrymerów warunkuje depolaryzację błony komórkowej i prowadzi do formowania porów w jej strukturze [49].

Powyższe właściwości biologiczne dendrymerów kationowych, tj. możliwość ich interakcji z błoną komórkową w celu zaburzenia integralności, klasyfikuje je jako potencjalne czynniki wspomagające efekt bójczy endolizyn wobec bakterii Gram-ujemnych.

3.1.2 Dendrytyczne nanocząstki złota

Spośród wielu nanocząstek o potencjalnych zastosowaniach biomedycznych na szczególną uwagę zasługują nanocząstki ze względu na swoje unikalne właściwości fizykochemiczne zależne od wielkości i kształtu oraz biokompatybilność [50–53]. Ich stabilność i reaktywność wraz z wysokim stosunkiem powierzchni do objętości umożliwiają kontrolowane zmiany ich właściwości fizyko-chemicznych poprzez kowalencyjne modyfikacje powierzchni, m.in. dendronizację lub PEGylację. Pozwala to na uzyskanie skutecznych nośników o specyficznych właściwościach dedykowanych m.in. do dostarczania kwasów nukleinowych w terapii genowej [51], leków przeciwnowotworowych czy też jako narzędzia diagnostyczne [52,54].

Stwierdzono, że nanocząstki złota AuNP zwiększają produkcję wewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu (ROS), zmniejszają potencjał błony mitochondrialnej, indukują fragmentację DNA i aktywują białka proapoptotyczne [55,56], prowadząc do apoptozy [45]. Zarówno rdzeń jak i ich powierzchnia mogą przyczyniać się do efektów cytotoksycznych AuNP, które zaobserwowano *in vitro* i *in vivo* [57,58].

Dodatkowo układy dendrymerów i dendronów przyłączone do AuNP mogą je stabilizować za pomocą końcowych grup dendrymerów lub poprzez zakotwiczenie dendronów na powierzchni NP [59]. Większość nanocząsteczek metali wzmacnia działania peptydów przeciwbakteryjnych [60,61] oraz antybiotyków [43,62]. Ponadto, AuNP można rozważać jako związki destabilizujące błonę komórkową w celu zwiększenia jej przepuszczalności dla endolizyn fagowych. Dodatkowo możliwość modyfikacji np. PEG-iem zwiększają ich biokompatybilność oraz chronią przed interakcją z białkami gospodarza poprzez wytworzenie strefy hydratacyjnej w wyniku PEGylacji.

Zaburzenie przepuszczalność zewnętrznej błony bakteryjnej wydaje się być jedną z najlepszych metod eradykacji bakterii [63]. Nanocząstki mogą indukować proces pyroptozy prowadzący do destabilizacji struktury błony komórkowej np. w komórkach wątroby,

keratynocytach oraz kardiomiocytach. Mechanizm ten związany jest z aktywacją szlaku sygnałowego NLRP3/kaspazy-1/GSDMD prowadzący do wypływu IL-1 β i IL-18 [64–66].

Modyfikacja nanoczątek metali kationowymi dendronami prowadzi do zwiększenia ich aktywności bakteriobójczej [67]. Dendronizacja nanocząstek srebra (AgNP) zwiększa ich właściwości bakteriobójcze wobec szczepów opornych na kolistynę (MCRS) i hamuje tworzenie biofilmu przez *S. aureus*. Ponadto, opisano przeciwbakteryjne działanie endolizyny fagowej w układzie z dendrytycznymi AgNP przeciwko szczepowi *P. aeruginosa* PAO1 i jego mutantowi szorstkiemu $\Delta wbpL$ [68]. Dendrytyczne AgNP bez względu na PEGylację są w stanie pokonać zewnętrzną błonę bakterii wspomagając transport endolizyny przez błonę.

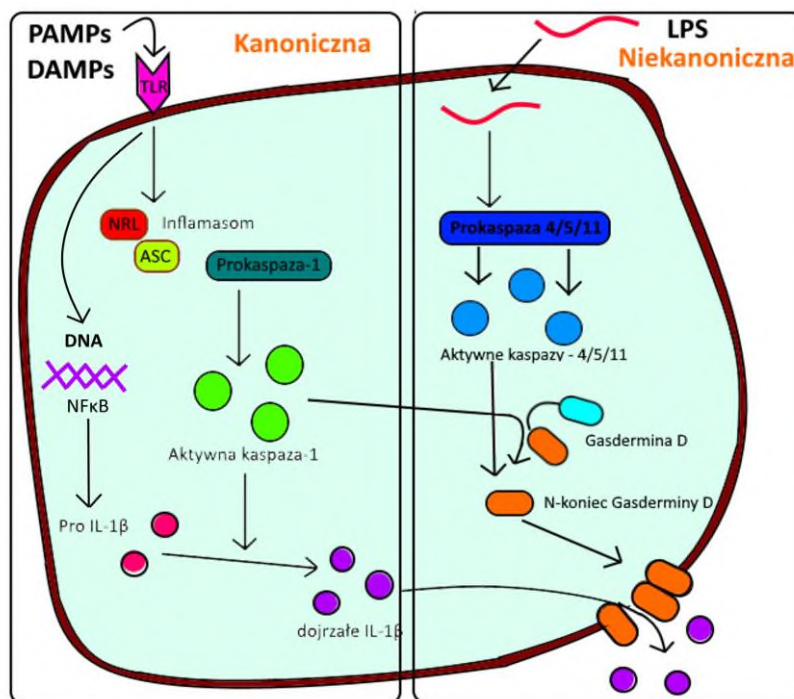
3.2 Pyroptoza jako mechanizm permeabilizacji błony komórkowej

Jednym z naturalnych permeabilizatorów zewnętrznej błony bakterii może być wykorzystanie naturalnego procesu zwanego pyroptozą. Programowana śmierć komórki jest jednym z podstawowych, a zarazem najważniejszych mechanizmów odpowiedzialnych za prawidłowy przebieg procesów fizjologicznych w organizmie, jak i za funkcjonowanie jego systemu immunologicznego. Śmierć komórki na drodze apoptozy, autofagii, katastrofy mitotycznej, nekrozy, pyroptoza czy starzenie się obejmują różne szlaki metaboliczne w zależności od czynników je inicjujących czy też fazy cyklu komórkowego [69]. Spośród wymienionych rodzajów śmierci komórki na szczególną uwagę zasługuje proces pyroptozy, który różni się od apoptozy i jest związany z odpowiedzią immunologiczną, która może być indukowana przez bakterie, wirusy, grzyby i pasożyty [70].

Śmierć komórki na drodze pyroptozy może być aktywowana poprzez szlak kanoniczny lub niekanoniczny, które to zależą od specyficznych dla nich receptorów oraz rodzaju kaspazy jak kaspaza-1 (szlak kanoniczny) [71] lub kaspaza-4/-5 (szlak niekanoniczny) [72] (Ryc. 3). W przypadku drogi kanonicznej pyroptozy, receptory rozpoznające patogeny PRR do których należą zewnątrzkomórkowe receptory Toll-podobne (TLR4) lub wewnątrzkomórkowe receptory NOD-podobne (NLR), receptory RIG-I-podobne (RLR) czy receptory AIM-2 podobne (ALR) [73,74] rozpoznają specyficzne dla nich wzorce molekularne związane z patogenami (PAMP) oraz wzorce niezakaźne związane z uszkodzeniem komórek (DAMP) [75]. W wyniku ich aktywacji dochodzi do formowania kompleksu białkowego zwanego inflamasomem składającego się nie tylko z receptorów PRR, głównie NLR, ale także z białka AIM2, piryny, białka adaptorowego ASC oraz prokaspazy-1 [75,76]. Aktywacja ta przez oligomeryzację receptorów NLR, przekazuje sygnał

poprzez proces fosforylacji, za pomocą ich N-końcowej domeny pirynowej PYD, na białko ASC. Białko ASC oddziałuje z domeną CARD prokaspazy-1 za pomocą jego domeny rekrutacyjnej CARD (oddziaływania CARD-CARD). W wyniku tych procesów, na skutek proteolitycznego cięcia prokaspazy-1, w miejscu jej dwóch katalitycznych domen, czyli podjednostki p10 i p20, powstaje aktywna forma kaspazy-1. Podjednostki te oligomeryzują i tworzą proteolityczne tetrametry, które posiadają zdolność do przekształcenia pro-interleukin proIL-1 β i -18 w ich dojrzałą aktywną postać [77]. Następnie dochodzi do uwolnienia IL-1 β i IL-18 przez pory w błonie komórkowej powstałe na skutek aktywacji białka gazderminy D (GSDMD).

Istotne jest tu również, że aktywna kaspaza-1 poza indukcją szlaku kanonicznego może również brać udział w aktywacji szlaku niekanonicznego na drodze GSDMD-zależnej. Oba szlaki prowadzą do aktywacji inflamasomu NLRP3 za pomocą kaspazy-1 ze szlaku kanonicznego [78] (Ryc. 3), która w dalszej kolejności odpowiada za cięcie enzymatyczne w obrębie gazderminy i prowadzi do tworzenia porów. Takie właściwości kaspazy-1 nie mają jednak przekładu na aktywność kaspaz-4 i -5, które niezależnie od kaspazy-1 i inflamasomu indukują sygnalizację niekanoniczną za pomocą białka gazderminy D. Prowadzi to również do sekrecji interleukin IL-1 β i IL-18. Interleukina-18 aktywuje w dalszej kolejności wydzielanie interferonu γ (IFN- γ) przez komórki Th1, NK i cytotoksyczne komórki T oraz bierze udział w dojrzewaniu komórek Th2, czym wzmacnia dalszą odpowiedź immunologiczną. Natomiast IL-1 β odpowiada za indukcję komórek wrodzonej odpowiedzi immunologicznej oraz za modulowanie swoistej odpowiedzi immunologicznej [79].

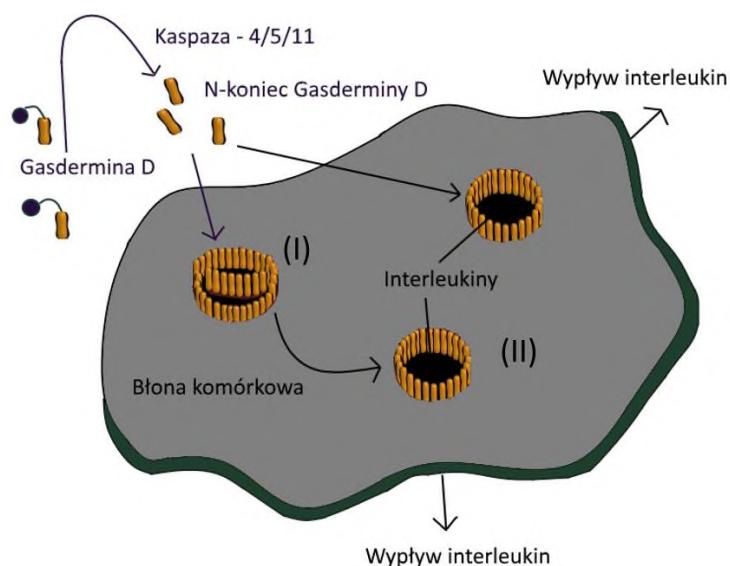


Rycina 3. Schemat procesu pyroptozy z uwzględnieniem szlaków kanonicznego i niekanonicznego [80].

Gazderminy należą do rodziny białek, które są zdolne do tworzenia porów w błonie komórkowej w czasie pyroptozy. Rodzina ta składa się z gazderminy: A, B, C, D, E i DFNB59 charakteryzującej się homologią na poziomie 45%. Białka te składają się z dwóch domen: domeny C-końcowej (SID) i N-końcowej (PFD), które wykazują się konserwatywnością w obrębie rodziny w przeciwieństwie do niekonserwatywnej domeny środkowej [81]. Domena C-końcowa o strukturze α -helikalnej odpowiada za kontrolę i hamowanie domeny N-końcowej. Natomiast N-koniec charakteryzuje się cytotoksycznością związaną z tworzeniem porów w błonie komórkowej, a tym samym jej permeabilizacją. Za ten stan rzeczy odpowiada budowa domeny N-końcowej, czyli struktura β -harmonijki odpowiedzialna za tworzenie części transmembranowej porów, natomiast jej część α -helisy odpowiada za przyłączenie się do części hydrofilowej lipidów błonowych [82].

Jednym z najsilniejszych związków aktywujących proces pyroptozy na drodze niekanonicznej za pomocą GADMD jest lipopolisacharyd bakteryjny [83–85], który jest transportowany na drodze endocytozy ze środowiska zewnątrzkomórkowego do wnętrza komórki przez pęcherzyki OMV. Następnie za pomocą białka GBP dochodzi do uwolnienia LPS-u z pęcherzyków do cytozolu. Pęcherzyki OMV utworzone są z zewnętrznej błony bakterii. W skład OMV wchodzi również PAMP, LPS, lipoproteiny, peptydoglikan, RNA

i DNA, które indukują sygnały zależne od receptorów PRR [85]. W cytozolu LPS aktywuje kaspazę-4 i -5 [84–86] i dochodzi do aktywacji białka gazderminy D poprzez jej rozszczepienie na C- i N-koniec [87], który wiąże się z lipidami tj. fosforanami fosfatydyloinozytolu i fosfatydyloseryną w błonie komórkowej [84,88,89]. N-koniec GSDMD oligomeryzuje i tworzy w błonie komórkowej pory o wielkości około 12 nm o kształtach szczelinowym, łukowym lub pierścieniowym. Pory szczelinowe i łukowe przechodzą na końcu w pierścieniowe (Ryc. 4).



Rycina 4. Schemat tworzenia się porów w błonie komórkowej. N-koniec wiąże się z lipidami w błonie komórkowej, ulegając oligomeryzacji i tworząc pory o wielkości ok 12 nm w kształcie szczelinowym (I), łukowym (I) lub pierścieniowym (II). Pory szczelinowe i łukowe przechodzą później w pierścieniowe (II). (Kuc-Ciepluch et al., 2021).

Składniki tworzące pory tj. lipidy oraz gazdermina, mogą być uwolnione na zewnątrz komórki [87], co w konsekwencji zwiększa przepuszczalność błony komórkowej i prowadzi do wypływu cytokin zapalnych jak IL-1 β i IL-18 [75]. N-koniec gazderminy D może wykazywać również powinowactwo do kardiolipiny i fosfatydyloseryny w zewnętrznej błonie komórkowej bakterii i prowadzić w ten sposób do zwiększenia jej przepuszczalności [81,90]. Uwalnianie interleukin poprzez pory gazderminowe jest możliwe dzięki ich rozmiarom jak 4,5 nm dla IL-1 β i 5 nm dla IL-18 [88].

Gazdermina D odpowiedzialna jest więc za uwalnianie cytokin zapalnych podczas indukcji pyroptozy, co prowadzi do aktywacji odpowiedzi immunologicznej przy jednoczesnej indukcji śmierci komórki poprzez zaburzenie gradientu jonowego będącego przyczyną obrzęku i lizy osmotycznej [78].

4. Cel pracy

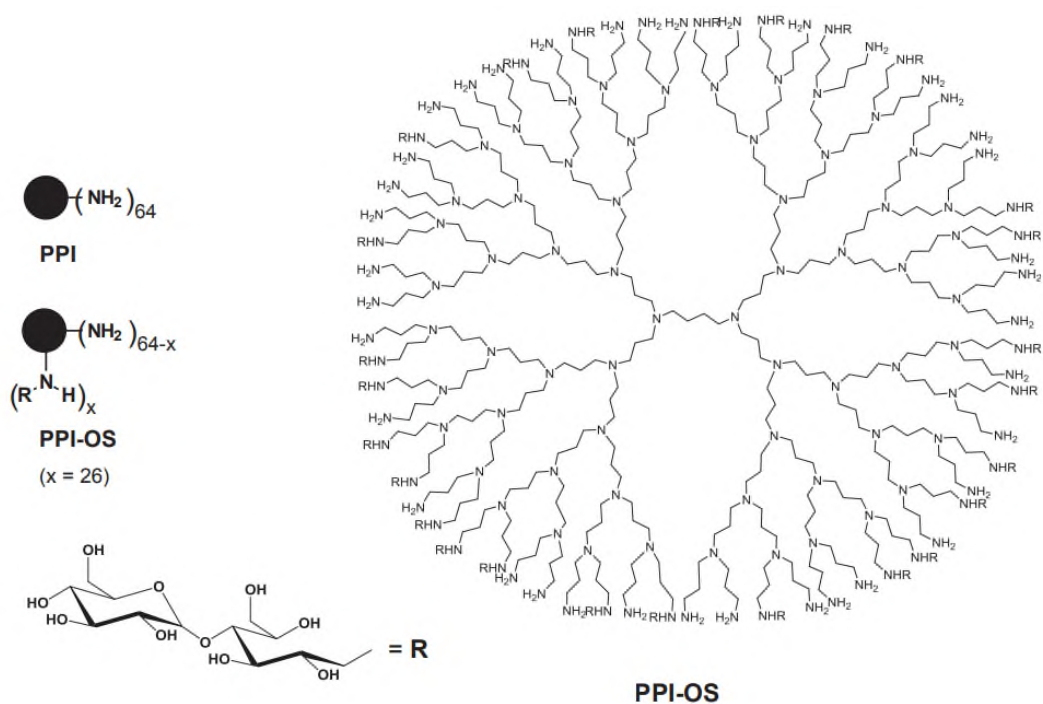
Celem pracy jest ocena nowych metod permeabilizacji zewnętrznej błony komórkowej bakterii Gram-ujemnych, wspomagających działanie bakteriofagowej rekombinowanej endolizyny fagowej. Powyższy cel ogólny realizowano w ramach celów szczegółowych odpowiadających strategiom permeabilizacji tj.

- zastosowanie dendrymerów polikationowych jako egzogennych czynników permeabilizujących błonę komórkową mutantów szorstkich i gładkich *P. aeruginosa* PAO1;
- indukcja pyroptozy przez dendrytyczne nanocząstki złota w obecności bakteryjnego lipopolisacharydu;
- aktywacja pyroptozy przez bakteryjny lipopolisacharyd jako endogenne mechanizm wspomagający permeabilizację zewnętrznej błony bakteryjnej dla rekombinowanej endolizyny faga KP27.

5. Materiały i metody

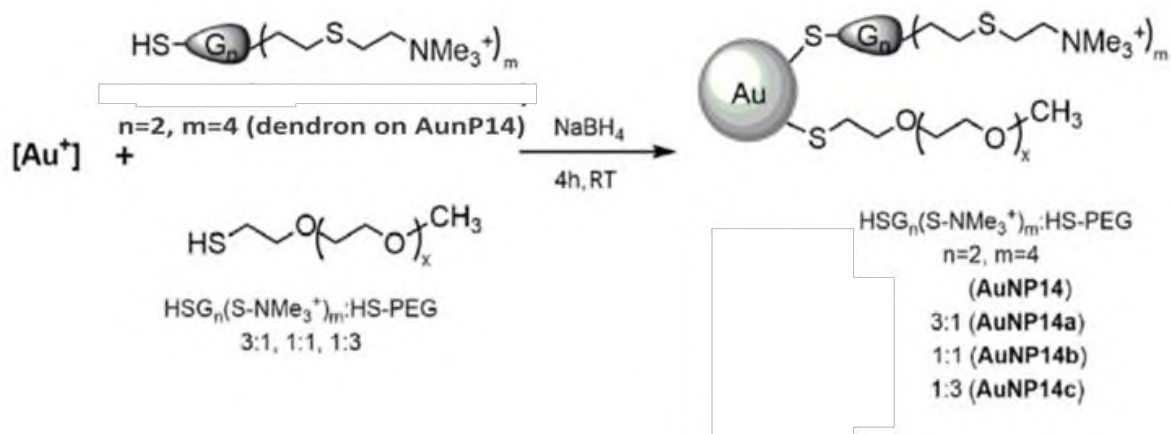
5.1 Materiały

W niniejszej pracy wykorzystano dendrymery poli(propylenoiminowe) modyfikowane maltozą tj. glikodendrymery (Ryc. 5) w ramach współpracy z prof. Dietmar Appelhans z Leibniz Institute of Polymer Research Drezno, Niemcy.



Rycina 5. Struktura dendrymerów użytych w badaniu. Rodzicielski dendrymer poli(propylenoiminy) czwartej generacji (PPI) z końcowymi grupami aminowymi i PPI glikodendrymer modyfikowany maltozą (PPI-OS), co oznacza około 20% przyłączenia maltozy do dendrymeru PPI czwartej generacji PPI-OS [91].

PEGyłowane dendrytyczne nanocząstki złota (AuNP) zostały zmodyfikowane poprzez przyłączenie do ich powierzchni kationowych dendronów karbokrzemowych dwóch różnych generacji (Ryc. 6) uzyskane w ramach współpracy z prof. Sanchez-Nieves z Química Orgánica y Química Inorgánica, University of Alcalá, Alcalá de Henares w Madrycie [92,93].



Rycina 6. Schemat struktury dendrytycznych AuNP i ich analogów modyfikowanych powierzchniowo za pomocą PEG-u. Porównano trzy stosunki dendron:PEG (3:1, 1:1, 1:3) [94].

Rekombinowaną endolizynę faga KP27 uzyskano w ramach współpracy z zespołem prof. dr hab. Zuzannych Drulis-Kawy z Zakładu Biologii Patogenów i Immunologii, Instytut Genetyki i Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego.

Szczep bakteryjny *P. aeruginosa* PAO1 (ATCC 15692) pochodził z kolekcji Zakładu Biologii Medycznej Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach. Mutanty Δ rmd, Δ waaL, Δ wbpL uzyskano dzięki uprzejmości prof. Andrew M. Kropińskiego z Laboratory of Foodborne Zoonoses, Guelph, ON, Kanada. Mutant Δ rmd charakteryzuje się brakiem D-ramnozy oraz pasma A w strukturze LPS, LPS mutantu Δ waaL jest pozbawiony pasma A i B i jest częściowo szorstki (SR-LPS lub rdzeń z jednym powtórzeniem antygeny-O), mutant Δ wbpL charakteryzuje się brakiem glukozylotransferazy Wbpl niezbędnej do inicjacji syntezy pasm A i B w strukturze LPS [91].

LPS-y *P. aeruginosa* PAO1 oraz wyizolowane ze szczepów klinicznych od pacjentów z mukowiscydozą (CF532, CF832, CF217) oraz z rany oparzeniowej (non-CF0038) uzyskano w ramach współpracy z zespołem prof. dr hab. Zuzannych Drulis-Kawy z Zakładu Biologii Patogenów i Immunologii, Instytut Genetyki i Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego. LPS CF217 nie zawiera antygeny O (polisacharydy O-specyficzne) w strukturze (forma szorstka, R), w przeciwieństwie do PAO1, non-CF0038, CF532 i CF832 składających się z antygeny O, oligosacharydów pełnego rdzenia i lipidu A (forma gładka, S).

LPS *P. aeruginosa* O10 (L8643) i *E. coli* 0111:B4 (L2630), 055:B5 (L2637) pochodziły z firmy Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.

Do badań użyto sześć różnych linii komórkowych: A549 (ATCC®, Manassas, Virginia, CCL-185™), BEAS-2B (ATCC®, Manassas, Virginia, CRL-9609™), HeLa (ATCC®, Manassas, Virginia, CCL-2™), THP-1 (ATCC®; Manassas, Virginia, TIB-202™), THP1-Xblue (Invivogen, Tuluza, Francja, thpx-sp) i THP1-Null2 (Invivogen, Tuluza, Francja, thp-nullz). Komórki A549 hodowano w pożywce F-12K Nutrient Mixture (Kaighn's Mod.) z L-glutaminą (Corning, Nowy Jork, USA), komórki BEAS-2B w pożywce LHC-9 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), komórki HeLa w pożywce RPMI 1640 z L-glutaminą i NaHCO₃ (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), natomiast komórki THP-1, THP1-Xblue i THP1-Null2 hodowano w zmodyfikowanym podłożu RPMI 1640 ATTC (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Ludzkie komórki monocytarne THP-1 są najczęściej używaną modelową linią komórkową do badania aktywacji inflamasyonu. Podłoża hodowlane wszystkich linii komórkowych uzupełniono 10 % inaktywowaną termicznie płodową surowicą bydlęcą (FBS; Biowest, Nuaille, Francja) i prowadzoną ją w 37°C i 5% CO₂.

Rekombinowane białka tj. GSDMD pochodziła z Origene, Rockville, USA (NM_024736), natomiast kaspaza-4 z BioVision, Milpitas, USA (BV-1084-25).

5.2. Metody

5.2.1. Dichroizm kołowy

Widma dichroizmu kołowego (CD) mierzono w obszarze dalekiego UV za pomocą spektrometru J-815CD (Jasco, Japonia). Doświadczenia przeprowadzono w 10 mM buforze fosforanu sodu (pH 7,4) przy stężeniu endolizyny KP27 0,5 μM. Widma CD samego białka i w obecności dendrymerów uzyskano w zakresie od 260 do 195 nm. Zmiany średniej eliptyczności molowej (θ/θ_0) w charakterystycznym minimum przy 220 nm mierzono w zakresie temperatur od 20 do 80°C, gdzie θ_0 jest średnią eliptycznością w 20°C. Do oznaczeń użyto kuwetę kwarcową o długości drogi optycznej 0,5 cm (Hellma, Niemcy). Eliptyczność molową θ wyrażono jako cm² dmol⁻¹. Widma CD wykonano dla czystego białka i po dodaniu dendrymerów w stosunku molowym 1:4 (białko:dendrymer).

5.2.2. Aktywność enzymatyczna endolizyny w obecności dendrymerów PPI

Aktywność enzymatyczną endolizyny badano przez pomiar degradacji peptydoglikanu (PG) wyizolowanego z *E. coli* ATCC 8739. Szybkość degradacji oceniano spektrofotometrycznie w obecności dendrymerów: PPI i PPI-OS. Endolizynę (10 μ M) inkubowano wstępnie z każdym z dendrymerów w stosunku 1:1 i 1:4 M (białko:dendrymery) przez 15 min. i następnie skany rejestrowano w zakresie temperatur 20°C - 37°C. Następnie do próbki dodano 0,25 mg/ml PG i mierzono jego degradację przy 560 nm za pomocą czytnika mikroplątek TECAN Infinite 200 PRO (Tecan Group Ltd., Szwajcaria).

5.2.3. Aktywność przeciwbakteryjna glikodendrymerów w obecności endolizyny

Aktywność przeciwbakteryjną glikodendrymerów i endolizyny KP27 zmierzono metodą spektrometryczną przy długości fali 600 nm z zastosowaniem czytnika mikroplątek TECAN Infinite 200 PRO (Tecan Group Ltd., Szwajcaria). Przeciwbakteryjne właściwości endolizyny KP27 (12 μ M), dendrymerów (50 μ M) oraz endolizyny w obecności dendrymerów wyrażono jako procent wzrostu *P. aeruginosa* w porównaniu do nietraktowanej związkami kontroli.

5.2.4. Permeabilizacja zewnętrznej błony bakteryjnej przez gazderminę D

W pierwszym etapie przeprowadzono permeabilizację błony komórkowej szczepu *P. aeruginosa* PAO1 i jego mutantu Δ wbpL z użyciem białka gazderminy D (GSDMD) lub jej N-końca GSDMD otrzymanego po inkubacji z 0,1 U kaspazy-4. Następnie oceniono efekt permeabilizacji na aktywność bójczą endolizyny KP27 (36 μ g/ml) metodą wychwytu barwnika fluorescencyjnego N-fenilo-1-naftyloaminy (NPN). Bakterie hodowano w temperaturze 37°C do uzyskania gęstości optycznej przy OD₆₀₀ wynoszącej 0,5. Osad bakteryjny rozpuszczono w buforze HEPES (odpowiednio 1 ml buforu na 0,5 ml bakterii przed wirowaniem) do uzyskania OD₆₀₀ = 0,1. Pomiar przeprowadzono w sterylnej 96-dołkowej płytce. Barwnik fluorescencyjny NPN dodano do zawiesiny bakteryjnej na płytce (10 μ M na studzienkę). Następnie do mieszaniny dodano odpowiednie stężenia GSDMD i endolizyny. Po 30 minutach intensywność fluorescencji NPN mierzono przy długości fali wzbudzenia 350 nm i długości fali emisji 420 nm za pomocą czytnika mikroplątek TECAN Infinite 200 PRO (Tecan Group Ltd., Szwajcaria). Fluorescencja NPN wzrasta wraz ze

zmianą otoczenia tzn. wzrost fluorescencji jest widoczny podczas akumulacji NPN w warstwie hydrofobowej błony, co świadczy o jej dezintegralności. Doświadczenie przeprowadzono w trzech niezależnych powtórzeniach.

5.2.5. Mikromacierze ekspresyjne

Całkowity RNA wyizolowano z hodowli komórek A549 i HeLa za pomocą zestawów do izolacji: Sv Total system RNA Isolation (Promega, Madison, USA) i Rneasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Niemcy) oraz z komórek THP1-Xblue za pomocą TRI REAGENT (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Doświadczenie przeprowadzono w trzech niezależnych powtórzeniach zgodnie z protokołem producenta. Jakość i ilość RNA sprawdzono spektrofotometrycznie z użyciem aparatu Nanodrop (ThermoScientific, USA) i współczynnika integralności RNA (Bioanalyzer, Agilent, St. Clara, USA). Analiza ekspresji genów oparta na dwukolorowej mikromacierzy (Agilent, St. Clara, USA) została wykorzystana do analizy ekspresji genów w komórkach A549, HeLa i THP1-Xblue traktowanych 0,1 µg/ml *P. aeruginosa* O10 LPS w porównaniu do nietraktowanej kontroli, zgodnie z instrukcją producenta (poniżej).

W pierwszym kroku przygotowano rozcieńczenia 1:4 Spike -A i -B, które wyznakowano znacznikiem fluorescencyjnym: Spike-A wyznakowano za pomocą Cyanine 3, a próbki ze Spike B wyznakowano używając znacznika Cyanine 5. Tak przygotowane Spike użyto następnie do reakcji znakowania RNA. W tym celu dodano do 50 ng całkowitego RNA wyizolowanego z hodowli komórkowych A549, HeLa i THP1-Xblue, 2 µl Spike A z cyanine 3 do próbek kontrolnych nie traktowanych i Spike B z cyanine 5 do próbek badanych po traktowaniu 100 ng/ml LPS O10 *P. aeruginosa*.

W kolejnym kroku przeprowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji. Do każdej próbki z RNA dodano 1,8 µl roztworu T7 Primer Mix (warunki reakcji: 10 min., 65°C, 5 minut na lodzie). Następnie przygotowano po 4,7 µl mieszaniny cDNA Master Mix na próbkę (2 µl 5× First Strand Buffer po podgrzaniu do 80°C przez 3-4 minuty, 1 µl 0.1 M DTT, 0,5 µl 10 nM dNTP i 1,2 µl Affinity Script RNase Block Mix (warunki reakcji: 2 godziny w temperaturze 40°C, 15 minut w 70°C, 5 minut na lodzie). Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono w dwóch osobnych mieszaninach Transcription Master Mixes, jedną z Cyanine 3-CTP i drugą z Cyanine 5-CTP, w oddzielnych probówkach (składniki mieszaniny na jedną próbkę: 0,75 µl wody, 3,2 µl 5×Transcription Buffer, 0,6 µl 0,1 M DTT, 1 µl NTP Mix, 0,21 µl T7 RNA

Polymerase Blend i 0,24 μl Cyanine 3-CTP lub Cyanine 5-CTP). Dodano po 6 μl mieszaniny Transcription Master Mix z Cyanine 3-CTP do próbki zawierającej Spike A i z Cyanine 5-CTP do próbki zawierającej Spike B (warunki reakcji: 2 godziny w temp. 40°C).

Następnie przeprowadzono reakcję oczyszczania wyznakowanego cRNA za pomocą zestawu RNeasy Mini Kit, Qiagen nr kat. 74104 lub 74106. Do każdej z próbek dodano 84 μl wody wolnej od nukleaz do próbki cRNA, 350 μl buforu RLT, 250 μl etanolu, przeniesiono 700 μl próbki cRNA na kolumnę RNeasy Mini Spin. Wirowano przy ustawieniach 4°C/30 sekund/13 tys obrotów/min. Przeniesiono kolumnę RNeasy do nowej próbki zbiorczej i dodano 500 μl buforu RPE (zawierającego etanol) do kolumny. Zwirowano i wylano przesącz. Dodano kolejne 500 μl buforu RPE na kolumnę. Wirowano przy ustawieniach 4°C/60 sekund/13 tys obrotów/min. Wylano przesącz po czym przeniesiono na kolumnę RNeasy do nowej próbki. Dodano 30 μl wody wolnej od RNaz bezpośrednio na membranę filtra RNeasy. Po 60 sekundach zwirowano przy ustawieniach 4°C/30 sekund/13 tys obrotów/min. Odrzucono kolumnę i przeniesiono zebrany przesącz oczyszczonego cRNA na lód.

Po oczyszczeniu oznaczono spektrofotometrycznie ilość otrzymanego cRNA za pomocą urządzenia NanoDrop. Zmierzono stężenie barwnika Cyanine 3 lub Cyanine 5 (pmol/ μl), wskaźnik absorbancji RNA (260 nm / 280 nm) i stężenie cRNA (ng/ μl). Następnie obliczono wydajność i aktywność właściwą w następujący sposób:

- ilość cRNA - $\text{stężenie cRNA (ng/\mu l)} \times 30 \mu\text{l (objętość próbki)}/1000 = \mu\text{g cRNA}$;
- właściwa aktywność - $\text{stężenie Cy3 lub Cy5 / stężenie cRNA} \times 1000 = \text{pmol Cy3 lub Cy5 na } \mu\text{g cRNA}$.

Kolejnym etapem była hybrydyzacja. Do próbki zawierającej liofilizowany 10 \times Gene Expression Blocking Agent dodano 500 μl wody wolnej od nukleaz. Przygotowano próbki cRNA do hybrydyzacji przez podgrzanie do temperatury 60°C (skład mieszaniny reakcyjnej: 300 ng próbki z cRNA z Cyt-3 lub Cyt-5, 11 μl 10 \times Gene Expression Blocking Agent, 2,2 μl 25 \times Fragmentation Buffer i wody wolnej od nukleaz do końcowej objętości 24 μl), (warunki reakcji: 30 min. w 60°C, 1 min. na lodzie). Następnie dodano 25 μl 2 \times Hi-RPM Hybridization Buffer, zwirowano przy ustawieniach 21°C/60 sekund/13 tys obrotów/min i umieszczono na lodzie po czym nałożono na szkiełko w objętości równej 40 μl . Proces hybrydyzacji przeprowadzono w piecu do hybrydyzacji w temperaturze 65°C przez 17 godzin z szybkością 10 obrotów na minutę.

Ostatnim etapem było płukanie płytek mikromacierzy za pomocą buforów Gene Expression Wash. Gene Expression Wash Buffer 2 ogrzewano do 37°C. Do każdego z buforów dodano 2 ml Triton X-102 bezpośrednio przez użyciem. Próbki analizowano za pomocą skanera Agilent Microarray Scanner (Agilent Technologies, USA).

Ekspresję RNA mierzono za pomocą chipów DNA o numerach Agilent: US11233913_257236328396_S02_GE2_1010_SEP10, US11233913_257236328397_S02_GE2_1010_SEP10, US11233913_257236328398_S01_GE2_1010_SEP10, które zawierał sondy dla około 56 000 ludzkich genów wraz z długim niekodującym RNA (lncRNA). Doświadczenie powtórzono trzykrotnie jako powtórzenia biologiczne. Analizę danych z mikromacierzy przeprowadzono za pomocą oprogramowania GeneSpring GX.

5.2.6. Ilościowy PCR z odwrotną transkrypcją (RT-qPCR)

RNA wyizolowano i scharakteryzowano ilościowo i jakościowo według opisu w podrozdziale 5.2.5. Odwrotną transkrypcję przeprowadzono za pomocą Reverse Transcription System (Promega, Madison, USA) zgodnie z protokołem producenta z losowymi starterami heksamerowymi. Z każdej próbki pobrano do qPCR 1 µl roztworu cDNA do końcowej objętości 20 µl mieszaniny reakcyjnej zawierającej: 10 µl 2× SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, USA), 1 µl PrimePCR™ SYBR® Green Assay: GSDMD (Bio-Rad, Hercules, USA), 1 µl PrimePCR™ SYBR® Green Assay: ACTB (β-aktyna) (Bio-Rad, Hercules, USA)) lub 1 µl PrimePCR™ SYBR® Green Assay: NLRP3 (Unique Assay ID: qHsaCID0036694, Bio Rad) i 8 µl dH₂O. Zastosowano następujące warunki amplifikacji: 95°C przez 2 min. przez 1 cykl, 95°C przez 5 s i 60°C przez 30 s przez 40 cykli za pomocą aparatury Eco Real-Time PCR (Illumina, San Diego, USA). Doświadczenie przeprowadzono w trzech niezależnych powtórzeniach. Gen *ACTB* zastosowano jako wewnętrzny gen referencyjny, a metodę $\Delta\Delta CT$ zastosowano do względnej oceny ilościowej.

5.2.7. Ocena atywności kaspaz -1 i -4

Komórki THP-1 o gęstości 10⁶ komórek/dolek traktowano dendrytycznymi AuNP i/lub LPS *P. aeruginosa* O10 i *E. coli* 055:B5 o stężeniu 10 µg/ml przez 24 godziny, przemyto i poddano lizie w buforze RIPA. Aktywność lizatów (100 µl) do rozszczepienia fluorescencyjnego substratu kaspazy-1 (YVAD-AFC; Tyr-Val-Ala-Asp-7-amino 4-

trifluorometylokumaryna; nr kat. ab39412, Abcam, Cambridge, MA) lub fluorescencyjnego substratu kaspazy-4 (LEVD-AFC, Leu-Glu-Val-Asp-7- amino-4-trifluormetylokumaryna; nr kat. 65658, Abcam), oznaczano zgodnie z protokołem opisanym przez producenta. Aktywności normalizowano do niestymulowanej kontroli. Aktywność kaspazy-1 była oceniana po traktowaniu dendrytycznymi AuNP i/lub LPS-em przez 24 godziny, a aktywność kaspazy-4 oceniano po traktowaniu przez 4 godziny i 24 godziny. Nie zaobserwowano efektu natywnych roztworów nanocząstek i używanych barwników na pomiary fluorescencyjne.

5.2.8 Test ELISA

Komórki linii A549, BEAS-2B, HeLa, THP-1, THP1-Xblue lub THP1-Null2 o gęstości 10^6 na studzienkę inkubowano z LPS *P. aeruginosa*/*E. coli* w zakresie stężeń 0,001-100 $\mu\text{g/ml}$ oraz 10 μM nigerycyny dla THP1-Null2. Pożywkę zebrano po 24 godzinach dla komórek THP-1, THP1-Xblue i THP1-Null2 oraz po 48 godzinach dla komórek HeLa, BEAS-2B i A549. Supernatant użyto do testu ELISA zgodnie z protokołem producenta (Human IL-1 beta ELISA Kit, Abcam, ab 100562 oraz Human IL-18 ELISA Kit, Abcam, ab215539). Stężenie IL-1 β w supernatancie obliczono zgodnie z krzywymi standardowymi. Wyniki ilości IL-1 β przedstawiono w $\mu\text{g/ml}$ supernatantu. Doświadczenie przeprowadzono w trzech niezależnych powtórzeniach.

5.2.9 Western blot

Komórki THP-1 inkubowano z LPS-em *P. aeruginosa* O10 i *E. coli* 055:B5 w stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$ i/lub z dendrytycznymi AuNP przez 24 godziny i przeprowadzono lizę białka w buforze RIPA. Komórki HeLa, BEAS-2B i A549 inkubowano z LPS-em *P. aeruginosa* O10 w zakresie stężeń 0,001 $\mu\text{g/ml}$ – 100 $\mu\text{g/ml}$, po 48 godzinnej inkubacji zebrano płyn pochodzący i przeprowadzono lizę białka w buforze RIPA. Komórki THP1-Null2 inkubowano z 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ lub 100 $\mu\text{g/ml}$ *E. coli* 0111:B4 LPS przez 3 godziny i inkubowano z nigerycyną w stężeniu 10 μM przez 24 godziny; zebrano również supernatanty po hodowli komórkowej i przeprowadzono izolację białka w buforze RIPA. Badania zostały wykonane w oparciu o procedurę firmy InvivoGen dla komórek THP1-Null2. W drugiej części badania komórki THP1-Null2 preinkubowano z 1 $\mu\text{g/ml}$ *P. aeruginosa* O10, PAO1, CF532, CF832, CF217, non-CF0038 oraz inkubowano z nigerycyną w stężeniu 10 μM przez 24 godziny. Zebrano supernatanty i przeprowadzono izolację białka w buforze RIPA. Zebrane supernatanty po hodowlach komórkowych i lizaty białkowe analizowano metodą Western

blot zgodnie z protokołem i z wykorzystaniem odczynników firmy Bio-Rad (Hercules, USA). Około 20 µl supernatantu i 20 µl buforu do próbek białka Laemmil nałożono na żel Mini-PROTEAN® TGX™ 4-20% SDS-PAGE do elektroforezy, a następnie przeprowadzono elektrotransfer do nitrocelulozy. Błony blokowano w 3% BSA (albumina surowicy bydlęcej) w TBST (buforowany TRIS z Tween 20), a następnie inkubowano przez noc z I-rzędowymi przeciwciałami: anty-GSDMD (rozcieńczenie 1:1500, Abcam, Cambridge, Wielka Brytania; ab155233), GSDMDC1 (rozcieńczenie 1:500, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA; sc-81868), anty-GAPDH (rozcieńczenie 1:1500 w TBST; Abcam, Cambridge, Wielka Brytania; ab8245 i ab9485) w 4°C. Po przemyciu TBST błony inkubowano z II-rzędowymi przeciwciałami z HRP (peroksydaza chrzanowa) (rozcieńczenie 1:3000; Abcam, Cambridge, Wielka Brytania; ab6721) i RBTXMS IGG (H+L) HR (rozcieńczenie 1:200; Life Technologies, Carlsbad, USA; 31450) przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Białka wykrywano za pomocą chemiluminescencji. GAPDH zastosowano jako białko kontrolne do normalizacji białka docelowego. Jako kontrolę pozytywną zastosowano 0,75 µM rekombinowanego białka GSDMD (Origene, Rockville, USA; NM_024736).

5.2.10. Ocena właściwości przeciwbakteryjnych

Aktywność przeciwbakteryjna supernatantów po hodowli linii komórkowej THP1-Null2 zawierających oligomery GSDMD po potraktowaniu 1 µg/ml LPS-em *P. aeruginosa* (PAO1, CF532, CF832, CF217, CF708, non-CF0038) i *E. coli* 0111:B4, 36 µg/ml endolizyny i 10 µM nigerycyny testowano spektrofotometrycznie przy 600 nm wobec szczepów *P. aeruginosa* PAO1 i ΔwbpL. Skład mieszaniny reakcyjnej: 50 µl zawiesiny bakterii (10⁴), 50 µl pożywki hodowlanej, 9 µl 0,6 mg/ml endolizyny oraz odpowiednia ilość buforu TBS do końcowej objętości 150 µl.

5.2.11. Analiza statystyczna wyników

Do statystycznej analizy danych z badań RT-qPCR, ELISA i oceny właściwości przeciwbakteryjnych wykorzystano program STATISTICA wersja 13.3 (StatSoft, Polska). Dane przeanalizowano za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem post-hoc Dunnetta. Wyniki przedstawiono jako średnią ± odchylenie standardowe (SD). Poziom istotności przyjęto dla p<0,05 (*).

Analizy statystyczne wyników testu mikromacierzy obliczono za pomocą oprogramowania do ekspresji genów GeneSpring GX (Agilent, St. Clara, USA). Dane zinterpretowano porównując z grupą kontrolną za pomocą testu t z poprawką FDR Benjamina-Hochberga i poziomem istotności dla $p < 0,05$. Ontologię genów analizowano w oparciu o Quick GO i analizę szlaków w oparciu o bazy danych Reactome z FDR Benjamina-Hochberga (False Discovery Rate) i $p < 0,05$, a do ustalenia istotnie zmienionej funkcji molekularnej i procesu biologicznego wykorzystano bazę danych Panther.

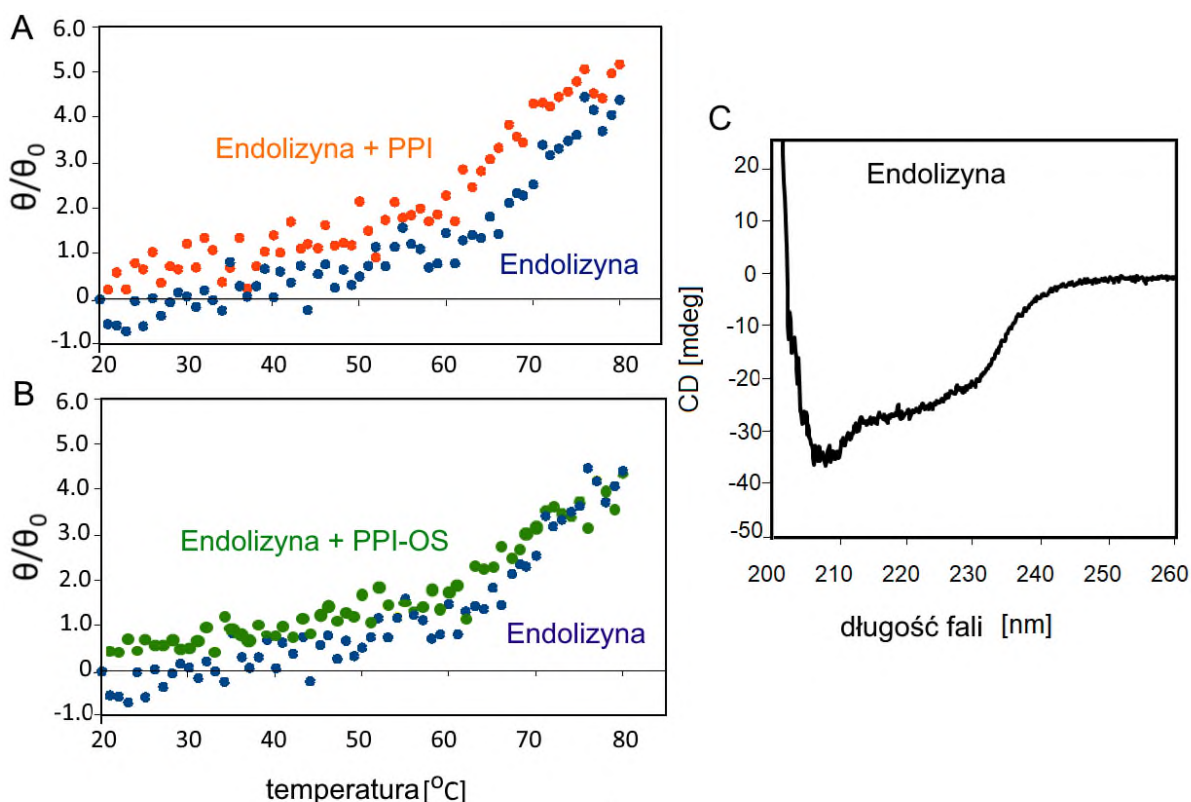
6. Wyniki

Wyniki badań mające na celu weryfikację strategii permeabilizacji zewnętrznej błony komórkowej bakterii Gram-ujemnych dla działania bójczego endolizyny zestawiono w dwóch podrozdziałach. Podrozdział 6.1. dotyczy zastosowania dendrymerów polikationowych jako egzogenego czynnika permeabilizującego błonę komórkową mutantów szorstkich i gładkich *P. aeruginosa* PAO1. W rozdziale 6.2. przedstawiono indukcję pyroptozy przez dendrytyczne nanocząstki złota oraz LPS-y jako endogeny mechanizm wspomagający permeabilizację zewnętrznej błony bakteryjnej dla rekombinowanej endolizyny faga KP27.

6.1. Zastosowanie dendrymerów polikationowych jako egzogenych czynników permeabilizujących zewnętrzną błonę komórkową

6.1.1. Ocena oddziaływania endolizyny z dendrymerami polikationowymi zmierzona metodą dichroizmu kołowego

W pierwszym etapie badań oceniono oddziaływanie dendrymerów PPI modyfikowanych maltozą PPI-OS (20% powierzchni związane z maltozą) oraz niemodyfikowanych PPI z endolizyną oraz efekt tych oddziaływań na strukturę drugorzędową białka. Analiza widm dichroizmu kołowego CD wykazała wzrost molowej eliptyczności dla endolizyny po podgrzaniu do 50°C dla obu dendrymerów. W obecności dendrymerów PPI zaobserwowano wcześniejszy wzrost molowej eliptyczności endolizyny po podgrzaniu do 40°C w porównaniu do PPI-OS. Natomiast dendrymery PPI-OS nie wpłynęły na stabilność endolizyny KP27 (Ryc. 7). Różnice w oddziaływaniu dendrymerów PPI i PPI-OS z endolizyną wynikają z nierównej ilości dodatnio naładowanych grup aminowych obecnych na powierzchni makrocząsteczki. Dendrymery PPI posiadają więcej grup kationowych, podczas gdy powierzchnia PPI-OS jest częściowo neutralizowana przez maltozę.



Rycina 7. Zmiany średniej eliptyczności resztkowej (θ/θ_0) endolizyny KP27 przy 220 nm w funkcji temperatury w obecności PPI (A) lub PPI-OS (B). (C) widmo CD endolizyny.

6.1.2. Ocena spektrofotometryczna degradacji peptydoglikanu przez endolizynę w obecności dendrymerów polikationowych

Aktywność enzymatyczną endolizyny w obecności dendrymerów mierzono przez degradację peptydoglikanu (PG) w różnych warunkach temperaturowych i przy różnych stosunkach molowych białko:dendrymer (1:1 i 1:4) (Tab. 1). Największą aktywność endolizyny obserwowano w temperaturze 37°C z całkowitą degradacją PG (0,25 mg/ml) po 10-15 min. inkubacji. Endolizyna była nieaktywna w temperaturze 20°C niezależnie od obecności obu z testowanych dendrymerów. Po podgrzaniu do temperatury wyższej niż 26°C aktywność natywnej endolizyny wzrosła do 100% i zaobserwowano degradację PG. Aktywność endolizyny w obecności dendrymerów PPI i PPI-OS była mniejsza, ale wzrosła do 100% w temperaturze 37°C niezależnie od obecności dendrymerów. Oba badane

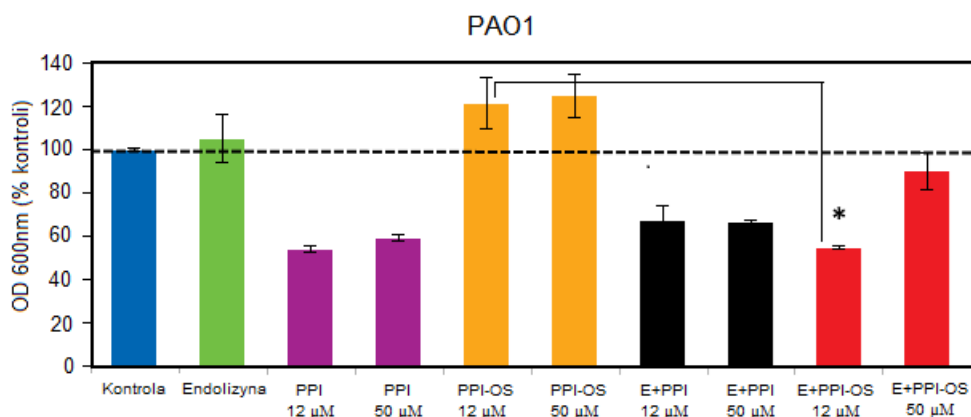
dendrymery silniej hamują aktywność endolizyny w stosunku molowym 1:1 w porównaniu do 1:4.

Tabela 1. Aktywność endolizyny (% degradacja PG) w obecności dendrymerów PPI lub PPI-OS przy różnym stosunku molowym białka do dendrymerów w funkcji temperatury po 15 min. inkubacji.

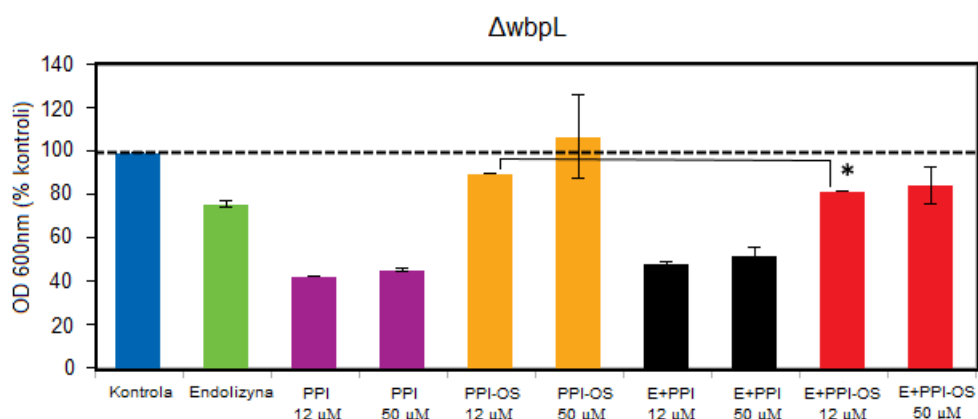
Temperatura [°C]	Endolizyna	Endolizyna+ PPI (1:1)	Endolizyna+ PPI (1:4)	Endolizyna+ PPI-OS (1:1)	Endolizyna+ PPI-OS (1:4)
20	0	0	0	0	0
26	100	25	60	8	45
32	100	38	90	10	40
37	100	100	100	100	100

6.1.3. Ocena aktywności bójczej endolizyny w obecności dendrymerów polikationowych

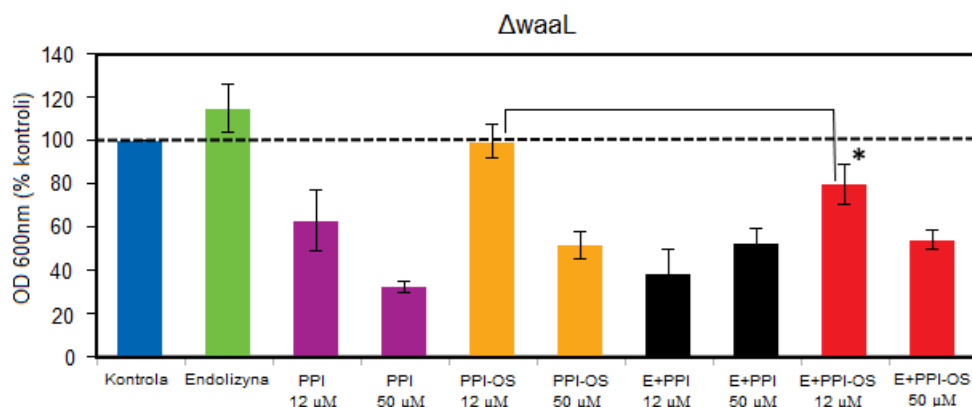
Następnie zmierzono właściwości bójcze endolizyny w obecności dendrymerów PPI lub PPI-OS na *P. aeruginosa* PAO1 typu dzikiego i trzy różne mutanty szorstkie, wyrażone zmianą gęstości hodowli bakteryjnej przy 600 nm po 24 godzinnej hodowli w 37°C (Ryc. 8, 9, 10 i 11). Zaobserwowano efekt bójczy PPI w przeciwieństwie do endolizyny lub PPI-OS wobec analizowanych szczepów. Obecność endolizyny nie zwiększała efektu bójczego dendrymerów PPI. Dendrymery modyfikowane maltozą PPI-OS hamowały wzrost tylko mutantu $\Delta waaL$ (Ryc. 10) w stężeniu 50 μM . Efekt addytywny dendrymerów PPI-OS i endolizyny na hamowanie wzrostu bakterii zaobserwowano dla szczepu dzikiego PAO1 (12 μM) (Ryc. 8) oraz mutantów $\Delta waaL$ (Ryc. 10) i $\Delta wbpL$ (Ryc. 9) ($p < 0,05$).



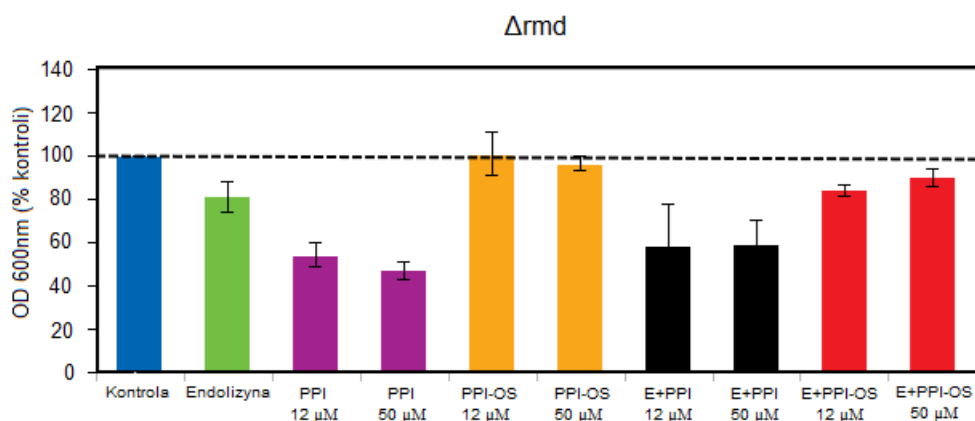
Rycina 8. Gęstość optyczna hodowli szczepu PAO1 *P. aeruginosa* typu dzikiego zmierzona przy 600 nm w obecności endolizyny (12 μM), dendrymerów PPI lub PPI-OS w stężeniach 12 μM i 50 μM i stosunku molowym (1:1; 1:4) po 24 godzinnej hodowli w 37°C. Wyniki wyrażono w procentach, gdzie 100% to nietraktowana hodowla bakteryjna. PPI (dendrymer polipropylenoiminowy), PPI-OS (dendrymer poli(propylenoiminowy) z 20% pokryciem powierzchni maltozą), E-PPI i E-PPI-OS (dendymery z endolizyną).



Rycina 9. Gęstość optyczna hodowli mutantna ΔwbpL *P. aeruginosa* zmierzona przy 600 nm w obecności endolizyny (12 μM), dendrymerów PPI lub PPI-OS w stężeniach 12 μM i 50 μM i stosunku molowym (1:1; 1:4) po 24 godzinnej hodowli w 37°C. Wyniki wyrażono w procentach, gdzie 100% to nietraktowana hodowla bakteryjna. PPI (dendrymer polipropylenoiminowy), PPI-OS (dendrymer poli(propylenoiminowy) z 20% pokryciem powierzchni maltozą), E-PPI i E-PPI-OS (dendymery z endolizyną).



Rycina 10. Gęstość optyczna hodowli mutantu $\Delta waaL$ *P. aeruginosa* zmierzona przy 600 nm w obecności endolizyny (12 μM), dendrymerów PPI lub PPI-OS w stężeniach 12 μM i 50 μM i stosunku molowym (1:1; 1:4) po 24 godzinnej hodowli w 37°C. Wyniki wyrażono w procentach, gdzie 100% to nietraktowana hodowla bakteryjna. PPI (dendrymer polipropylenoiminowy), PPI-OS (dendrymer poli(propylenoiminowy) z 20% pokryciem powierzchni maltozą), E-PPI i E-PPI-OS (dendrymery z endolizyną).

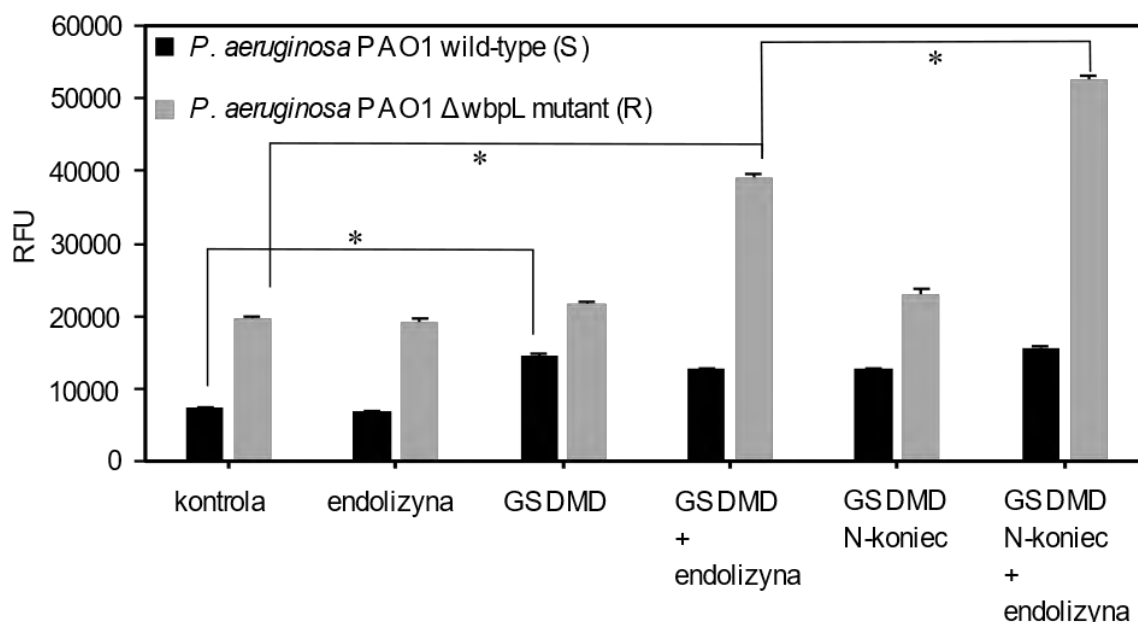


Rycina 11. Gęstość optyczna hodowli mutantu Δrmd *P. aeruginosa* zmierzona przy 600 nm w obecności endolizyny (12 μM), dendrymerów PPI lub PPI-OS w stężeniach 12 μM i 50 μM i stosunku molowym (1:1; 1:4) po 24 godzinnej hodowli w 37°C. Wyniki wyrażono w procentach, gdzie 100% to nietraktowana hodowla bakteryjna. PPI (dendrymer polipropylenoiminowy), PPI-OS (dendrymer poli(propylenoiminowy) z 20% pokryciem powierzchni maltozą), E-PPI i E-PPI-OS (dendrymery z endolizyną).

6.2. Indukcja pyroptozy przez dendrytyczne nanocząstki złota oraz LPS jako endogenne mechanizmy wspomagające permeabilizację zewnętrznej błony bakteryjnej

6.2.1. Oddziaływanie gazderminy D z zewnętrzną błoną bakterii i wpływ na aktywność enzymatyczną endolizyny

Aby ocenić możliwość wykorzystania stymulacji pyroptozy jako mechanizmu permeabilizacji zewnętrznej błony komórkowej dla endolizyny przez główne białko pyroptozy GSDMD, zbadaliśmy bezpośrednią przepuszczalność zewnętrznej błony bakteryjnej dwóch szczepów *P. aeruginosa* PAO1 i $\Delta wbpL$ (mutant R) przy użyciu rekombinowanego białka gazderminy D i jego N-końca (uzyskany po inkubacji z kaspazą-4) w połączeniu z endolizyną KP27 (Ryc. 12). Zastosowano barwnik fluorescencji 1-N-fenylalaninę, którego fluorescencja świadczy o związaniu z uszkodzoną błoną komórkową. Zaobserwowano słaby efekt wzrostu fluorescencji w przypadku GSDMD i N-końca GSDMD oraz brak efektu w przypadku samej endolizyny. W układzie GSDMD/endolizyna, a zwłaszcza GSDMD N-koniec/endolizyna zaobserwowano zwiększenie efektu permeabilizacji błony komórkowej bakterii, szczególnie wobec szczepu $\Delta wbpL$.



Rycina 12. Permeabilizacja błony szczepów *P. aeruginosa* PAO1 i $\Delta wbpL$ po dodaniu: endolizyny (36 $\mu\text{g/ml}$) z 1,5 μM gazderminy D (GSDMD) i N-końca gazderminy D otrzymanego po inkubacji z 4U kaspazy-4 (GSDMD N-koniec).

6.2.2. Efekt LPS-u na komórki eukariotyczne zmierzony metodą mikromacierzy ekspresyjnych

W kolejnym etapie badań oceniono wpływ LPS-u *P. aeruginosa* O10 na różne eukariotyczne linie komórkowe. Profil ekspresji genów analizowano w trzech liniach komórkowych, dwóch liniach komórek nabłonkowych A549, HeLa i jednej linii komórek monocytarnych THP1-Xblue traktowanych LPS-em *P. aeruginosa* O10 w stężeniu 0,1 ug/ml techniką mikromacierzy ekspresyjnych. Za pomocą dwukolorowej analizy ekspresji genów opartej na mikromacierzy zidentyfikowano geny o różnej ekspresji (DEG) ze znaczącymi zmianami w ekspresji ($p \leq 0,05$) w komórkach linii:

- A549; 50 genów (1 z podwyższonym poziomem ekspresji, 49 z obniżonym poziomem ekspresji)
- HeLa; 4795 genów (351 z podwyższonym poziomem ekspresji, 4444 z obniżonym poziomem ekspresji)
- THP1-Xblue; 493 geny (413 z podwyższonym poziomem ekspresji, 80 z obniżonym poziomem ekspresji).

6.2.2.1. Efekt LPS-u na komórki linii A549 zmierzone metodą mikromacierzy ekspresyjnych

W przypadku komórek A549 analiza wykazała tylko jeden gen o podwyższonej ekspresji, taki jak *SSBP3-AS1*, który koduje białko o nieznannej funkcji. Analiza ontologii 49 genów (GO) o obniżonej ekspresji była związana ze szlakiem sygnałowym receptora sprzężonego z białkiem G, pozytywną regulacją importu jonów wapnia, regulacją aktywności kinazy MAP (kinaza kappaB/NF-kappaB), regulacją kaskady ERK1 i ERK2, odpowiedzią komórkową na interferon-gamma, odpowiedzią immunologiczną, wiązaniem białek. Listę 15 genów o najbardziej obniżonej ekspresji w linii komórkowej A549 przedstawiono w tabeli 2.

W przypadku analizy związanej z powiązaniem genów do szlaków metabolicznych związanych z odpowiedzią immunologiczną zaobserwowano niski poziom korelacji z obniżoną ekspresją genów związanych jedynie z indukcją chemokin za pośrednictwem STAT6 ($p=0,022$) (według bazy danych Reactome (<https://reactome.org/>)).

Tabela 2. Lista 15 genów o najbardziej obniżonej ekspresji w komórkach linii A549 (adnotacje GO oparte na Quick GO).

Symbol genu	Analiza ontologii genów
SMAD1-AS1	heteromeryczny kompleks białkowy SMAD (GO:0071144)
CCL14	odpowiedź zapalna (GO:0006954), region zewnątrzkomórkowy (GO:0005576), homeostaza jonów wapnia (GO:0006874), pozytywna regulacja kaskady ERK1 i ERK2 (GO:0070374), szlak sygnałowy chemokin (GO:0070098), odpowiedź komórkowa na interferon-gamma (GO:0071346), odpowiedź immunologiczna (GO:0006955), aktywność cytokin (GO:0005125) aktywność chemokin (GO:0008009), odpowiedź komórkowa na interleukinę-1 (GO:0071347), homeostaza jonów wapnia (GO:0006874)
CCDC89	cytoplazma (GO:0005737), jądro (GO:0005634)
MAN2B1	region zewnątrzkomórkowy (GO:0005576), lizosom (GO:0005764), metabolizm mannozy (GO:0006013), proces modyfikacji białek komórkowych (GO:0006464), metabolizm węglowodanów (GO:0005975), wiązanie jonów metali (GO:0046872)
KAT2A	jądro (GO:0005634), chromosom (GO:0005694), cytoplazma (GO:0005737), regulacja transkrypcji (GO:0006355), aktywność acetylotransferazy histonowej (GO:0004402), przebudowa chromatyny (GO:0006338), regulacja aktywacji limfocytów T (GO:0050863), produkcja cytokin (GO:0001816)
CLCA1	transport jonów (GO:0006811), integralny składnik błony (GO:0016021), błona (GO:0016020), błona plazmatyczna (GO:0005886), aktywność wewnątrzkomórkowego kanału chlorkowego aktywowanego wapniem (GO:0005229), proteoliza (GO:0006508)
TRNAU1AP	cytoplazma (GO:0005737), jądro (GO:0005634), wiązanie kwasu nukleinowego (GO:0003676), inkorporacja selenocysteiny (GO:0001514)
ASAH1	lizosom (GO:0005764), proces metabolizmu lipidów (GO:0006629), aktywność hydrolazy (GO:0016787)
ERC2-IT1	funkcja molekularna (GO:0003674), składnik komórkowy (GO:0005575)
ENTPD5	retikulum endoplazmatyczne (GO:0005783), region zewnątrzkomórkowy (GO:0005576), aktywność hydrolazy (GO:0016787), glikozylacja białek (GO:0006486), wiązanie białek (GO:0005515), regulacja sygnalizacji kinazy fosfatydyloinozytolu (GO:0014066), proces metaboliczny ATP (GO:0046034)
C1QTNF5	region zewnątrzkomórkowy (GO:0005576), błona (GO:0016021), pęcherzyk transportowy (GO:0030133), wydzielanie białka (GO:0009306), wiązanie białka (GO:0042802), trimer kolagenu (GO:0005576)
UNC13C	synapsa (GO:0045202), błona plazmatyczna (GO:0005886), cytoplazma (GO:0005737), wiązanie jonów wapnia (GO:0005509), transdukcja sygnału wewnątrzkomórkowego (GO:0035556), wiązanie jonów metali (GO:0046872), fosfolipid wiązanie (GO:0005543)
PDGFRB	integralny składnik błony (GO:0016021), aparat Golgiego (GO:0005794), organelle związane z błoną wewnątrzkomórkową (GO:0043231), szlak sygnałowy receptora sprzężony z białkiem G (GO:0007186), odpowiedź komórkowa na czynnik wzrostu pochodzenia płytkowego (GO:0036120), wiązanie z białkami (GO:0005515), pozytywna regulacja importu jonów wapnia (GO:0090280), pozytywna regulacja aktywności kinazy MAP (GO:0043406), wiązanie ATP (GO:0005524)
TIFAB	kinaza I-kappaB/sygnalizacja NF-kappaB (GO:0007249)
SLC45A3	integralny składnik błony (GO:0016021), błony (GO:0016020), transport

przezbłonowy (GO:0055085), pozytywna regulacja procesu metabolizmu glukozy (GO:0010907), pozytywna regulacja procesu biosyntezy kwasów tłuszczowych (GO:0045723)
--

6.2.2.2. Efekt LPS-u na komórki linii HeLa zmierzone metodą mikromacierzy ekspresyjnych

Analiza GO dla komórek HeLa wykazała podwyższoną ekspresję dla szlaku sygnałowego receptora sprzężonego z białkiem G, aktywnością receptora sprzężonego z białkiem G, wiązaniem z DNA, regulacją transkrypcji, transportem i wiązaniem jonów, negatywną regulacją procesu apoptozy, wrodzoną odpowiedzią immunologiczną, przeciwbakteryjną odpowiedzią humoralną, produkcją immunoglobulin zaangażowanych w odpowiedź immunologiczną. Obniżona ekspresja genów komórek linii HeLa związana była z: wiązaniem i transportem jonów, negatywną regulacją odpowiedzi zapalnej, odpowiedzią na czynnik wzrostu beta i wiązanie białek. Listę 15 genów o najbardziej podwyższonej i obniżonej ekspresji w linii komórkowej HeLa przedstawiono odpowiednio w tabeli 3 i tabeli 4.

W przypadku analizy związanej z powiązaniem genów do szlaków metabolicznych związanych z odpowiedzią immunologiczną zaobserwowano niski poziom korelacji z ekspresją genów związanych jedynie z syntezą defensyn oraz sygnalizacją za pośrednictwem interleukin (według bazy danych Reactome (<https://reactome.org/>)).

Tabela 3. Lista 15 genów o najbardziej podwyższonej ekspresji w komórkach linii HeLa (adnotacje GO oparte na Quick GO).

Symbol genu	Analiza ontologii genów
WFDC9	przestrzeń zewnątrzkomórkowa (GO:0005615), wrodzona odpowiedź immunologiczna (GO:0045087), przeciwbakteryjna odpowiedź humoralna (GO:0019731), negatywna regulacja aktywności endopeptydazy (GO:0010951), aktywność inhibitora endopeptydazy typu seryny (GO:0004867), białko wiązanie (GO:0005515)
OR51D1	integralny składnik błony (GO: 0016021), błony (GO: 0016020), transdukcji sygnału (GO: 0007165), błony komórkowej (GO: 005886), odpowiedzi na bodziec (GO: 0050896), szlaku sygnałowego receptora sprzężonego z białkiem G (GO:0007186), aktywność receptora sprzężonego z białkiem G (GO:0004930)
GPR78	integralny składnik błony (GO:0016021), błony (GO:0016020), szlak sygnałowy receptora sprzężonego z białkiem G (GO:0007186), aktywność receptora sprzężonego z białkiem G (GO:0004930), białko G aktywujące cyklazę adenylnową szlak sygnałowy receptora (GO:0007189), wiązanie z białkami (GO:0005515), transdukcja sygnału (GO:0007165)

TRIM77	cytoplazma (GO:0005737), wiązanie jonów metali (GO:0046872), wiązanie jonów cynku (GO:0008270), ubiquitynacja białek (GO:0016567), aktywność ligazy białkowej ubiquityny (GO:00616030)
HTR3E	integralny składnik błony (GO:0016021), błony (GO:0016020), transport jonów (GO:0006811), transbłonowy transport jonów (GO:0034220), aktywność kanału jonowego (GO:0005216), aktywność transbłonowego receptora sygnalizacyjnego (GO:0004888), aktywność pozakomórkowego kanału jonowego bramkowanego ligandem (GO:0005230), szlak sygnałowy receptora serotoniny (GO:0007210), regulacja potencjału błonowego (GO:0042391), wiązanie z białkami (GO:0005515)
IMPG2	integralny składnik błony (GO:0016021), błony (GO:0016020), składnik strukturalny macierzy zewnątrzkomórkowej (GO:0005201), wiązanie kwasu hialuronowego (GO:0005540), wiązanie heparyny (GO:0008201), kompleks receptorowy (GO:0043235)
TMPRSS7	integralny składnik błony (GO:0016021), błony (GO:0016020), błony plazmatycznej (GO:005886), aktywność peptydazy (GO:0008233), proteoliza (GO:0006508), endopeptydaza typu serynowego, aktywność (GO:0004252), aktywność hydrolazy (GO:0016787)
ANGPT4	przestrzeń pozakomórkowa (GO:005615), transdukcja sygnału (GO:0007165), negatywna regulacja procesu apoptozy (GO:0043066), pozytywna regulacja fosforylacji peptydylo-tyrozyny (GO:0050731), aktywność aktywatora białkowej kinazy tyrozynowej receptora transbłonowego (GO:0030297), wiązanie receptora kinazy tyrozynowej (GO:0030971), aktywacja aktywności białkowej kinazy tyrozynowej receptora transbłonowego (GO:0007171), angiogeneza (GO:0001525), wiązanie receptora sygnalizacyjnego (GO:0005102)
FERD3L	jądro (GO:0005634), wiązanie DNA (GO:0003677), regulacja transkrypcji przez polimerazę RNA II (GO:0006357), polimeraza RNA II region regulatora transkrypcji wiązanie specyficzne dla sekwencji DNA (GO:0000977), represor transkrypcji wiążący DNA aktywność, specyficzna dla polimerazy RNA II (GO:0001227), aktywność dimeryzacji białek (GO:0046983), wiązanie białek (GO:0005515)
OR8U1	integralny składnik błony (GO:0016021), błony (GO:0016020), błony plazmatycznej (GO:005886), transdukcji sygnału (GO:0007165), odpowiedzi na bodziec (GO:0050896), szlaku sygnałowego receptora sprzężonego z białkiem G (GO:0007186), aktywność receptora sprzężonego z białkiem G (GO:0004930)
PROKR2	integralny składnik błony (GO:0016021), błony (GO:0016020), błony plazmatycznej (GO:005886), transdukcji sygnału (GO:0007165), szlaku sygnałowego receptora sprzężonego z białkiem G (GO:0007186), sprzężonego z białkiem G aktywność receptora (GO:0004930), wiązanie peptydów (GO:0042277)
GALR2	integralny składnik błony (GO:0016021), błony (GO:0016020), transdukcja sygnału (GO:0007165), szlak sygnałowy receptora sprzężonego z białkiem G (GO:0007186), aktywność receptora sprzężonego z białkiem G (GO:0004930), Aktywność receptora peptydowego sprzężonego z białkiem G (GO:0008528), pozytywna regulacja transkrypcji przez polimerazę RNA II (GO:0045944), wiązanie z białkami (GO:0005515), szlak sygnałowy receptora powierzchniowego komórki (GO:0007166)
SOX10	jądro (GO:0005634), wiązanie DNA (GO:0003677), aktywność czynnika transkrypcyjnego wiążącego DNA, specyficzna dla polimerazy RNA II (GO:0000981), pozytywna regulacja transkrypcji przez polimerazę RNA II (GO:0045944), negatywna regulacja proces apoptozy (GO:0043066), błona (GO:0016020), cytoplazma (GO:0005737)
GRK5-IT1	aktywność kinazy receptora sprzężonego z białkiem G (GO:0004703)

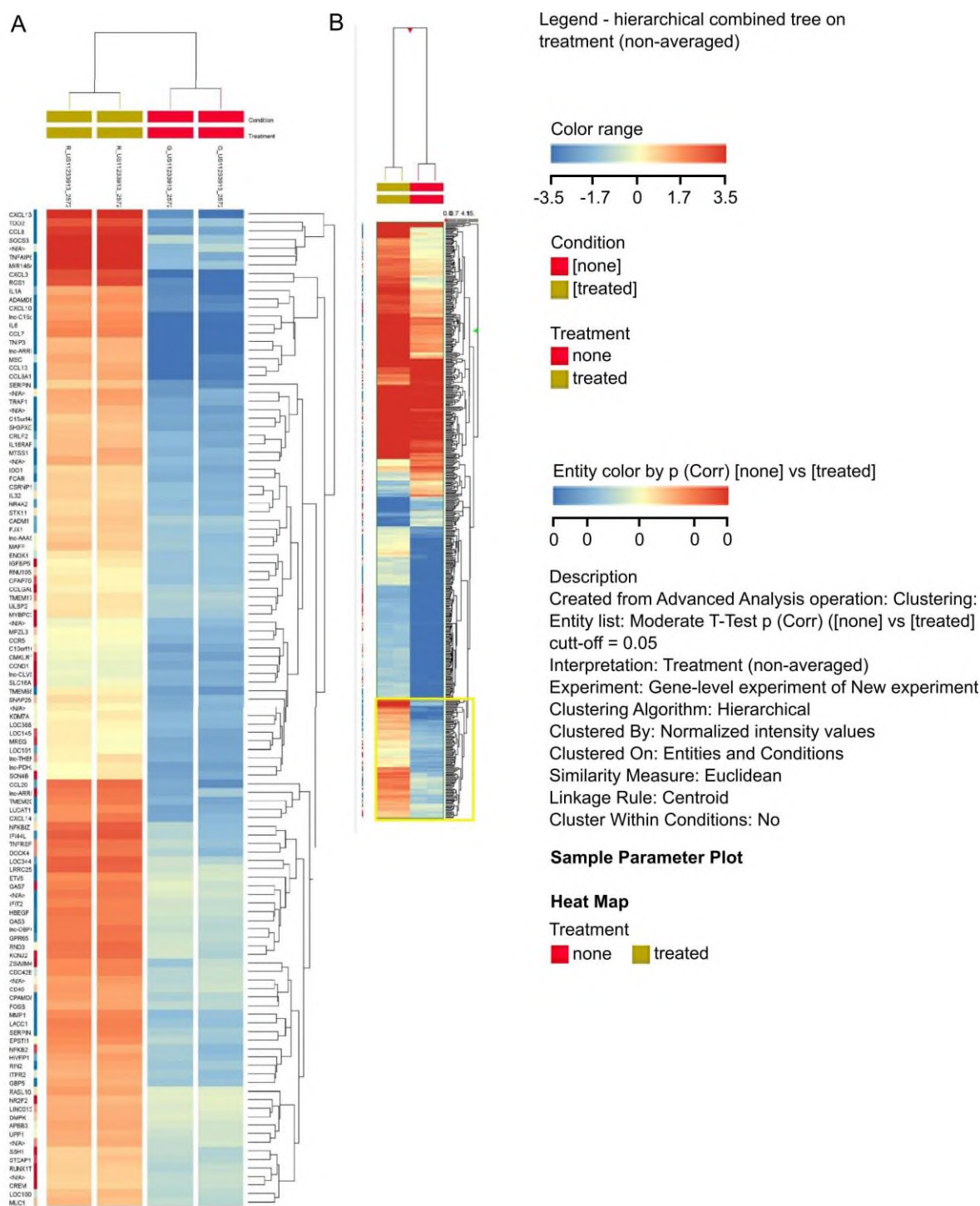
GAPT	integralny składnik błony (GO:0016021), błony (GO:0016020), błony plazmatyczne (GO:005886), produkcja immunoglobulin zaangażowana w odpowiedź immunologiczną (GO:0002381), proliferacja limfocytów B zaangażowana w odpowiedź immunologiczną (GO:0002322), homeostaza komórek B (GO: 0001782)
------	--

Tabla 4. Lista 15 genów o najbardziej obniżonej ekspresji w komórkach linii HeLa (adnotacje GO oparte na Quick GO).

Symbol genu	Analiza ontologii genów
SSBP3-AS1	heteromeryczny kompleks białkowy SMAD (GO:0071144)
LIN28A	wiązanie kwasów nukleinowych (GO:0003676), wiązanie jonów cynku (GO:0008270), pozytywna regulacja sygnalizacji kinazy białkowej B (GO:0051897), regulacja wyciszania genów przez miRNA (GO:0060964), jądro (GO:0005634), cytoplazma (GO:0005737), polisom (GO:0005834), obróbka pre-miRNA (GO:0031054), pozytywna regulacja sygnalizacji TOR (GO:0032008)
CLCA1	transport jonów (GO:0006811), integralny składnik błony (GO:0016021), błona (GO:0016020), błona plazmatyczna (GO:0005886), aktywność wewnątrzkomórkowego kanału chlorkowego aktywowanego wapniem (GO:0005229), proteoliza (GO:0006508)
C1QTNF5	region zewnątrzkomórkowy (GO:0005576), błona plazmatyczna (GO:0016324), błona (GO:0016020), pęcherzyk transportowy (GO:0030133), wydzielanie białka (GO:0009306), wiązanie białka (GO:0042802)
UNC13C	synapsa (GO:0045202), chemiczna transmisja synaptyczna (GO:0007268), wiązanie diacyloglicerolu (GO:0019992)
EFCC1	cytozol (GO:0005829), wiązanie jonów wapnia (GO:0005509)
KCNAB3	cytoplazma (GO:0005737), integralny składnik błony (GO:0016021), regulacja transbłonowego transportu jonów (GO:0034765), transport jonów potasu (GO:0006813), aktywność kanału potasowego bramkowanego napięciem (GO:0005242)
BCL6B	jądro (GO:0005634) wiązanie DNA (GO:0003677), negatywna regulacja transkrypcji przez polimerazę RNA II (GO:0000122), polimeraza RNA II regionu regulacyjnego transkrypcji wiązanie specyficzne dla sekwencji DNA (GO:0000977), represor transkrypcji wiążący DNA aktywność, specyficzna dla polimerazy RNA II (GO:0001227), odpowiedź immunologiczna typu 2 (GO:0042092), regulacja odpowiedzi zapalnej (GO:0050727), regulacja produkcji cytokin (GO:0001817)
SHC4	transdukcja sygnału wewnątrzkomórkowego (GO:0035556), wiązanie receptorowej kinazy tyrozynowej (GO:0030971), pozytywna regulacja proliferacji populacji komórek (GO:0008284), proces apoptozy (GO:0006915), regulacja ekspresji genów (GO:0010468), łodyga różnicowanie komórek (GO:0048863), błona plazmatyczna (GO:0005886), wiązanie kinazy białkowej (GO:0019901)
LIM2	integralny składnik błony (GO:0016021), błona (GO:0016020)
NYAP1	sygnalizacja kinazy fosfatydyloinozytolu 3 (GO: 0014065)
UNC5B	integralny składnik błony (GO:0016021), błony (GO:0016020), błony plazmatyczne (GO:0005886), angiogeneza (GO:0001525), proces apoptozy (GO:0006915), regulacja zewnętrznego szlaku sygnałowego apoptozy przy braku ligand (GO:2001240), wiązanie białka (GO:0005515), transdukcja sygnału (GO:0007165)
ABCA10	integralny składnik błony (GO: 0016021), błony (GO: 0016020), transport przezbłonowy (GO: 0055085), aktywność transportera transbłonowego sprzężonego z ATPazą (GO: 0042626)
APOL3	cytoplazma (GO:0005737), odpowiedź zapalna (GO:0006954), transport lipidów (GO:0006869), wiązanie lipidów (GO:0008289), pozytywna regulacja kinazy I-kappaB/sygnalizacji NF-kappaB (GO:0043123)
TRPV4	integralny składnik błony komórkowej (GO:0005887), integralny składnik błony (GO:0016021), transport jonów (GO:0006811), osmosensoryczny szlak sygnałowy (GO:0007231), wiązanie ATP (GO:0005524), wiązanie z białkami (GO:0005524)

6.2.2.3. Efekt LPS-u na komórki linii THP1-Xblue zmierzony metodą mikromacierzy ekspresyjnych

Na rycinie 13 przedstawiono mapę cieplną z hierarchiczną analizą skupień pokazującą profil ekspresji genów w linii komórkowej THP1-Xblue indukowanych LPS-em *P. aeruginosa* O10 w stężeniu 0,1 µg/ml, wygenerowane na podstawie danych z mikromacierzy DNA przy użyciu oprogramowania GeneSpring GX.



Rycina 13. Mapy ciepłone z hierarchiczną analizą skupień pokazujące profil ekspresji genów w linii komórkowej THP1-Xblue indukowanych za pomocą LPS-u *P. aeruginosa* O10 w stężeniu 0,1 µg/ml, wygenerowane na podstawie danych z mikromacierzy DNA przy użyciu oprogramowania GeneSpring GX. Kolorem czerwonym oznaczono próbkę nietraktowaną, na zielono próbkę potraktowaną LPS-em *P. aeruginosa* O10. Kolor czerwony na mapach to wzrost poziomu ekspresji genów, a kolor niebieski to spadek ekspresji w próbce traktowanej w stosunku do próbki kontrolnej. Panel B pokazuje profil zmian w ekspresji wszystkich genów, gdzie zaznaczony żółty kwadrat pokazuje ekspresję genów z najwyższym poziomem zmiany w ekspresji (panel A).

Listę 15 genów o największym wzroście ekspresji w komórkach THP1-Xblue traktowanych LPSem *P. aeruginosa* O10 zestawiono w tabeli 5, należą do nich *CXCL13*, *CXCL3*, *CCL2*, *IL-1 β* , *RGS1*, *MIR146A*, *TNFAIP6*, *CCL8*, *CXCL8*, *MPP9*, *CCL7*, *IL6*, *CXCL1*, *SOCS3*, *CCL20* (Ryc. 1B). Geny te związane są z odpowiedzią komórkową na LPS, w tym specyficzną dla pyroptozy interleukiną IL-1 β .

Tabela 5. Lista 15 genów o najbardziej podwyższonej ekspresji w linii komórkowej THP1-Xblue (adnotacje GO oparte na Quick GO).

Symbol genu	Analiza ontologii genów
CXCL13	odpowiedź komórkowa na lipopolisacharyd (GO:0071222), odpowiedź zapalna (GO:0006954), odpowiedź immunologiczna (GO:0006955), integralny składnik błony (GO:0016021), błona (GO:0016020), szlak sygnałowy za pośrednictwem chemokin (GO :0070098), przeciwdrobnoustrojowa humoralna odpowiedź immunologiczna, w której pośredniczy peptyd przeciwdrobnoustrojowy (GO:0061844), aktywność cytokin (GO:0005125)
CXCL3	odpowiedź komórkowa na lipopolisacharyd (GO: 007122), odpowiedź zapalna (GO: 0006954), odpowiedź immunologiczna (GO: 0006955), wiązanie receptora chemokin CXCR (GO: 0045236), aktywność chemokin (GO: 0008009), przeciwdrobnoustrojowa humoralna odpowiedź immunologiczna, w której pośredniczą peptyd przeciwdrobnoustrojowy (GO:0061844), aktywność cytokin (GO:0005125)
CCL2	wydzielanie ligandu 2 chemokiny (motyw C-C) (GO:0035906), pozytywna regulacja wydzielania liganda 2 chemokiny (motyw C-C) (GO:1904209)
Il1 β	odpowiedź na lipopolisacharyd (GO:0032496), odpowiedź immunologiczna (GO:0006955), odpowiedź zapalna (GO:0006954), aktywność cytokin (GO:0005125), region receptora interleukiny-1 (GO:0005149), region zewnątrzkomórkowy (GO:0005576), przestrzeń zewnątrzkomórkowa (GO:0005615), transdukcja sygnału (GO:0007165), pozytywna regulacja produkcji interleukiny-6 (GO:0032755), pozytywna regulacja kaskady p38MAPK (GO:1900745), pozytywna regulacja kinazy I-kappaB/ Sygnalizacja NF-kappaB (GO:0043123), pozytywna regulacja produkcji interleukiny-8 (GO:0032757)
RGS1	odpowiedź na bakterie (GO:0009617), błona plazmatyczna (GO:0005886), szlak sygnałowy receptora sprzężony z białkiem G (GO:0007186), aktywność aktywatora GTPazy (GO:0005096), transdukcja sygnału (GO:0007165), pozytywna regulacja Aktywność GTPazy (GO:0043547)
MIR146A	wyciszanie genów przez miRNA (GO:0035195)
TNFAIP6	negatywna regulacja odpowiedzi zapalnej (GO:0050728), wiązanie kwasu hialuronowego (GO:00055400), adhezja komórek (GO:0007155), odpowiedź zapalna (GO:0006954), sygnalizacja komórka-komórka (GO:0007267), wiązanie białek (GO :0005515), region zewnątrzkomórkowy (GO:0005576), przestrzeń zewnątrzkomórkowa (GO:0005615)
CCL8	odpowiedź immunologiczna (GO:0006955), odpowiedź zapalna (GO:0006954), przeciwdrobnoustrojowa humoralna odpowiedź immunologiczna, w której pośredniczy peptyd przeciwdrobnoustrojowy (GO:0061844), aktywność cytokin (GO:0005125), aktywność chemokin (GO:0008009), odpowiedź komórkowa na interferon -gamma (GO:0071346), transdukcja sygnału (GO:0007165), odpowiedź komórkowa na interleukinę-1 (GO:0071347), pozytywna regulacja kaskady ERK1 i ERK2

	(GO:0070374)
CXCL8	odpowiedź komórkowa na lipopolisacharyd (GO:0071222), odpowiedź immunologiczna (GO:0006955), odpowiedź zapalna (GO:0006954), wiązanie receptora interleukiny-8 (GO:0005153), aktywność cytokin (GO:0005125), aktywność chemokin (GO:0008009), aktywacja neutrofilów (GO:0042119), odpowiedź obronna (GO:0006952), regulacja wnikania bakterii do komórki gospodarza (GO:2000535), negatywna regulacja szlaku sygnałowego receptora sprzężonego z białkiem G (GO:0045744), działanie przeciwdrobnoustrojowe humoralna odpowiedź immunologiczna, w której pośredniczy peptyd przeciwdrobnoustrojowy (GO:0061844)
MPP9	błona aparatu Golgiego (GO:0000139), aparat Golgiego (GO:0005794), centriola (GO:0005814), cytoszkielet (GO:0005856), cytoplazma (GO:0005737), błona (GO:0016020)
CCL7	odpowiedź immunologiczna (GO:0006955), aktywność cytokin (GO:0005125), aktywność chemokin (GO:0008009), transdukcja sygnału (GO:0007165), region pozakomórkowy (GO:0005576)
IL6	odpowiedź obronna na bakterie Gram-ujemne (GO:0050829), odpowiedź komórkowa na lipopolisacharyd (GO:0071222), odpowiedź immunologiczna (GO:0006955), odpowiedź zapalna (GO:0006954), pozytywna regulacja procesu apoptozy (GO:0043065), pozytywna regulacja kaskady MAPK (GO:0043410), pozytywna regulacja szlaku sygnałowego receptora przez STAT (GO:1904894), szlak sygnalizacyjny receptora przez JAK-STAT (GO:0007259), pozytywna regulacja procesu apoptozy (GO:0043065), pozytywna regulacja regulacja wydzielania immunoglobulin (GO:0051024), pozytywna regulacja aktywacji limfocytów B (GO:0050871), pozytywna regulacja proliferacji limfocytów T (GO:0042102), pozytywna regulacja aktywności czynnika transkrypcyjnego NF-kappaB (GO:0051092)
CXCL1	odpowiedź immunologiczna (GO:0006955), odpowiedź komórkowa na lipopolisacharyd (GO:0071222), odpowiedź zapalna (GO:0006954), aktywność cytokin (GO:0005125) aktywność chemokin (GO:0008009), szlak sygnałowy receptora sprzężony z białkiem G (GO:0007186), przeciwdrobnoustrojowa humoralna odpowiedź immunologiczna, w której pośredniczy peptyd przeciwdrobnoustrojowy (GO:0061844), zabijanie komórek innych organizmów (GO:0031640)
SOCS3	negatywna regulacja odpowiedzi zapalnej (GO:0050728), szlak sygnałowy za pośrednictwem interleukiny-6 (GO:0070102), negatywna regulacja procesu apoptozy (GO:0043166), szlak sygnałowy receptora przez JAK-STAT (GO:0007259), negatywna regulacja fosforylacji tyrozyny białka STAT (GO:0042532), transdukcji sygnału wewnątrzkomórkowego (GO:0035556)
CCL20	odpowiedź komórkowa na interleukinę-1 (GO:0071347), odpowiedź zapalna (GO:0006954), odpowiedź immunologiczna (GO:0006955), przeciwdrobnoustrojowa humoralna odpowiedź immunologiczna, w której pośredniczy peptyd przeciwdrobnoustrojowy (GO:0061844), zabijanie komórek innych organizmów (GO:0061844) : 0031640), aktywność cytokin (GO:0005125), aktywność chemokin (GO:0008009), wiązanie receptora chemokin CCR (GO:0048020), sygnalizacja za pośrednictwem wapnia przy użyciu wewnątrzkomórkowego źródła wapnia (GO:0035584)

Natomiast lista 15 genów o najbardziej obniżonej ekspresji dla linii THP1-Xblue została pokazana w tabeli 6, należą do nich geny *MS4A3*, *SERPINB10*, *GPA33*, *CLEC12A*, *CNRI*, *DEPDC4*, *SLC40A1*, *TMOD1*, *DSC3*, *NMUR1*, *RET*, *CLRN1*, *F13A1*, *SERPINI2*, *MS4A6A* i

są związane z transdukcją sygnału, metabolizmem białek, metabolizmem RNA i homeostazą.

Tabela 6. Lista 15 genów o najbardziej obniżonej ekspresji w komórkach linii THP1-Xblue (adnotacje GO oparte na Quick GO).

Symbol genu	Analiza ontologii genów
MS4A3	integralny składnik błony (GO:0016021), błony (GO:0016020), regulacja cyklu komórkowego (GO:0051726), cytoplazma (GO:0005737)
SERPINB10	przestrzeń zewnątrzkomórkowa (GO:005615), nukleoplazma (GO:005654), cytozol (GO:0005859), negatywna regulacja procesu apoptozy (GO:0043066), negatywna regulacja aktywności endopeptydazy (GO:0010951), jądro (GO:0005634)
GPA33	integralny składnik błony (GO:0016021), błona (GO:0016020), integralny składnik błony plazmatycznej (GO:0005877), aktywność receptora sygnalizacyjnego (GO:0038023), wiązanie z białkami (GO:0005515)
CLEC12A	integralny składnik błony (GO:0016021), błony (GO:0016020), błony plazmatycznej (GO:0005886), wiązania węglowodanów (GO:0030246), degranulacji neutrofilii (GO:0043312)
CNR1	integralny składnik błony (GO:0016021), błony plazmatycznej (GO:0005886), szlak sygnałowy receptora sprzężonego z białkiem G (GO:0007186), aktywność receptora sprzężonego z białkiem G (GO:0004930), szlak sygnałowy kannabinoidów (GO:0038171), transdukcja sygnału (GO:0007165), wiązanie białek (GO:0005515), pozytywna regulacja ostrej odpowiedzi zapalnej na bodziec antygenowy (GO:0002866), negatywna regulacja transportu jonów (GO:0043271), pozytywna regulacja procesu apoptozy (GO:0043065), odpowiedź na lipopolisacharyd (GO:0032496)
DEPDC4	transdukcja sygnału wewnątrzkomórkowego (GO:0035556)
SLC40A1	integralny składnik błony (GO:0016021), błony plazmatycznej (GO:0005886), błony (GO:0016020), nukleoplazmy (GO:005654), cytozolu (GO:0005859), transportu jonów (GO:0006811), wiązania białek (GO:0005515), negatywna regulacja procesu apoptozy (GO:0043066), homeostaza limfocytów (GO:0002260)
TMOD1	cytoskielet (GO:0005856), cytozol (GO:0005859), cytoplazma (GO:0005737), błona (GO:0016020), COP9 sygnałosom (GO:0008180), spiczasty koniec czapeczki z włókna aktynowego (GO:0051649), włókno aktynowe wiązanie (GO:0051015), wiązanie tropomiozyny (GO:0005523), cytoskielet korowy (GO:0030863)
DSC3	integralny składnik błony (GO:0016021), błony (GO:0016020), błony plazmatycznej (GO:0005886), adhezja komórek homofilnych poprzez cząsteczki adhezyjne błony komórkowej (GO:0007156), wiązanie jonów wapnia (GO:005509), adhezja komórek (GO:007155)
NMUR1	integralny składnik błony (GO:0016021), błony (GO:0016020), błony plazmatycznej (GO:0005886), szlak sygnałowy receptora sprzężonego z białkiem G (GO:0007186), sygnalizacja za pośrednictwem wapnia (GO:0019722), fosforan inozytolu - przekazywanie sygnałów (GO:0048016), transport chlorków (GO:0006821), neuropeptydowy szlak sygnałowy (GO:007218), transdukcja sygnału (GO:0007165)
RET	integralny składnik błony (GO:0016021), błony (GO:0016020), aktywność kinazy białkowej (GO:0004672), wiązanie ATP (GO:0005524), fosforylacja białek (GO:0006468), kaskada MAPK (GO:0000165), wiązanie jonów wapnia (GO:0005509)
CLRN1	integralny składnik błony (GO:0016021), błony (GO:0016020), pęcherzyk transportowy

	sieci trans-Golgi (GO:0030140), ruchliwość komórki (GO:0048870)
F13A1	aktywność gamma-glutamylotransferazy białkowo-glutaminowej (GO:0003810), sieciowanie peptydowe (GO:0018149), wiązanie jonów metali (GO:0046872), cytoplazma (GO:0005737), region zewnątrzkomórkowy (GO:0005576)
SERPINI2	przestrzeń pozakomórkowa (GO:0005615), integralny składnik błony (GO:0016021), błona (GO:0016020), transdukcja sygnału (GO:0007165), aktywność inhibitora endopeptydazy typu serynowego (GO:0004867), regulacja adhezji komórek (GO:0030155), wiązanie z białkami (GO:0005515)
MS4A6A	integralny składnik membrany (GO:0016021), membrana (GO:0016020)

W przypadku analizy związanej z powiązaniem genów do szlaków metabolicznych związanych z odpowiedzią immunologiczną zaobserwowano znacząco wyższy poziom korelacji, w przeciwieństwie do komórek linii A549 i HeLa. W tabeli 7 przedstawiono listę szlaków biochemicznych z udziałem skorelowanych genów o podwyższonej ekspresji według bazy danych Reactome (<https://reactome.org/>). Nie stwierdzono korelacji genów o obniżonej ekspresji ze szlakami biochemicznymi związanymi z odpowiedzią immunologiczną.

Tabela 7. Lista szlaków związanych z odpowiedzią immunologiczną o podwyższonej ekspresji genów komórek THP1-Xblue według bazy Reactome (<https://reactome.org/>) z FDR Benjamina-Hochberga (False Discovery Rate) i $p < 0,05$. Analizę statystyczną mikromacierzy DNA obliczono za pomocą oprogramowania do ekspresji genów GeneSpring GX (Agilent, St. Clara, USA).

Nazwa szlaku	Liczba genów skorelowana	Liczba genów całkowita	wartość p
sygnalizacja -interleukina10	42	86	1.1102230246251565E-16
sygnalizacja -interferon	40	184	1.1102230246251565E-16
sygnalizacja -interleukiny	99	639	1.1102230246251565E-16
sygnalizacja -cytokin	166	1261	1.1102230246251565E-16
sygnalizacja - interferon	56	392	7.216449660063518E-15
kaskada TLR7/8	15	103	4.83209337737156E-5
kaskada zależna od MyD88	15	103	4.83209337737156E-5
kaskady receptorów Toll-like	21	184	5.758586919590858E-5
kaskada TLR9	15	107	7.343862901743048E-5
indukcja kinaz NFkB	14	102	1.565336798999839E-4
kaskada TLR2 i TLR6	14	111	3.632765268229976E-4
kaskada MyD88:MAL(TIRAP)	14	111	3.632765268229976E-4
szlak CLEC7A/inflammasom	4	8	4.167638312014832E-4
Interleukina 1	4	8	4.167638312014832E-4

Zaobserwowano, że testowany LPS *P. aeruginosa* O10 jest zdolny do indukcji odpowiedzi immunologicznej tylko w linii monocytów, natomiast zaobserwowano brak takiego samego zjawiska dla komórek linii A549 i HeLa, z tego też powodu do dalszych badań wybrano monocytarne linie komórkowe. Analiza profilu ekspresji genów za pomocą

mikromacierzy DNA wykazały, że badany LPS indukuje odpowiedź immunologiczną w komórkach THP1-Xblue, jednak nie zaobserwowano zmian w ekspresji *GSDMD*.

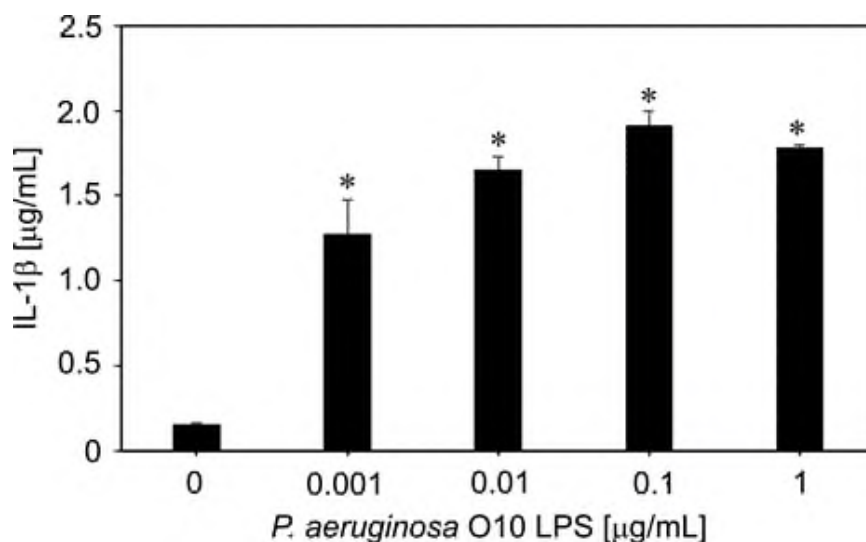
6.2.2.3.1. Efekt LPS-u na ekspresję *GSDMD* w komórkach linii THP1-Xblue zmierzony metodą RT-qPCR

Na rycinie 14 przedstawiono poziom ekspresji genu *GSDMD* w komórkach THP1-Xblue indukowany LPS *P. aeruginosa* O10 w zakresie stężeń 0,001-1 µg/ml. Stwierdzono istotny statystycznie wzrost poziomu ekspresji *GSDMD* wywołany LPS-em w stężeniach 0,1 µg/ml i 1 µg/ml w stosunku do kontroli.

Rycina 14. Poziom ekspresji *GSDMD* w komórkach THP1-Xblue po traktowaniu LPS-em *P. aeruginosa* O10. Poziomy ekspresji określono za pomocą ilościowej analizy PCR w czasie rzeczywistym. Gen *ACTB* zastosowano jako wewnętrzny gen referencyjny, a metodę $\Delta\Delta CT$ zastosowano do względnej oceny ilościowej. * $p < 0,05$.

6.2.2.3.2 Efekt LPS-u na poziom IL-1 β w komórkach linii THP1-Xblue zmierzony metodą ELISA

Na rycinie 15 przedstawiono poziom interleukiny IL-1 β jako markera procesu pyroptozy [75]. Zaobserwowano, że LPS *P. aeruginosa* O10 indukował produkcję IL-1 β w komórkach THP1-Xblue w stężeniu wyższym niż 0,001 µg/ml.

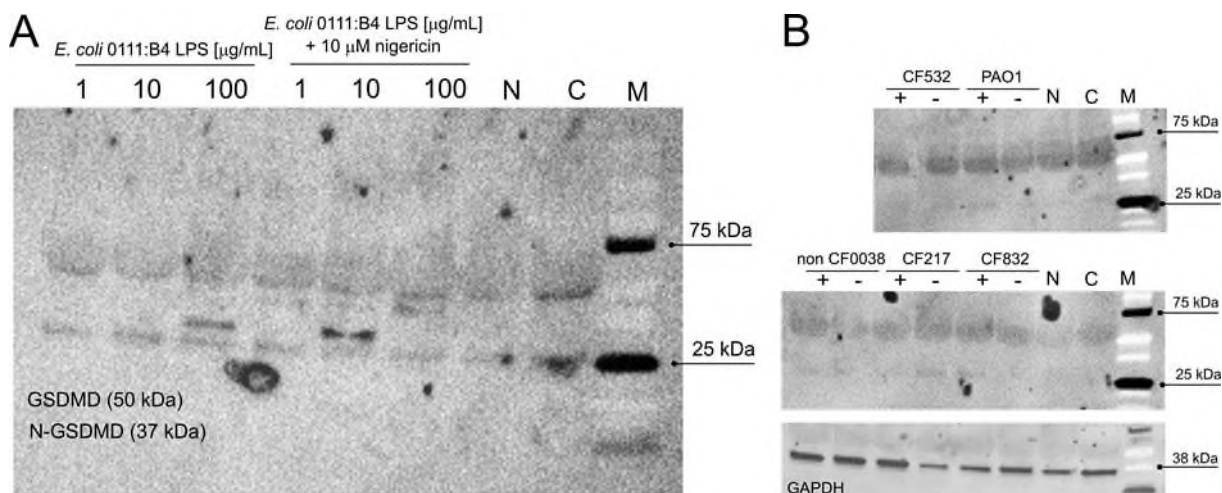


Rycina 15. Poziom produkcji IL-1 β przez komórki THP1-Xblue po traktowaniu LPS-em *P. aeruginosa* O10 zmierzony metodą ELISA. * $p < 0,05$.

6.2.2.3.3. Produkcja GSDMD przez komórki THP1-Null2 w obecności LPS

Ocenę produkcji GSDMD i produktów jej cięcia w obecności LPS-u przeprowadzono na linii THP1-Null2 wobec LPS-u *E. coli* 0111:B4 i nigercyny według protokołu dostarczonego przez producenta Invivogen, Tuluza, Francja. Komórki THP1-Null2 pochodzą z linii komórkowej THP-1 i są zdolne do wytwarzania IL-1 β po stymulacji kanonicznymi lub niekanonicznymi induktorami inflamasomu, takimi jak nigerycyna lub LPS. Ponadto ulegają pyroptotycznej śmierci komórkowej po aktywacji inflamasomu.

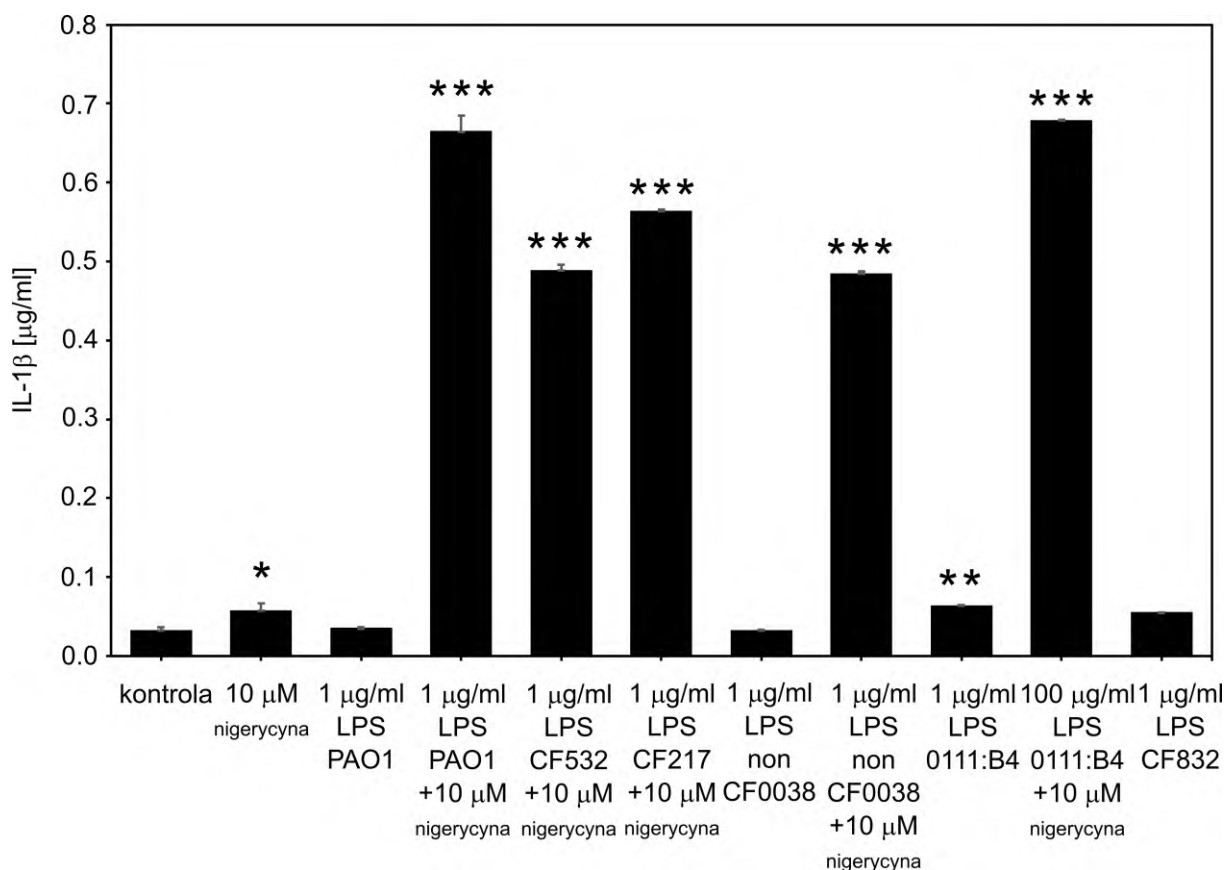
Poziom ekspresji białka GSDMD oraz jego N-końcowego produktu analizowano z zastosowaniem techniki Western blot (Ryc. 16). Stwierdzono obecność białka GSDMD i jego N-końcowej części w pożywce pochodzącej z komórek THP1-Null2 po traktowaniu LPS-em *E. coli* 0111:B4 lub nigerycyną (Ryc. 16A). Ponadto stwierdzono obecność białka GSDMD i jego N-końca w kontrolnym medium pochodzącym z nietraktowanego LPS-em. Zaobserwowano formy oligomeryczne N-końca GSDMD w supernatantach po hodowli komórek THP1-Null2 z najwyższym stężeniem samego LPS-u (100 µg/ml) oraz przy 10 µg/ml wraz z nigerycyną. Formy oligomeryczne N-końca GSDMD mogły pochodzić ze zdegradowanych błon komórkowych w procesie pyroptozy. Poziom białka GSDMD i jego cięcia do produktu N-końcowego był bardzo niski i podobny do poziomu w komórkach kontrolnych. Podobny efekt zaobserwowano dla LPS-ów pochodzącego z *P. aeruginosa* (Ryc. 16B).



Rycina 16. (A) Analiza Western Blot poziomu N-końca białka GSDMD w warunkach redukujących z β -merkaptanoolem w komórkach THP1-Null2 w supernatantach po potraktowaniu LPS-em *E. coli* 0111:B4 w trzech różnych stężeniach 1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml z/bez nigerycyną (10 μ M), M - marker, C - kontrola, N - nigerycyna; (B) Analiza Western Blot N-końca białka GSDMD w warunkach redukujących z β -merkaptanoolem w komórkach THP1-Null2 w supernatantach po traktowaniu różnymi typami LPS-ów *P. aeruginosa* w stężeniu 1 μ g/ml i bez/z nigerycyną (10 μ M). GAPDH zastosowano jako białko kontrolne do normalizacji białka docelowego.

6.2.2.3.4. Efekt LPS-u na poziom IL-1 β w komórkach linii THP1-Null2 zmierzony metodą ELISA

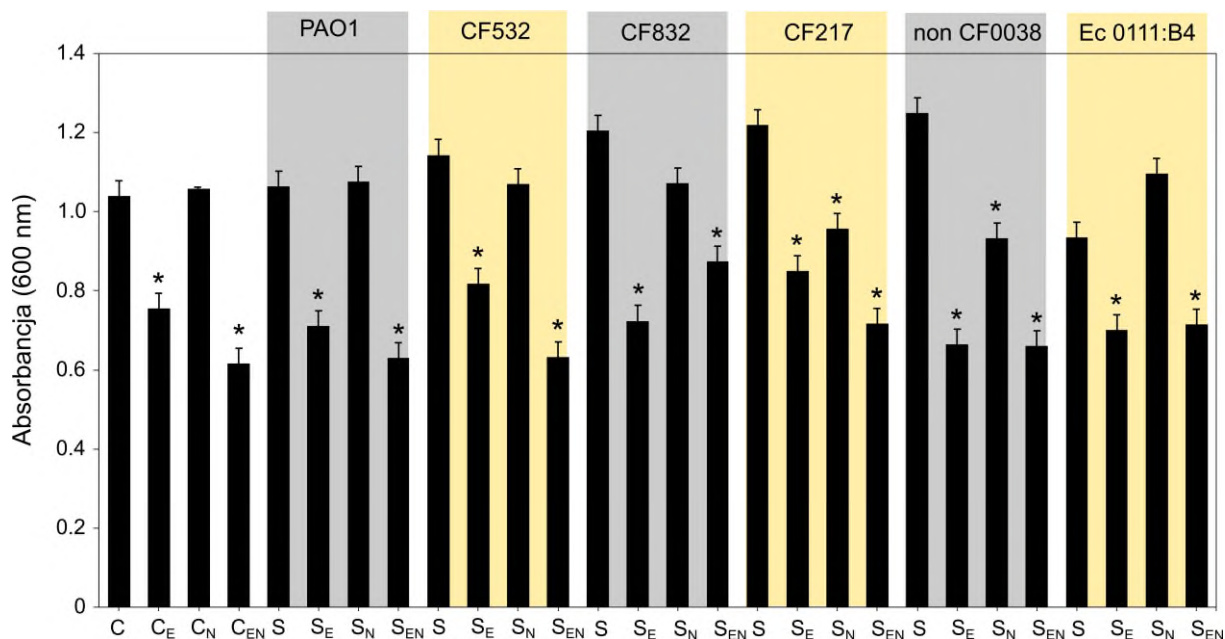
W wyniku braku nadprodukcji GSDMD w podłożach pochodowlanych komórek THP1-Null2 w obecności LPS-ów *P. aeruginosa* i *E. coli*, dodatkowo sprawdzono poziom IL-1 β metodą ELISA (Ryc. 17). Do badań wybrano podłoża pochodowlane na podstawie wyników uzyskanych metodą Western blot (Ryc. 16); supernatanty w których stwierdzono cięcie białka GSDMD do N-końca GSDMD w obecności LPS-u: PAO1, non-CF0038, *E. coli* 0111:B4 natywny i z nigerycyną; CF217 z nigerycyną i CF832. Rycina 17 pokazuje, że badane LPS-y mogą aktywować proces pyroptozy (produkcja IL-1 β) w komórkach THP1-Null2 w połączeniu z nigerycyną, a poziom aktywacji zależy od struktury i pochodzenia gatunkowego LPS-u.



Rycina 17. Poziom IL-1 β w podłożu pochodowlanym komórek THP1-Null2 po traktowaniu LPS-ami *P. aeruginosa* lub *E. coli*. Analizę statystyczną danych przeprowadzono za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem post-hoc Dunnetta. * p<0,05, **p<0,001, ***p<0,0001.

6.2.2.3.5. Ocena właściwości przeciwbakteryjnych endolizyny w obecności podłoża pochodowlanych THP1-Null2 po stymulacji pyroptozy LPS-em

Działanie przeciwbakteryjne endolizyny w obecności supernatantów po hodowli komórkowej THP1-Null2 otrzymanych po stymulacji LPS-ami i endolizyną sprawdzono wobec szczepu PAO1 *P. aeruginosa* poprzez pomiar gęstości optycznej hodowli bakteryjnej przy 600 nm. Rycina 18 przedstawia spadek gęstości optycznej dla pożywki pochodowlanej zawierającej endolizynę (CE) w stosunku do kontroli (C), dodatkowo wzmocniony stymulacją komórek poprzez nigerycynę (C_{EN}) niczym nie traktowaną w odniesieniu do kontroli zawierającej same bakterie, co wskazuje na obecność gazderminy w kontroli po hodowli komórkowej. Nie zaobserwowano wzmocnienia efektu przeciwbakteryjnego po stymulacji komórek LPS-ami.

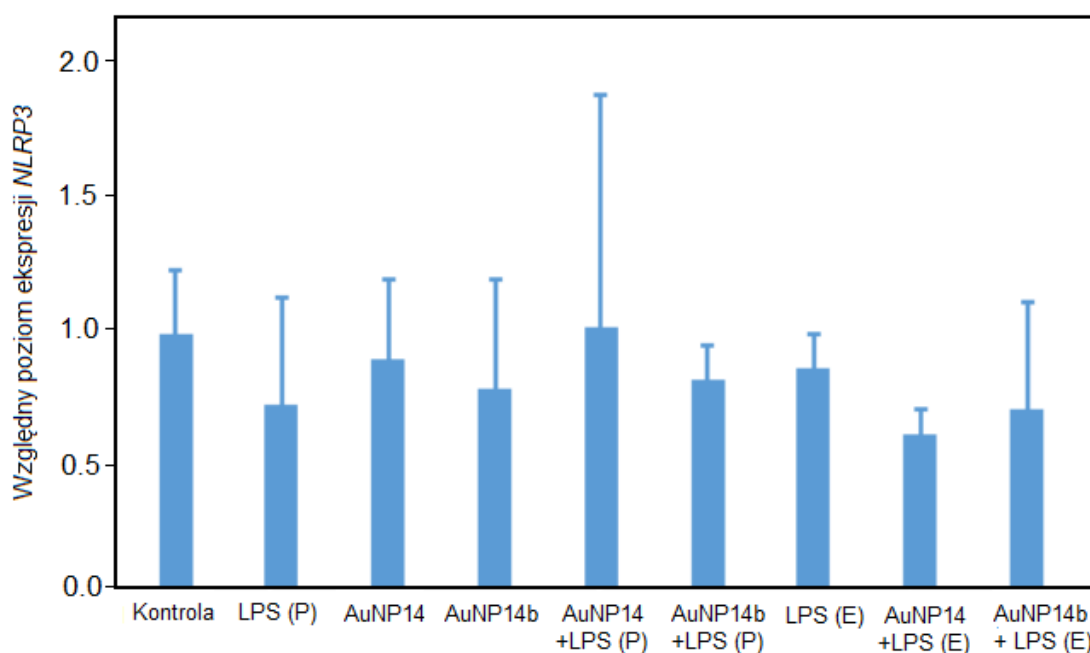


Rycina 18. OD wzrostu szczepu PAO1 *P. aeruginosa* mierzone przy 600 nm w pożywce pochodzącej z linii THP1-Null2 wstępnie potraktowanej LPS-ami w stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$ i/lub 10 μM nigerycyny (N) oraz uzupełnionej 36 $\mu\text{g/ml}$ endolizyną KP27 (E). C - medium pochodzące THP1-Null2, C_E - medium pochodzące THP1-Null2 z endolizyną, C_N – medium pochodzące THP1-Null2 po stymulacji nigerycyną, C_{EN} - medium pochodzące THP1-Null2 po stymulacji nigerycyną uzupełnione endolizyną, S – supernatant pochodzący po stymulacji komórek LPS-em. Analizę statystyczną danych przeprowadzono za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem post-hoc Dunnetta. * $p < 0,05$.

6.2.3. Efekt dendrytycznych nanocząstek złota na aktywację procesu pyroptozy

6.2.3.1. Poziom ekspresji *NLRP3* w obecności dendrytycznych nanocząstek złota oraz LPS-u zmierzony RT-qPCR

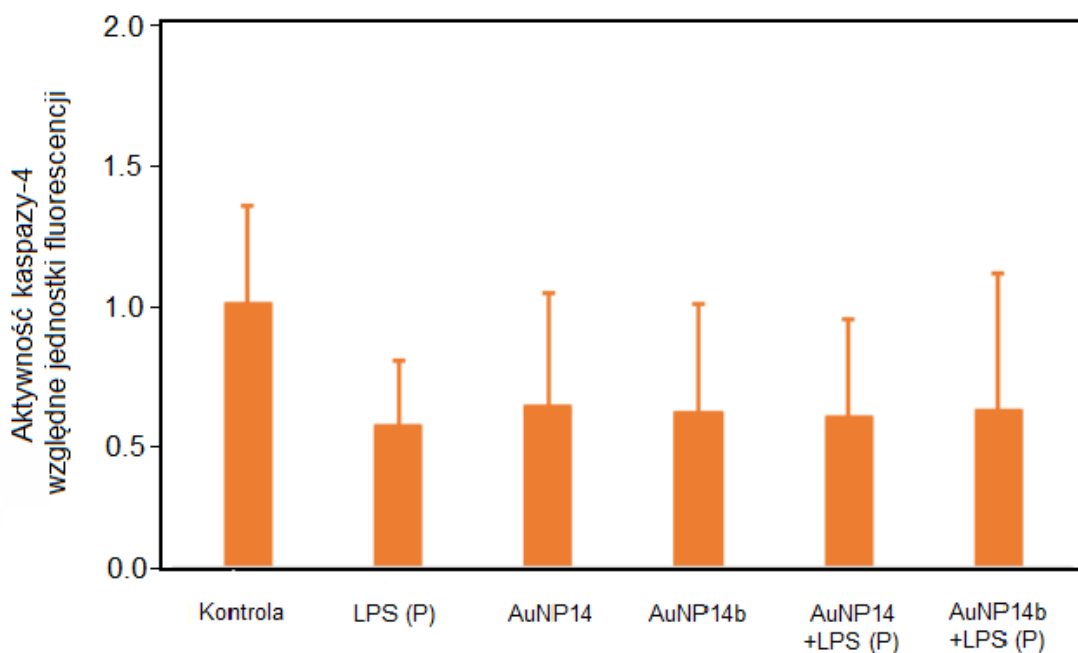
Efekt natywnych nanocząstek AuNP14 i ich analogu AuNP14b (połowa dendronów zastąpiona łańcuchami PEG), dodatkowo modulowany LPS-em *E. coli* lub *P. aeruginosa* na indukcję procesu pyroptozy w komórkach THP-1 oceniono metodą RT-qPCR. Nie stwierdzono zmiany poziomu ekspresji genu kodującego domenę pirynową rodziny receptorów NLR tj. *NLRP3* w obecności badanych LPS-ów i/lub nanocząstek AuNP14 (Ryc. 19). Wynik ten potwierdziły badania Xie i in. [95], którzy wykazali, że aktywacja inflamasomu występuje na poziomie aktywnego białka obecnego w cytozolu, a nie na poziomie jego transkrypcji.



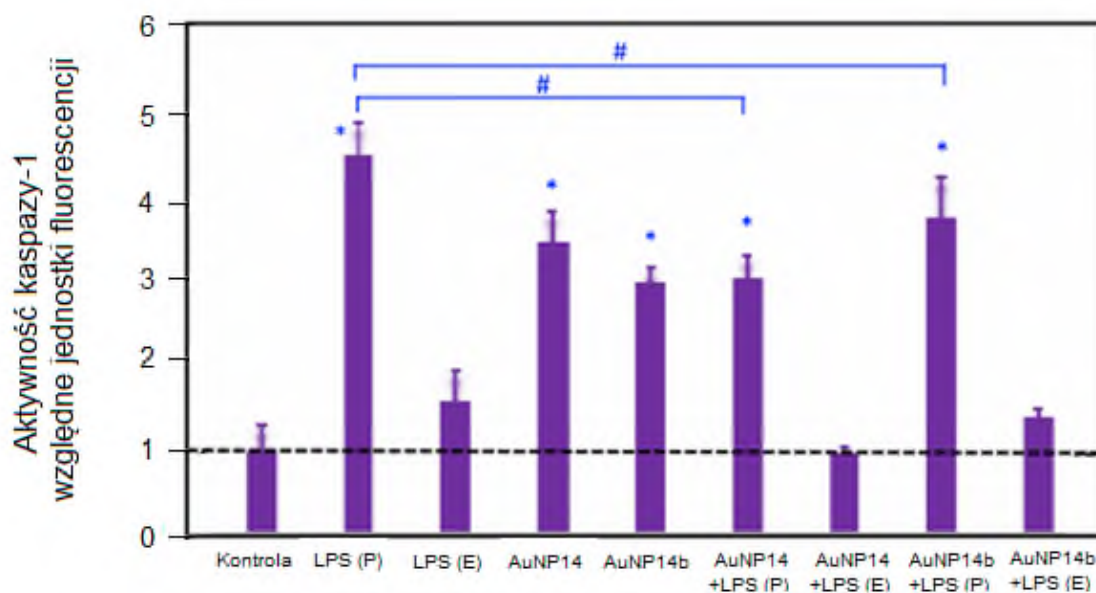
Rycina 19. Poziom ekspresji *NLRP3* w komórkach THP-1 po traktowaniu LPS-em *P. aeruginosa* (P), *E. coli* LPS (E) i/lub AuNP14 lub AuNP14b określony za pomocą ilościowej analizy PCR w czasie rzeczywistym (RT-qPCR). Poziom ekspresję *NLRP3* znormalizowano wobec *ACTB* ze względną oceną ilościową określoną metodą $\Delta\Delta CT$.

6.2.3.2. Ocena spektrofotometryczna aktywacji kaspazy -1 i -4 przez dendrytyczne nanocząstki złota oraz LPS

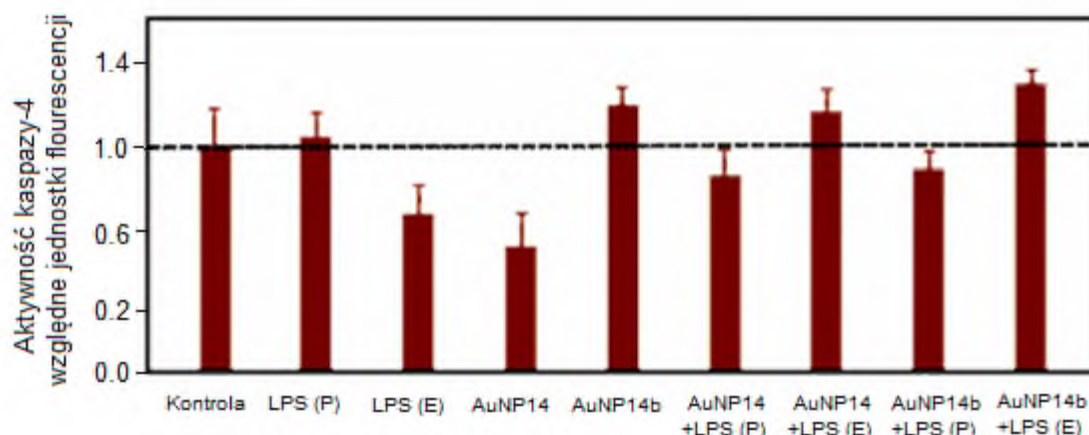
Aby dodatkowo zweryfikować czy dendrytyczne nanocząsteczki AuNP i/lub LPS aktywują inflamasom, oceniono poziom aktywacji kaspazy-1 i -4 w komórkach THP-1. Stwierdzono, wzrost aktywność kaspazy-1 (Ryc. 21), która była największa w przypadku samego LPS-u *P. aeruginosa* sugerując tym samym aktywację kanonicznego szlaku pyroptozy. Natomiast nie zaobserwowano zmian aktywności kaspazy-4 zmierzonej zarówno po 4 godzinach (Ryc. 20) jak i po 24 godzinach po inkubacji z AuNP i/lub LPS-em (Ryc. 22).



Rycina 20. Aktywność kaspazy-4 po 4 godzinnej inkubacji komórek THP-1 LPS-em *P. aeruginosa* O10 w obecności dendrytycznych nie-PEGyloowanych (AuNP14) i PEGyloowanych (AuNP14b) AuNP. * $p < 0,05$ (analiza w stosunku do kontroli); # $p < 0,05$.



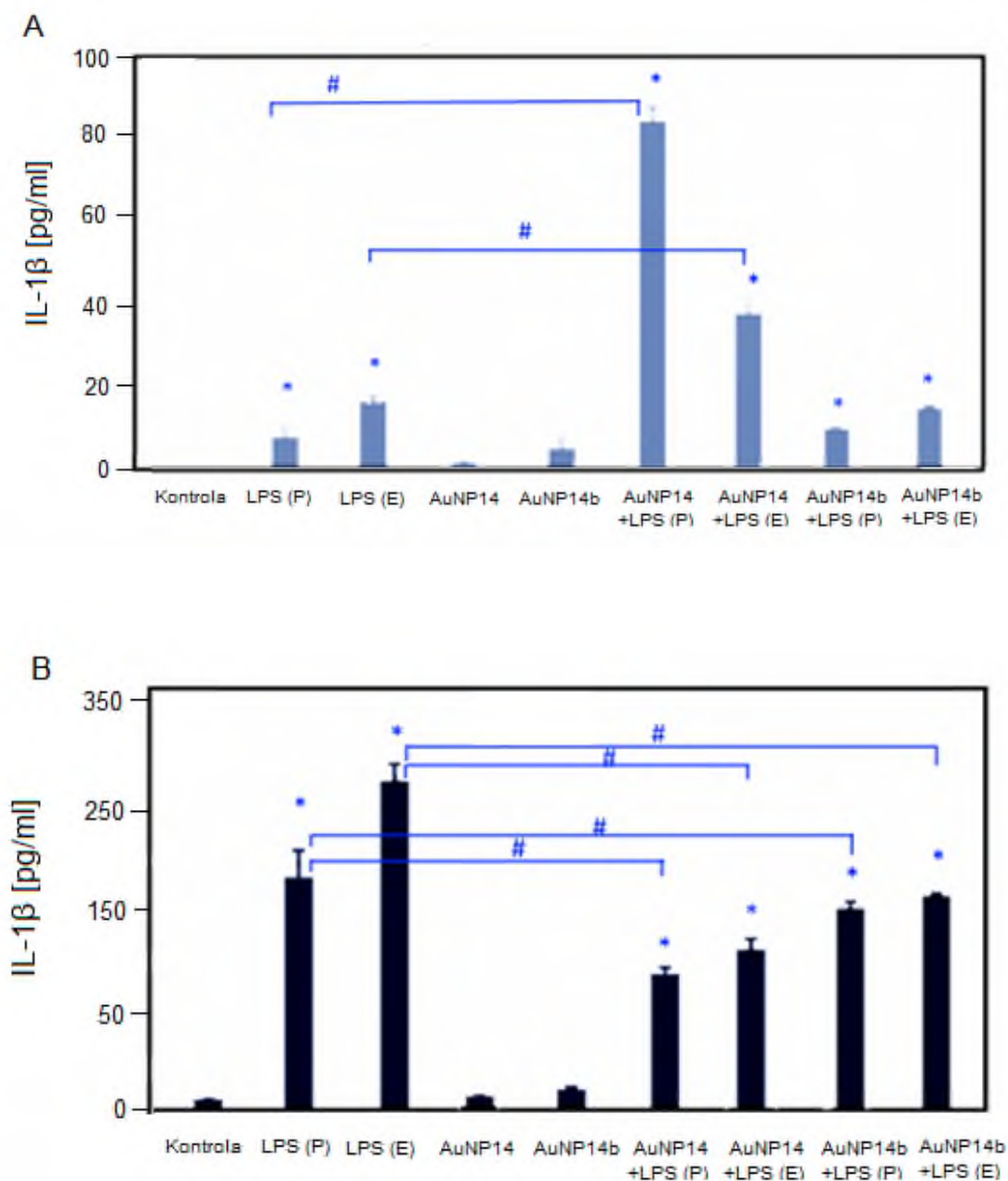
Rycina 21. Wpływ LPS-u *P. aeruginosa* (P) i *E. coli* (E) oraz dendrytycznych nie-PEGyloowanych (AuNP14) i PEGyloowanych (AuNP14b) AuNP na aktywację kaspazy-1 w komórkach THP-1 po 24 godzinach. * $p < 0,05$ (analiza w stosunku do kontroli); # $p < 0,05$.



Rycina 22. Wpływ LPS-u *P. aeruginosa* (P) i *E. coli* (E) oraz dendrytycznych nie-PEGyloowanych (AuNP14) i PEGyloowanych (AuNP14b) AuNP na aktywację kaspazy-4 w komórkach THP-1 po 24 godzinach. * $p < 0,05$ (analiza w stosunku do kontroli); # $p < 0,05$.

6.2.3.3. Ocena produkcji interleukiny IL-1 β i IL-18 w obecności dendrytycznych nanocząstek złota oraz LPS-u

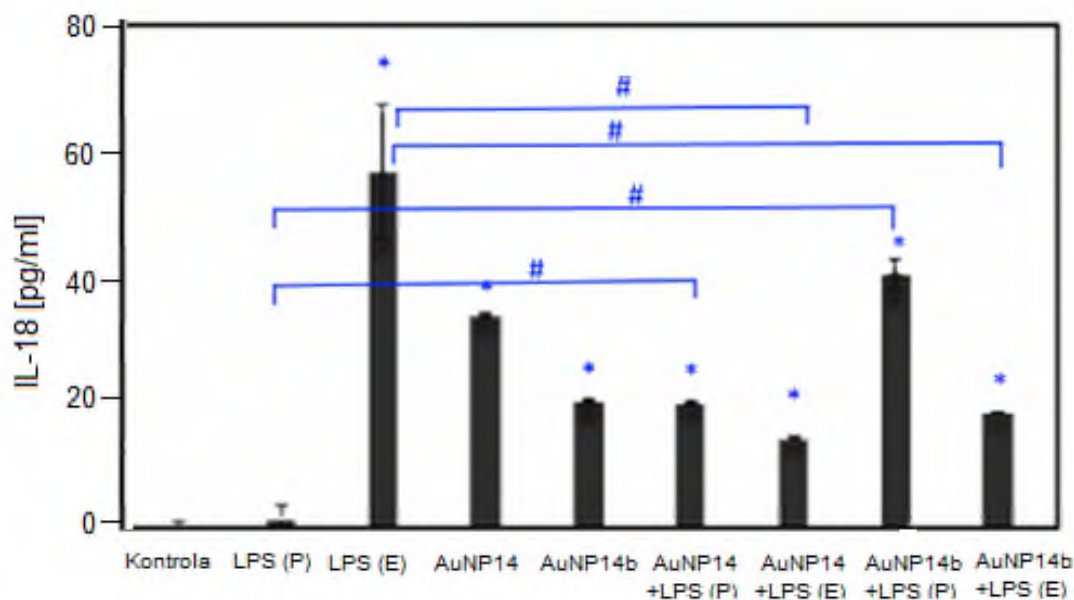
Kolejnym etapem badań była ocena wpływu AuNPs i/lub LPS-u na poziom IL-1 β (marker aktywacji pyroptozy) zarówno w medium pochodzonym (Ryc. 23A), jak i lizatach komórkowych THP-1 (Ryc. 23B). Stwierdzono, że użyte w badaniach LPS-y aktywują produkcję i uwolnienie IL-1 β do medium hodowlanego komórek THP-1 w przeciwieństwie do nanocząstek AuNP14 i AuNP14b. Jednak traktowanie komórek jednocześnie AuNP14 i LPS-em spowodowało kilkukrotny wzrost stężenia IL-1 β , zwłaszcza w przypadku nanocząstek AuNP14 tj. nie modyfikowanych powierzchniowo za pomocą PEG-u (Ryc. 23A). Podobny efekt zaobserwowano w przypadku lizatów komórek THP-1, przy czym ogólny poziom IL-1 β był znacząco wyższy niż w medium pochodzonym (Ryc. 23B).



Rycina 23. Produkcja interleukiny IL-1 β w obecności LPS-u *P. aeruginosa* (P) i *E. coli* (E) oraz dendrytycznych nanocząstek złota nie-PEGyłowanych (AuNP14) i PEGyłowanych (AuNP14b) AuNP) w komórkach THP-1. Poziom produkcji IL-1 β zmierzono w (A) medium pohodowlanym oraz (B) lizatach komórkowych z użyciem test ELISA. * $p < 0,05$ (analiza w stosunku do kontroli); # $p < 0,05$.

Następnie oceniono poziom produkcji IL-18 w obecności nanocząstek AuNPs i/lub LPSów *E. coli* i *P. aeruginosa* przez komórki THP-1. Główną funkcją IL-18 jest indukowanie wydzielania interferonu- γ (IFN- γ) przez pomocnicze limfocyty T (Th1) (Esmailbeig and Ghaderi, 2017). Ponadto IL-18 jest wydzielana przez wiele typów komórek stymulowanych

LPS-em (Nakano et al., 2003; Tsutsui et al., 1999). Tak więc, ekspresję IL-18, mierzono jedynie w medium pochodzonym z komórek THP-1 (Ryc. 24).



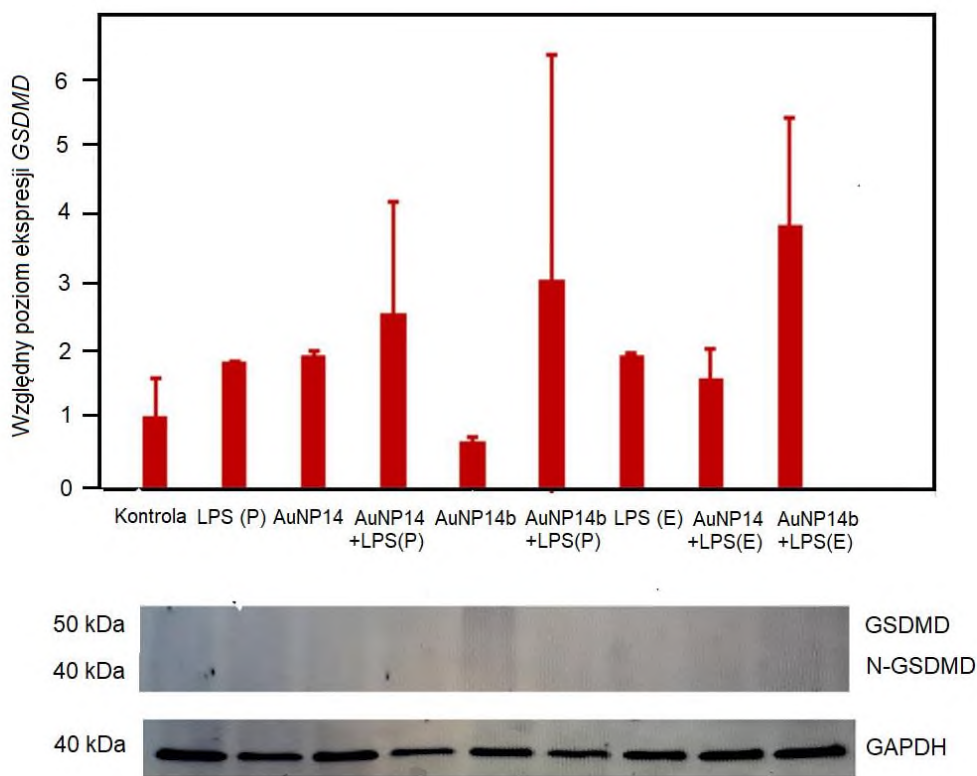
Rycina 24. Produkcja IL-18 w obecności LPS-u *P. aeruginosa* (P) i *E. coli* (E) oraz dendrytycznych nanocząstek złota nie-PEGylowanych (AuNP14) i PEGylowanych (AuNP14b) AuNP w w medium pochodzonym z komórek THP-1 zmierzona testem ELISA. * $p < 0,05$ (analiza w stosunku do kontroli); # $p < 0,05$.

Największy poziom produkcji IL-18 stwierdzono w przypadku LPS *E. coli*, niższy w przypadku nanocząstek złota. Nie stwierdzono stymulacji produkcji IL-18 przez LPS *P. aeruginosa* w stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$. Podobnie jak w przypadku produkcji IL-1 β i IL-18, poziom ekspresji IL-18 był wyższy w obecności nie-PEGylowanych nanocząstek w porównaniu z PEGylowanymi. Efekt mieszaniny nanocząstek złota/LPS na produkcję IL-18 był znacząco słabszy niż każdego ze składników osobno.

6.2.3.4. Analiza ekspresji GSDMD w obecności dendrytycznych nanocząstek złota oraz LPS-u zmierzona ilościowym PCR w czasie rzeczywistym i Western blot

Analiza ekspresji gazderminy D (GSDMD) w obecności dendrytycznych nanocząstek złota oraz LPS-ów zmierzona zarówno na poziomie genetycznym oraz produkcji białka

wykazała brak jego ekspresji w komórkach THP-1 (Ryc. 25). Zaobserwowane różnice w poziomie ekspresji mRNA kodującego gazderminę D były nieistotne statystycznie.



Rycina 25. Górny panel: analiza poziomu ekspresji mRNA *GSDMD* w liniach komórkowych THP-1 przed (kontrola) i po traktowaniu LPS-em z *P. aeruginosa* (LPS (P)), LPS z *E. coli* (LPS (E)) i/lub AuNP. Poziomy ekspresji określono za pomocą ilościowej analizy PCR w czasie rzeczywistym. Gen *ACTB* zastosowano jako wewnętrzny gen referencyjny, a metodę $\Delta\Delta CT$ zastosowano do względnej oceny ilościowej. Dolny panel: analiza Western Blot, gdzie białko GAPDH zastosowano jako kontrolę. Brak widocznych prążków odpowiadających białku GSDMD (około 50 kDa) i jej N-końcowi (około 35-40 kDa).

7. Dyskusja

Celem badań była ocena nowych metod permeabilizacji zewnętrznej błony komórkowej bakterii Gram-ujemnych, jako wspomagających działanie bakteriofagowej rekombinowanej endolizyny KP27 faga Klebsiella. Oceniono aktywność przeciwbakteryjną endolizyny faga KP27 wobec szczepów PAO1, Δ rmd, Δ waaL, Δ wbpL *P. aeruginosa* w obecności dendrymerów polikationowych tj. glikodendrymerów oraz efekt dendrytycznych nanocząstek złota i lipopolisacharydów *P. aeruginosa* O10, PAO1, CF532, CF832, CF217, non-CF0038 oraz *E. coli* 0111:B4 i 055:B5 na aktywację procesu pyroptozy jako mechanizmów wspomagających aktywność przeciwbakteryjną endolizyny wobec *P. aeruginosa*.

Wyniki wykazały właściwości przeciwbakteryjne dendrymerów poli(propylenoiminowych) wobec bakterii Gram-ujemnych, do czego przyczynił się skład powierzchniowy dendrymerów PPI i ich użyte stężenie. Mieszanina dendrymerów poli(propylenoiminowych) zmodyfikowanych maltozą ze rekombinowanym białkiem faga wzmacniały działanie przeciwbakteryjne endolizyny KP27 przeciwko PAO1 typu dzikiego i jego mutantom, w przeciwieństwie do samych obu składników i endolizyny połączonej z dendrymerami PPI niemodyfikowanych maltozą. Wiadomo, że większość polikationowych dendrymerów (poli(propylenoiminowych) (PPI) w tym metalodendrymerów wykazuje działanie przeciwbakteryjne wobec bakterii Gram-ujemnych w stężeniach powyżej 10 μ M [35,36]. Przyłączenie jednostek cukrowych, powoduje zwiększenie ich hydrofilowości, ale nie zaburza ładunku dodatniego, dzięki któremu poprzez oddziaływania elektrostatyczne z resztami fosforanowymi lipidów błonowych [37] dochodzi do adsorpcji na OM ściany komórkowej bakterii, i zwiększenia jej przepuszczalności [96]. Poza tym dendrymery zmodyfikowane maltozą mają mniej ładunków kationowych, które sprzyjały wiązaniu z LPS-em i/lub lektyną obecną w ścianie komórkowej *P. aeruginosa*. Efekt ten uzyskano za pośrednictwem dendrymerów przy niskim stężeniu niecytotoksycznym (12 μ M) dla komórek ludzkich. Potwierdzono również, że dendrymery PPI -OS modyfikowane maltozą w stężeniu 50 μ M również nie wykazywały toksycznego działania przeciwko komórkom eukariotycznym [40]. Natomiast same dendrymery bez maltozy w stężeniu 50 μ M prowadziło do utraty interakcji dendrymer-białko. Należy jednak wspomnieć, że żaden z użytych dendrymerów nie powodowały zmian w strukturze endolizyny w temperaturze fizjologicznej. Natomiast wyraźnie widać, iż dendrymery bez maltozy w znacznie niższej temperaturze powodowały degradację białka w porównaniu do dendrymerów maltozowych. Wydaje się że, przyczyną takiego efektu jest nierówna ilość dodatnio naładowanych grup aminowych

obecnych na powierzchni makrocząsteczki, gdzie dendrymery PPI posiadają więcej grup kationowych, natomiast ładunek PPI-OS jest częściowo zneutralizowany przez maltozę, a co za tym idzie może to być przeszkodą dla prawidłowego działania antybakteryjnego endolizyny, gdzie dendrymery PPI utrudniły działanie endolizyny, natomiast dendrymery PPI-OS nie zaburzały jej działania. Wskazuje to, że właściwości antybakteryjne dendrymerów kationowych zależą od modyfikacji powierzchni dendrymerów przez maltozę, co może promować oddziaływanie elektrostatyczne z błoną zewnętrzną komórek bakteryjnych, która jest naładowana ujemnie i posiada lektyny na powierzchni. Uzyskane wyniki badań odpowiadają wcześniejszym wynikom opublikowanym przez Ciołkowskiego i wsp., którzy opisują oddziaływanie poli(propylenoiminowych) dendrymerów z innymi białkami, gdzie cukrowa modyfikacja PPI minimalizowała siłę oddziaływania z kationowymi i anionowymi białkami prowadząc do całkowitego zubożenia ich ładunku i tym samym do osłabienia oddziaływania tych dendrymerów z lizozymem [97]. Możemy zatem stwierdzić, że dendrymery PPI-OS mogą pomóc w destabilizacji zewnętrznej błony bakteryjnej i umożliwić endolizynie dotarcie do peptydoglikanu. Obecnie wykorzystuje się również endolizynę w konjugatach z chitozaniem w celu zwiększenia jej właściwości bakterioobójczych [98,99]. Abbasi i wsp. [98] wykazali synergistyczne oddziaływanie i zdolność redukcji biofilmu nanokompleksów z endolizyną wobec szczepów *E. coli*, *S. aureus* i *P. aeruginosa*. Wyniki wykazały aktywność lityczną nanokompleksów po 24 i 48 godzinach traktowania, zwłaszcza w przypadku *P. aeruginosa*. Dzuvor i wsp. [100] zaprojektowali natomiast kompleksy endolizyny z peptydami, które tworzą tzw. *self-assembled endolysin nanoparticles*. W ich badaniach endolizyna w takiej konfiguracji wykazywała zwiększoną stabilność termiczną (do 65°C) podczas przechowywania oraz powodowała rozległe uszkodzenia ścian komórkowych bakterii *S. aureus*.

Kojeny etap badań dotyczył oceny wpływu kationowych, dendronizowanych nanocząstek złota na aktywację odpowiedzi immunologicznej w komórkach THP-1, poprzez analizę poziomu interleukin oraz gazderminy D jako czynnika permeabilizującego błonę bakteryjną. W tym celu zastosowano dendrytyczne nanocząstki złota oraz LPS. Badania pokazały, że zarówno LPS, jak i AuNP są zdolne do aktywacji uwalniania prozapalnych cytokin charakterystycznych dla procesu pyroptozy w linii komórkowej THP-1, bez zmiany w poziomie ekspresji białka gazderminy D. Może to być spowodowane destabilizacją błony komórkowej przez te nanocząstki. Mechanizm działania nanocząstek metali opiera się na adsorpcji układów kationowych na ujemnie naładowanej powierzchni komórki bakteryjnej,

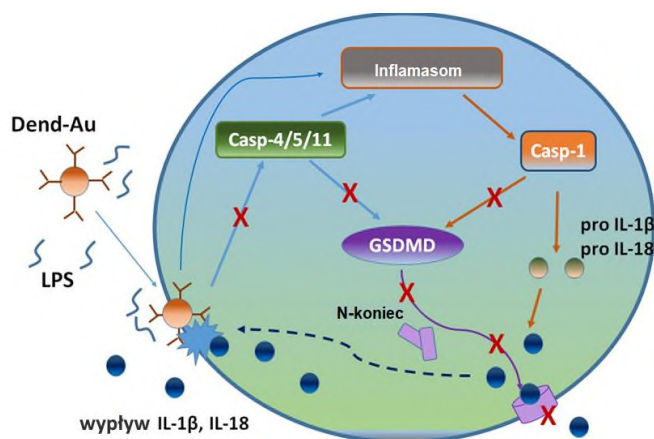
dyfuzją przez ścianę komórkową oraz wiązaniu z błoną cytoplazmatyczną prowadzącą do jej degradacji [101]. Ponadto, nanocząsteczki w tym nanomateriały należące do egzogennych czynników aktywujących odpowiedź zapalną organizmu zaczęto nazywać wzoracmi molekularnymi związanymi z nanocząstkami (NAMP), które są zdolne do aktywacji inflamasomu NLRP3. Zapalenie wywołane przez NAMP jest określane ponadto zapaleniem sterylnym występującym pod nieobecność patogenów [66].

Dodatkowo AuNP mogą tworzyć kompleksy z LPS-em w roztworze, wpływając zarówno na aktywność samych NP, jak i na aktywację odpowiedzi immunologicznej przez LPS. Otrzymane wyniki sugerują, że za destabilizację błony komórkowej odpowiadają AuNP, zwłaszcza ich nie-PEGyłowane analogi, o wyższym dodatnim ładunku powierzchniowym, umożliwiając w ten sposób wypływ cytokin przy braku rozszczepienia gazderminy D. Dendrytyczne AuNP mogą wywoływać reakcje zapalne podobne do pyroptozy i wzmacniać odpowiedź w obecności bakteryjnych LPS-ów, jednak PEGylacja dendrytycznych AuNP może zmniejszać te efekty. Otrzymane wyniki pokazujące zmniejszony ogólny efekty mieszanin nanocząstek z LPS-em (zwłaszcza niePEGyłowanego AuNP14) sugerują, że dendrytyczne AuNP są zdolne do tworzenia kompleksów z LPS-em *P. aeruginosa* i *E. coli* w roztworze, wpływając zarówno na aktywność samych nanocząsteczek, jak i na aktywację odpowiedzi immunologicznej. Takie zależności przedstawili w swoich badaniach również Li i wsp., w których zdolność wiązania nanocząstek złota do LPS-u była zależna od dawki i czasu. AuNP pokryte LPS-em w przeciwieństwie do samych NP wolnych od LPS-u były zdolne do indukcji odpowiedzi zapalnej. Wolny LPS aktywował również odpowiedź przeciwzapalną w przeciwieństwie do jego formy związanej z NP [102].

Wyniki te dostarczają informacji na temat indukcji stanu zapalnego przez nanocząstki metali [45,55,65,103] w tym zwiększoną aktywność kaspazy-1 i zwiększoną ekspresję IL-18. Nanocząstki metali mogą wywoływać reakcje zapalne podobne do pyroptozy lub samą pyroptozę i zwiększoną produkcję IL-1 β na co zwrócili wcześniej w swych badaniach uwagę Mirshafiee i wsp., Liu i wsp. czy też Huang i wsp. [45,55,104] i mogą wzmacniać tą odpowiedź w obecności bakteryjnych LPS-ów. Obecnie poszukuje się nanocząstek metali aktywujących pyroptozę w celu niszczenia komórek nowotworowych [105–108]. Dla przykładu Yu i wsp. [108], z powodzeniem zsyntetyzowali nanocząstki zeolitu, które były ukierunkowane na dostarczanie leków przeciwnowotworowych. Wykazali oni, że nanocząstki ZTC@M mają dobrą biokompatybilność, zdolność celowania i efekt terapeutyczny. Co

więcej, synergiczna terapia sonodynamiczna z chemioterapią może indukować pyroptozę komórek raka żołądka i działać przeciwnowotworowo *in vivo* i *in vitro*.

Wyniki uzyskane w pracy, w tym brak aktywacji gazderminy nie pozwalają jednak na wykorzystanie tego procesu tj. pyroptozy do zwiększenia aktywności bójczej endolizyny jednak mogą zwiększyć aktywację układu immunologicznego przez co pośrednio wpływać na efekt przeciwbakteryjny. Na rycinie 26 przedstawiono proponowany mechanizm działania AuNP w obecności LPS-u. Zarówno LPS, jak i dendronizowane AuNP mogą aktywować uwalnianie cytokin prozapalnych indukujących pyroptozę w ludzkiej linii komórek szpikowych, bez indukcji rozszczepienia gazderminy D. Wpływ cytokin z komórek może być spowodowany zaburzeniem integralności błony plazmatycznej przez zdendronizowane AuNP. Dodatkowo, AuNP mogą tworzyć kompleksy z LPS-em w roztworze, wpływając zarówno na aktywność samych NP, jak i na aktywację odpowiedzi immunologicznych przez LPS.



Rycina 26. Proponowany mechanizm działania dendrytycznych AuNP w obecności LPS-u (Kuc-Ciepluch et al., 2022).

Kolejnym etapem badań była ocena indukcji pyroptozy jako możliwego mechanizmu przeciwbakteryjnego do zwiększenia aktywności enzymatycznej endolizyny przez główne białko pyroptozy, gazderminę D i jej N-koniec. W tym celu zbadano bezpośrednią przepuszczalność zewnętrznej błony bakteryjnej dwóch szczepów *P. aeruginosa* PAO1 i Δ wbpL przy użyciu rekombinowanego białka gazderminy D i jej N-końca uzyskanego po inkubacji z kaspazą-4 w połączeniu z fagową endolizyną, potencjalnym narzędziem do trawienia warstwy peptydoglikanu komórki bakteryjnej. Podobnie, jak w pracy Mulvihill i wsp., zaobserwowano zmianę przepuszczalności błony komórkowej po traktowaniu N-

końcem białka GSDMD uzyskany po cięciu za pomocą kaspazy- 1, -4 czy-5 [109]. W przypadku układu złożonego z endolizyny i gazderminy-D lub jej N-końca zaobserwowano zwiększenia efektu bójczego, zwłaszcza wobec mutantu szorstkiego $\Delta wbpL$. Wyniki te wskazują, że mechanizm działania związany z tworzeniem porów w błonie komórkowej zależy od gazderminy D, co warunkuje transport endolizyny umożliwiający degradację peptydoglikanu. Ponadto, otrzymane wyniki sugerują, że LPS odgrywa kluczową rolę w interakcji między białkami i błoną bakteryjną, blokując interakcję GSDMD z jej składnikami.

Do powyższej analizy warto dodać, iż bakteriobójcze działanie gazderminy zostało już opublikowane w kilku artykułach np. działanie przeciwko *Burkholderia cenocepacia* [110], *Staphylococcus aureus* [111] czy też *Streptococcus pneumoniae* [112]. Jednakże w żadnych z tych badań nie znajdziemy bezpośredniego dowodu na to, że gazdermina D wpływa z komórki i powoduje perforację błony bakteryjnej. Chociaż dowody na to, że GSDMD można znaleźć w supernatantach komórek pyroptycznych wykazał już w swojej pracy Tsuchiya i wsp [113].

Aby sprawdzić, czy można uzyskać ten sam efekt poprzez aktywację pyroptozy, przeprowadzono badania z wykorzystaniem różnych form strukturalnych LPS-u *P. aeruginosa* (O10, PAO1, CF532, CF708, CF832, CF217, non-CF0038) i *E. coli* (0111: B4) wobec eukariotycznych linii komórkowych. W pierwszej kolejności zbadano ekspresję genu *GSDMD* w komórkach THP1-Xblue indukowaną przez LPS *P. aeruginosa* O10 w stężeniach 0,001 - 1 $\mu\text{g/ml}$. Stwierdzono, że LPS w stężeniach 0,1 $\mu\text{g/ml}$ i 1 $\mu\text{g/ml}$ indukował produkcję GSDMD, co potwierdzono w badaniach Eder i wsp. [114]. Pozwoliło to na wybór stężeń LPS-u do dalszej części badań. Analizy transkryptomyczne efektu LPS-u wobec linii komórkowych wykazały wzrost ekspresji genów związanymi z odpowiedzią immunologiczną jedynie w komórkach linii komórkowej THP1-Xblue [109]. Analiza wpływu LPS-u na THP1-Xblue wykazała GO dla funkcji molekularnych (394 genów dla GO: aktywność katalityczna, wiązanie, aktywność aktywatora receptora sygnalizacyjnego, aktywność regulatora transkrypcji), procesów biologicznych (401 genów dla terminów GO: reprodukcja, proces układu odpornościowego, proces metaboliczny, proces komórkowy, proces reprodukcyjny, adhezja biologiczna, sygnalizacja, wielokomórkowy proces organizmu, proces rozwojowy, lokomocja, proces biologiczny międzygatunkowy, interakcja między organizmami, lokalizacja, proces wieloorganizmowy, regulacja biologiczna, reakcja na bodziec, która obejmuje GO szczególnie nas interesujące m.in. odpowiedź komórkową na lipopolisacharyd (GO:0071222), odpowiedź obronna na bakterie Gram-ujemne (GO:0050829), odpowiedź

immunologiczną (GO:0006955), odpowiedź zapalną (GO:0006954,) i komponentem komórkowym (257 genów dla GO: kompleks zawierający białko, komórkowa jednostka anatomiczna). Największe zmiany w ekspresji genów dotyczyły tych genów, które są związane z odpowiedzią komórkową i zapalną na bakteryjny LPS, w tym wysoki poziom ekspresji specyficznej dla pyroptozy interleukiny IL-1 β , gdzie jak wiadomo pod wpływem indukcji pyroptozy cytokina ta uwalnia się na zewnątrz komórki i co było już opisane w wielu pracach [76,77,83,115].

Podsumowując tą część badań, gazdermina D umożliwia permeabilizację błony komórkowej, co wzmacnia aktywność bójczą endolizyny i co pokazały badania z użyciem rekombinowanych białek. Jednak naturalna indukcja gazderminy na drodze pyroptozy przez bakteryjny LPS nie wzmacnia efektu endolizyny, co może być związane z regulacją procesu pyroptozy. Zbyt silna indukcja białek permeabilizujących w trakcie odpowiedzi immunologicznej na drodze pyroptozy w obecności LPS-u może być zjawiskiem cytotoksycznym dla komórek. Wyniki sugerują, że niskie stężenie N-końca GSDMD i jego słabe działanie przeciwbakteryjne może być związane ze stężeniem zastosowanych LPS-ów [116,117].

8. Wnioski

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że:

- Dendrymer poli(propylenoiminy) z maltozą wzmacnia działanie bójcze endolizyny KP27 przeciwko mutantom szorstkim i gładkim *P. aeruginosa* PAO1.
- Dendrytyczne nanocząski złota, zwłaszcza w obecności LPS-u, indukują produkcję kaspazy-1 i cytokin prozapalnych tj. IL-1 β i IL-18 w monocytach THP-1 bez aktywacji gazderminy.
- Rekombinowany N-koniec gazderminy D tworzy pory w zewnętrznej błonie komórkowej bakterii i wspomaga właściwości bójcze endolizyny. Nie zaobserwowano indukcji N-końca gazderminy D przez LPS na drodze pyroptozy w liniach komórek A549, BEAS-2B i HeLa, w przeciwieństwie do monocytów THP-1. Jednak poziom indukcji odpowiedzi immunologicznej przez LPS w komórkach THP-1 był zbyt niski, aby wspomóc efekt bójczy endolizyny KP27.

9. Streszczenie

Wzrost antybiotykooporności prowadzi do poszukiwania alternatywnych strategii eliminacji bakterii Gram-ujemnych. Istotnym problemem w dostarczaniu leków o potencjale klinicznym jest pokonywanie przez nie zewnętrznej błony bakteryjnej. Celem badań było poszukiwanie nowych alternatywnych metod permeabilizacji zewnętrznej błony komórkowej bakterii Gram-ujemnych, które mogłyby dodatkowo wspomóc działanie bakteriobójcze rekombinowanej endolizyny fagowej K27. Przepuszczalność błony zewnętrznej indukowano za pomocą kationowych dendrymerów modyfikowanych maltozą, dendrytycznych nanocząstek złota oraz za pomocą aktywacji naturalnego procesu pyroptozy. Pyroptoza jest odpowiedzią immunologiczną komórek eukariotycznych na składniki komórki bakteryjnej, głównie lipopolisacharyd, prowadzącą do wydzielania białka gazderminy D, co może spowodować permeabilizację błony komórkowej bakterii. Wykazano, że związki polikationowe destabilizują zewnętrzną błonę bakteryjną *P. aeruginosa*, wspomagając transport endolizyny do peptydoglikanu. Obserwowano, że nie tylko lipopolisacharyd bakteryjny jest główną przeszkodą dla silnie naładowanych kationowych dendrymerów w destabilizacji błony i dotarciu endolizyny, ale także modyfikacje powierzchniowe dendrymerów. Zmniejszenie ładunku dodatniego i stężenia w dendrymerach polipropylenowo-iminowych maltozy istotnie zwiększyło przeciwbakteryjne działanie endolizyny. Jednocześnie modyfikacja powierzchni dendrymerów prowadzi do zahamowania aktywności endolizyny w niższej temperaturze (<30°C) w porównaniu z dendrymerami niezmodyfikowanymi. W dalszych badaniach zastosowano nanocząstki złota w celu sprawdzenia, czy mogą one indukować proces pyroptozy. W tym celu wykorzystano linię komórkową THP-1. Dendrytyczne AuNP indukowały aktywność kaspazy-1 i zwiększały uwalnianie interleukiny IL-18 i IL-1 β bez indukowania rozszczepienia gazderminy D i tworzenia porów. Produkcja cytokin prozapalnych była widoczna głównie w obecności bakteryjnego LPS-u, chociaż ich wydzielanie obserwowano dopiero po podaniu dendrytycznych AuNP. Obserwacje te sugerują, że dendrytyczne AuNP mogą indukować mechanizmy zapalne podobne do pyroptozy, dodatkowo wzmacniane w obecności bakteryjnego LPS-u. Intensywność tego efektu zależała od modyfikacji powierzchni AuNP. Wyniki te wyraźnie sugerują, że charakter interakcji między NP i LPS-ami zależy od generacji dendronów i liczby łańcuchów PEG przyłączonych do ich powierzchni. To z kolei może wpływać na formę LPS-u obecną w środowisku i siłę wywołanej odpowiedzi zapalnej. Naturalną odpowiedź immunologiczną zbadano w kilku liniach komórkowych A549, HeLa,

THP1-Xblue2 i THP1-Null2 przy użyciu różnych typów LPS-ów pochodzących z *P. aeruginosa* oraz *E. coli*. Jednak po wynikach uzyskanych z mikromacierzy do dalszych badań wybrano monocytarne linie komórkowe. Analizy wykazały, że geny, które charakteryzowała nadekspresja w komórkach THP1-Xblue były powiązane z odpowiedzią immunologiczną na lipopolisacharyd, ale bez zmiany w ekspresji gazderminy D. Aby zweryfikować, czy LPS może aktywować pyroptozę, zidentyfikowano obecność białek GSDMD i IL-1 β . Oba wyniki wyraźnie wskazały, że bakteryjny LPS może aktywować proces pyroptozy i indukować cięcie GSDMD w obecności nigerycyny. Indukcja pyroptozy przez LPS *P. aeruginosa* jest znacznie słabsza w porównaniu do LPS-u *E. coli*. Nie zaobserwowano natomiast działania przeciwbakteryjnego medium pochodzącego komórek THP1-Null2 stymulowanych tymi LPS-ami i nigerycyną z endolizyną na szczepy *P. aeruginosa* PAO1 i Δ wbpL. Zbadano również bezpośrednią przepuszczalność zewnętrznej błony bakteryjnej dwóch szczepów *P. aeruginosa* PAO1 i Δ wbpL przy użyciu rekombinowanego białka gazderminy D i jego N-końca (uzyskany po inkubacji z kaspazą-4) w połączeniu z endolizyną faga. Na podstawie wyników stwierdzono, że LPS-y odgrywają kluczową rolę w interakcji między białkami a błoną bakteryjną. Badanie ekspresji białka gazderminy D w medium pochodzącym komórek liniach THP1-Null2 stymulowanych LPS-ami wobec *P. aeruginosa* PAO1, wykazało indukcję procesu w próbach kontrolnych. Efekt ten może świadczyć o nieindukowanym, bazowym poziomie produkcji gazderminy która jako modulująca odpowiedź immunologiczną, warunkuje jej skuteczność. Podsumowując tą część badań, gazdermina GSDMD umożliwia permeabilizację błony komórkowej, co wzmacnia aktywność bójcą endolizyny co wykazano w badaniach z użyciem rekombinowanych białek. Jednak indukcja gazderminy na drodze pyroptozy nie wzmacnia efektu endolizyny, co może być związane z regulacją procesu pyroptozy. Zbyt silna indukcja białek permeabilizujących w trakcie odpowiedzi immunologicznej na drodze pyroptozy w obecności LPS-u może być zjawiskiem cytotoksycznym dla komórek. Ich bezpieczny poziom jest jednak zbyt niski do wspomaganie efektu bójczego endolizyny wobec komórek bakteryjnych.

10. Summary

The increase of an antibiotic resistance leads to the search for alternative strategies of eliminate Gram-negative bacteria. An important problem in the delivery of drugs with clinical potential is their ability to cross the outer bacterial membrane. The aim of the research was the search for new alternative methods of permeabilization of the outer cell membrane of Gram-negative bacteria, which could additionally support the bactericidal effect of recombinant phage endolysin K27. The possibility increase permability of outer membrane was examined by used cationic maltose-modified dendrimers, dendritic gold nanoparticles and by activation of the natural proccess such as a pyroptosis. Pyroptosis is an immune response of eukaryotic cells to bacterial cell components, mainly lipopolysaccharide, leading to the secretion of gasdermin D protein, which may result in permabilization of the bacterial cell membrane. Polycationic compounds have been shown to destabilize the outer bacterial membrane of *P. aeruginosa*, aiding the transport of endolysin to the peptidoglycan. It has been observed that not only bacterial lipopolysaccharide is the main obstacle for highly charged cationic dendrimers to destabilize the membrane and reach endolysin, but also surface modifications of dendrimers. Reducing the positive charge and concentration in polypropylene-imine maltose dendrimers significantly increased the antibacterial effect of endolysin. At the same time, modification of the surface of dendrimers leads to the inhibition of endolysin activity at a lower temperature (<30°C) compared to unmodified dendrimers. In further studies, gold nanoparticles were used to test whether they could induce the pyroptosis process. For this purpose, the THP-1 cell line was used. Dendritic AuNPs induced caspase-1 activity and increased IL-18 and IL-1 β release without inducing gazdermin D cleavage and pore formation. The production of pro-inflammatory cytokines was evident mainly in the presence of bacterial LPS, although their secretion was observed only after administration of dendritic AuNPs. These observations suggest that dendritic AuNPs can induce pyoptosis-like inflammatory mechanisms further enhanced in the presence of bacterial LPS. The intensity of this effect depended on the AuNP surface modification. These results clearly suggest that the nature of the interaction between NPs and LPSs depends on the generation of dendrons and the number of PEG chains attached to their surfaces. This, in turn, may influence the form of LPS present in the environment and the strength of the inflammatory response elicited. The natural immune response was tested in several cell lines A549, HeLa, THP1-Xblue2 and THP1-Null2 using different types of LPS derived from *P. aeruginosa* and *E. coli*. However, after the results obtained from the microarray, monocytic cell lines were selected for further

research. Analyzes showed that genes that were overexpressed in THP1-Xblue cells were associated with an immune response to lipopolysaccharide, but no change in gasdermin D expression. To verify whether LPS could activate pyroptosis, the presence of GSDMD and IL-1 β proteins was identified. Both results clearly indicated that bacterial LPS can activate the pyroptosis process and induce GSDMD cleavage in the presence of nigericin. The induction of pyroptosis by *P. aeruginosa* LPS is much weaker compared to *E. coli* LPS. However, the antibacterial effect of the post-culture medium of THP1-Null2 cells stimulated with these LPSs and nigericin with endolysin on *P. aeruginosa* PAO1 and Δ wbpL strains was not observed. The direct permeability of the bacterial outer membrane of two strains of *P. aeruginosa* PAO1 and Δ wbpL was also tested using recombinant gasdermin D protein and its N-terminus (obtained after incubation with caspase-4) in combination with phage endolysin. Based on the results, it was concluded that LPS plays a key role in the interaction between proteins and the bacterial membrane. The study of gasdermin D protein expression in the post-culture medium of LPS-stimulated THP1-Null2 cells against *P. aeruginosa* PAO1 showed induction of the process in control samples. This effect may indicate a non-induced, base level of gasdermin production, which modulates the immune response and determines its effectiveness. To sum up this part of the research, gasdermin GSDMD will enable the permeabilization of the cell membrane, which enhances the killing activity of endolysin what has been shown in studies using recombinant proteins. However, the induction of gasdermin by pyroptosis does not enhance the effect of endolysin, which may be related to the regulation of the pyroptosis process. Too strong induction of permeabilizing proteins during the immune response by pyroptosis in the presence of LPS may be a cytotoxic phenomenon for cells. Their low, safe level, however, is too low to support the killing effects of endolysin against bacterial cells.

11. Piśmiennictwo

- [1] N. Qin, G. Xu, Y. Wang, X. Zhan, Y. Gao, Z. Wang, S. Fu, W. Shi, X. Hou, C. Wang, R. Li, Y. Liu, J. Wang, H. Zhao, X. Xiao, Z. Bai, Bavachin enhances NLRP3 inflammasome activation induced by ATP or nigericin and causes idiosyncratic hepatotoxicity, *Front. Med.* 15 (2021) 594–607. doi:10.1007/s11684-020-0809-2.
- [2] S. Chevalier, E. Bouffartigues, J. Bodilis, O. Maillot, O. Lesouhaitier, M.G.J. Feuilloley, N. Orange, A. Dufour, P. Cornelis, Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins, (2017) 698–722. doi:10.1093/femsre/fux020.
- [3] B. Jubeh, Z. Breijyeh, R. Karaman, Resistance of gram-positive bacteria to current antibacterial agents and overcoming approaches, *Molecules.* 25 (2020). doi:10.3390/molecules25122888.
- [4] S. Wahab, T. Khan, M. Adil, A. Khan, Mechanistic aspects of plant-based silver nanoparticles against multi-drug resistant bacteria, *Heliyon.* 7 (2021) e07448. doi:10.1016/j.heliyon.2021.e07448.
- [5] M. Chatterjee, C.P. Anju, L. Biswas, V. Anil Kumar, C. Gopi Mohan, R. Biswas, Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options, *Int. J. Med. Microbiol.* 306 (2016) 48–58. doi:10.1016/j.ijmm.2015.11.004.
- [6] Z. Chegini, A. Khoshbayan, M. Taati Moghadam, I. Farahani, P. Jazireian, A. Shariati, Bacteriophage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: A review, *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 19 (2020) 1–17. doi:10.1186/s12941-020-00389-5.
- [7] O. Bolarinwa, J. Cai, Developments with investigating descriptors for antimicrobial A peptides and their derivatives, *Expert Opin. Drug Discov.* 13 (2018) 727–739. doi:10.1080/17460441.2018.1487950.
- [8] Z. Cui, Q. Luo, M.S. Bannon, V.P. Gray, T.G. Bloom, M.F. Clore, M.A. Hughes, M.A. Crawford, R.A. Letteri, Molecular engineering of antimicrobial peptide (AMP)-polymer conjugates, *Biomater. Sci.* 9 (2021) 5069–5091. doi:10.1039/d1bm00423a.
- [9] G. Wang, B. Mishra, R.F. Epan, R.M. Epan, High-quality 3D structures shine light on antibacterial, anti-biofilm and antiviral activities of human cathelicidin LL-37 and its fragments, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1838 (2014) 2160–2172. doi:10.1016/j.bbmem.2014.01.016.
- [10] T.J. Silhavy, D. Kahne, S. Walker, The Bacterial Cell Envelope, T. J. Silhavy, D. Kahne and S. Walker, *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2 (2010) 1–16. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2857177/pdf/cshperspect-PRK-a000414.pdf>.
- [11] E. Eren, J. Vijayaraghavan, J. Liu, B.R. Cheneke, D.S. Touw, W. Bryan, M. Indic, L. Movileanu, B. Van Den Berg, Substrate Specificity within a Family of Outer Membrane Carboxylate Channels, 10 (2012). doi:10.1371/journal.pbio.1001242.
- [12] G.B. Pier, NIH Public Access, 297 (2008) 277–295.
- [13] M. Schmelcher, D.M. Donovan, M.J. Loessner, Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials, *Future Microbiol.* 7 (2012) 1147–1171. doi:10.2217/fmb.12.97.
- [14] M.U. Rahman, W. Wang, Q. Sun, J.A. Shah, C. Li, Y. Sun, Y. Li, B. Zhang, W. Chen, S. Wang, Endolysin, a promising solution against antimicrobial resistance, *Antibiotics.* 10 (2021) 1–23. doi:10.3390/antibiotics1011277.
- [15] H. Haddad Kashani, M. Schmelcher, H. Sabzalipoor, E. Seyed Hosseini, R. Moniri, Recombinant endolysins as potential therapeutics against antibiotic-resistant staphylococcus aureus: Current status of research and novel delivery strategies, *Clin. Microbiol. Rev.* 31 (2018). doi:10.1128/CMR.00071-17.
- [16] S. Kim, D.W. Lee, J.S. Jin, J. Kim, Antimicrobial activity of LysSS, a novel phage endolysin, against *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 22 (2020) 32–39. doi:10.1016/j.jgar.2020.01.005.
- [17] T. Marco, G.P. Jorge, M. Brocchi, Current Status of Endolysin-Based Treatments against Gram-Negative Bacteria, (2021).
- [18] H. Oliveira, V. Thiagarajan, M. Walmagh, S. Sillankorva, R. Lavigne, M.T. Neves-Petersen, L.D. Kluskens, J. Azeredo, A thermostable salmonella phage endolysin, Lys68, with broad bactericidal properties against gram-negative pathogens in presence of weak acids, *PLoS One.* 9 (2014). doi:10.1371/journal.pone.0108376.
- [19] Z. Wang, Y. Xue, Y. Gao, M. Guo, Y. Liu, X. Zou, Y. Cheng, J. Ma, H. Wang, J. Sun, Y. Yan, Phage vB_PaeS-PAJD-1 Rescues Murine Mastitis Infected With Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11 (2021) 1–13. doi:10.3389/fcimb.2021.689770.
- [20] M. Contin, C. Garcia, C. Dobrecky, S. Lucangioli, N. D’Accorso, Advances in drug delivery, gene delivery and therapeutic agents based on dendritic materials, *Future Med. Chem.* 11 (2019) 1791–1810. doi:10.4155/fmc-2018-0452.
- [21] Y. Ma, Q. Mou, D. Wang, X. Zhu, D. Yan, Dendritic polymers for theranostics, *Theranostics.* 6 (2016)

- 930–947. doi:10.7150/thno.14855.
- [22] D.G. Yu, M. Wang, R. Ge, Strategies for sustained drug release from electrospun multi-layer nanostructures, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology*. (2021) 1–13. doi:10.1002/wnan.1772.
- [23] L. Wang, C. Hu, L. Shao, The antimicrobial activity of nanoparticles: Present situation and prospects for the future, *Int. J. Nanomedicine*. 12 (2017) 1227–1249. doi:10.2147/IJN.S121956.
- [24] S.M. Imani, L. Ladouceur, T. Marshall, R. Maclachlan, L. Soleymani, T.F. Didar, Antimicrobial nanomaterials and coatings: Current mechanisms and future perspectives to control the spread of viruses including SARS-CoV-2, *ACS Nano*. 14 (2020) 12341–12369. doi:10.1021/acsnano.0c05937.
- [25] J. Pierre Majoral, M. Zablocka, K. Ciepluch, K. Milowska, M. Bryszewska, D. Shcharbin, N. Katir, A. El Kadib, A.M. Caminade, S. Mignani, Hybrid phosphorus–viologen dendrimers as new soft nanoparticles: design and properties, *Org. Chem. Front.* 8 (2021) 4607–4622.
- [26] A. Barrios-Gumiel, J. Sánchez-Nieves, E. Pedziwiatr-Werbicka, V. Abashkin, N. Shcharbina, D. Shcharbin, S. Glińska, K. Ciepluch, D. Kuc-Ciepluch, D. Lach, M. Bryszewska, R. Gómez, F. Javier de la Mata, Effect of PEGylation on the biological properties of cationic carbosilane dendronized gold nanoparticles., *Int. J. Pharm.* (2019) 118867. doi:10.1016/j.ijpharm.2019.118867.
- [27] K. Ciepluch, K. Skrzyniarz, J. Zdańska, A. Barrios-Gumiel, J. Sánchez-Nieves, F.J. de la Mata, B. Maciejewska, Z. Drulis-Kawa, M. Bryszewska, M. Arabski, PEGylation of dendronized silver nanoparticles increases the binding affinity of antimicrobial proteins, *J. Mol. Liq.* 319 (2020). doi:10.1016/j.molliq.2020.114339.
- [28] C. Huang, J. Dong, Y. Zhang, S. Chai, X. Wang, S. Kang, D. Yu, P. Wang, Q. Jiang, Gold Nanoparticles-Loaded Polyvinylpyrrolidone/Ethylcellulose Coaxial Electrospun Nanofibers with Enhanced Osteogenic Capability for Bone Tissue Regeneration, *Mater. Des.* 212 (2021) 110240. doi:10.1016/j.matdes.2021.110240.
- [29] G.R. Newkome, Y. Zhong-qi, G.R. Baker, V.K. Gupta, Cascade Molecules: A New Approach to Micelles.* A [27]-Arbor01', 50 (1985) 2003–2004.
- [30] D.A. Tomalia, M. Rookmaker, *Polymer Data Handbook*, Oxford, 2009.
- [31] Z. Lyu, L. Ding, D. Dhumal, A. Ya-Ting Huang, C.-L. Kao, L. Peng, Poly(amidoamine) (PAMAM) Dendrimers: Synthesis and Biological Applications, in: M. Malkoch, S. García Gallego (Eds.), *Dendrimer Chem. Synth. Approaches Toward Complex Archit.*, The Royal Society of Chemistry, 2020: p. 0. doi:10.1039/9781788012904-00085.
- [32] J.A.F. Corrêa, A.G. Evangelista, T. de M. Nazareth, F.B. Luciano, Fundamentals on the molecular mechanism of action of antimicrobial peptides, *Materialia*. 8 (2019). doi:10.1016/j.mtla.2019.100494.
- [33] I. Heredero-Bermejo, J.M. Hernández-Ros, L. Sánchez-García, M. Maly, C. Verdú-Expósito, J. Soliveri, F. Javier de la Mata, J.L. Copa-Patiño, J. Pérez-Serrano, J. Sánchez-Nieves, R. Gómez, Ammonium and guanidine carbosilane dendrimers and dendrons as microbicides, *Eur. Polym. J.* 101 (2018) 159–168. doi:10.1016/j.eurpolymj.2018.02.025.
- [34] C. Pérez-Peinado, S.A. Dias, M.M. Domingues, A.H. Benfield, J.M. Freire, G. Rádis-Baptista, D. Gaspar, M.A.R.B. Castanho, D.J. Craik, S.T. Henriques, A.S. Veiga, D. Andreu, Mechanisms of bacterial membrane permeabilization by crotalidicin (Ctn) and its fragment Ctn(15–34), antimicrobial peptides from rattlesnake venom, *J. Biol. Chem.* 293 (2018) 1536–1549. doi:10.1074/jbc.RA117.000125.
- [35] R. Ruiz-González, F. Setaro, Ö. Gulías, M. Agut, U. Hahn, T. Torres, S. Nonell, Cationic phthalocyanine dendrimers as potential antimicrobial photosensitisers, *Org. Biomol. Chem.* 15 (2017) 9008–9017. doi:10.1039/c7ob02270k.
- [36] T. Zhou, K. Chen, L.M. Kong, M.S. Liu, Y.M. Ma, Y.Y. Xie, R.C. Hider, Synthesis, iron binding and antimicrobial properties of hexadentate 3-hydroxypyridinones-terminated dendrimers, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* (2018) 0–1. doi:10.1016/j.bmcl.2018.05.058.
- [37] E.V. Córdoba, M. Pion, B. Rasines, D. Filippini, H. Komber, M. Ionov, M. Bryszewska, D. Appelhans, M.A. Muñoz-Fernández, Glycodendrimers as new tools in the search for effective anti-HIV DC-based immunotherapies, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 9 (2013) 972–984. doi:10.1016/j.nano.2013.03.0048.
- [38] N. Raheem, S.K. Straus, Mechanisms of Action for Antimicrobial Peptides With Antibacterial and Antibiofilm Functions, *Front. Microbiol.* 10 (2019) 1–14. doi:10.3389/fmicb.2019.02866.
- [39] R. Roy, M.G. Baek, K. Rittenhouse-Olson, Synthesis of N,N'-bis(acrylamido)acetic acid-based T-antigen glycodendrimers and their mouse monoclonal IgG antibody binding properties, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 1809–1816. doi:10.1021/ja002596w.
- [40] B. Ziemba, I. Franiak-pietryga, M. Pion, D. Appelhans, M.Á. Mu, B. Voit, M. Bryszewska, B. Klajnert-maculewicz, Toxicity and proapoptotic activity of poly (propylene imine) glycodendrimers in vitro : Considering their contrary potential as biocompatible entity and drug molecule in cancer, 461 (2014)

- 391–402. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.12.011.
- [41] M. Touaibia, R. Roy, Glycodendrimers as Anti-Adhesion Drugs Against Type 1 Fimbriated *E. coli* Uropathogenic Infections, *Mini-Reviews Med. Chem.* 7 (2007) 1270–1283. doi:10.2174/138955707782795610.
- [42] B. González, M. Colilla, J. Díez, D. Pedraza, M. Guembe, I. Izquierdo-Barba, M. Vallet-Regí, Mesoporous silica nanoparticles decorated with polycationic dendrimers for infection treatment, *Acta Biomater.* 68 (2018) 261–271. doi:10.1016/j.actbio.2017.12.041.
- [43] N. Wrońska, A. Felczak, K. Zawadzka, M. Poszepczyńska, S. Różalska, M. Bryszewska, D. Appelhans, K. Lisowska, Poly(propylene imine) dendrimers and amoxicillin as dual-action antibacterial agents, *Molecules.* 20 (2015) 19330–19342. doi:10.3390/molecules201019330.
- [44] J.C. Simard, F. Vallières, R. De Liz, V. Lavastre, D. Girard, Silver nanoparticles induce degradation of the endoplasmic reticulum stress sensor activating transcription factor-6 Leading to activation of the NLRP-3 Inflammasome, *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 5926–5939. doi:10.1074/jbc.M114.610899.
- [45] V. Mirshafiee, B. Sun, C.H. Chang, Y.P. Liao, W. Jiang, J. Jiang, X. Liu, X. Wang, T. Xia, A.E. Nel, Toxicological Profiling of Metal Oxide Nanoparticles in Liver Context Reveals Pyroptosis in Kupffer Cells and Macrophages versus Apoptosis in Hepatocytes, *ACS Nano.* 12 (2018) 3836–3852. doi:10.1021/acsnano.8b01086.
- [46] T. Lind, P. Polcyn, P. Zielinska, M. Cardenas, Z. Urbanczyk-Lipowska, On the Antimicrobial Activity of Various Peptide-Based Dendrimers of Similar Architecture, *Molecules.* 20 (2015) 738–753.
- [47] S. Quintana-Sanchez, N. Gómez-Casanova, J. Sánchez-Nieves, R. Gómez, J. Rachuna, S. Wasik, J. Semaniak, B. Maciejewska, Z. Drulis-Kawa, K. Ciepluch, F. Javier de la Mata, M. Arabski, The Antibacterial Effect of PEGylated Carbosilane Dendrimers on *P. aeruginosa* Alone and in Combination with Phage-Derived Endolysin, *Int. J. Mol. Sci.* 23 (2022) 1–18. doi:10.3390/ijms23031873.
- [48] D. Dhumal, B. Maron, E. Malach, Z. Lyu, L. Ding, D. Marson, E. Laurini, A. Tintaru, B. Ralahy, S. Giorgio, S. Pricl, Z. Hayouka, L. Peng, Dynamic self-assembling supramolecular dendrimer nanosystems as potent antibacterial candidates against drug-resistant bacteria and biofilms, *Nanoscale.* (2022). doi:10.1039/d2nr02305a.
- [49] R. Seyfi, F.A. Kahaki, T. Ebrahimi, S. Montazersaheb, S. Eyvazi, V. Babaeipour, V. Tarhiz, Antimicrobial Peptides (AMPs): Roles, Functions and Mechanism of Action, *Int. J. Pept. Res. Ther.* 26 (2020) 1451–1463. doi:10.1007/s10989-019-09946-9.
- [50] S.A. Bansal, V. Kumar, J. Karimi, A.P. Singh, S. Kumar, Role of gold nanoparticles in advanced biomedical applications, *Nanoscale Adv.* 2 (2020) 3764–3787. doi:10.1039/d0na00472c.
- [51] L.A. Dykman, N.G. Khlebtsov, Immunological properties of gold nanoparticles, *Chem. Sci.* 8 (2017) 1719–1735. doi:10.1039/c6sc03631g.
- [52] P. Singh, S. Pandit, V.R.S.S. Mokkalapati, A. Garg, V. Ravikumar, I. Mijakovic, Gold nanoparticles in diagnostics and therapeutics for human cancer, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018). doi:10.3390/ijms19071979.
- [53] K. Sztandera, M. Gorzkiewicz, B. Klajnert-Maculewicz, Gold Nanoparticles in Cancer Treatment, *Mol. Pharm.* 16 (2019) 1–23. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.8b00810.
- [54] C. Kohout, C. Santi, L. Polito, Anisotropic gold nanoparticles in biomedical applications, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018). doi:10.3390/ijms19113385.
- [55] L. Liu, R. Sha, L. Yang, X. Zhao, Y. Zhu, J. Gao, Y. Zhang, L.P. Wen, Impact of Morphology on Iron Oxide Nanoparticles-Induced Inflammasome Activation in Macrophages, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 10 (2018) 41197–41206. doi:10.1021/acsmi.8b17474.
- [56] P. Maity, M. Bepari, A. Pradhan, R. Baral, S. Roy, S. Maiti Choudhury, Synthesis and characterization of biogenic metal nanoparticles and its cytotoxicity and anti-neoplasticity through the induction of oxidative stress, mitochondrial dysfunction and apoptosis, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 161 (2018) 111–120. doi:10.1016/j.colsurfb.2017.10.040.
- [57] C. Carnovale, G. Bryant, R. Shukla, V. Bansal, Identifying Trends in Gold Nanoparticle Toxicity and Uptake: Size, Shape, Capping Ligand, and Biological Corona, *ACS Omega.* 4 (2019) 242–256. doi:10.1021/acsomega.8b03227.
- [58] S. Chaicherd, M.C. Killingsworth, D. Pissuwan, Toxicity of gold nanoparticles in a commercial dietary supplement drink on connective tissue fibroblast cells, *SN Appl. Sci.* 1 (2019) 1–8. doi:10.1007/s42452-019-0354-2.
- [59] A. Barrios-Gumiel, J. Sánchez-Nieves, E. Pedziwiatr-Werbicka, V. Abashkin, N. Shcharbina, D. Shcharbin, S. Glińska, K. Ciepluch, D. Kuc-Ciepluch, D. Lach, M. Bryszewska, R. Gómez, F.J. de la Mata, Effect of PEGylation on the biological properties of cationic carbosilane dendronized gold nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 573 (2020). doi:10.1016/j.ijpharm.2019.118867.
- [60] B.H. Gan, T.N. Siriwardena, S. Javor, T. Darbre, J.L. Reymond, Fluorescence Imaging of Bacterial Killing by Antimicrobial Peptide Dendrimer G3KL, *ACS Infect. Dis.* 5 (2019) 2164–2173. doi:10.1021/acsinfectdis.9b00299.

- [61] K. Látrová, N. Havlová, R. Večeřová, D. Pinkas, K. Bogdanová, M. Kolář, R. Fišer, I. Konopásek, D.D. Do Pham, D. Rejman, G. Mikušová, Outer membrane and phospholipid composition of the target membrane affect the antimicrobial potential of first- and second-generation lipophosphonoxins, *Sci. Rep.* 11 (2021) 1–16. doi:10.1038/s41598-021-89883-0.
- [62] M.L. Gonzalez Ramirez, M. Poreba, S.J. Snipas, K. Groborz, M. Drag, G.S. Salvesen, Extensive peptide and natural protein substrate screens reveal that mouse caspase-11 has much narrower substrate specificity than caspase-1, *J. Biol. Chem.* 293 (2018) 7058–7067. doi:10.1074/jbc.RA117.001329.
- [63] H.W. Vankoten, W.M. Dlakic, R. Engel, M.J. Cloninger, Synthesis and biological activity of highly cationic dendrimer antibiotics, *Mol. Pharm.* 13 (2016) 3827–3834. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.6b00628.
- [64] X. Zhang, J. Luan, W. Chen, J. Fan, Y. Nan, Y. Wang, Y. Liang, G. Meng, D. Ju, Mesoporous silica nanoparticles induced hepatotoxicity via NLRP3 inflammasome activation and caspase-1-dependent pyroptosis, *Nanoscale.* 10 (2018) 9141–9152. doi:10.1039/c8nr00554k.
- [65] P. Zhao, M. Wang, M. Chen, Z. Chen, X. Peng, F. Zhou, J. Song, J. Qu, Programming cell pyroptosis with biomimetic nanoparticles for solid tumor immunotherapy, *Biomaterials.* 254 (2020) 120142. doi:10.1016/j.biomaterials.2020.120142.
- [66] K. Shirasuna, T. Karasawa, M. Takahashi, Exogenous nanoparticles and endogenous crystalline molecules as danger signals for the NLRP3 inflammasomes, *J. Cell. Physiol.* 234 (2019) 5436–5450. doi:10.1002/jcp.27475.
- [67] S.J. Strydom, W.E. Rose, D.P. Otto, W. Liebenberg, M.M. De Villiers, Poly(amidoamine) dendrimer-mediated synthesis and stabilization of silver sulfonamide nanoparticles with increased antibacterial activity, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 9 (2013) 85–93. doi:10.1016/j.nano.2012.03.006.
- [68] K. Ciepluch, K. Skrzyniarz, A. Barrios-gumiel, S. Quintana, J. Sánchez-nieves, F.J. De Mata, B. Maciejewska, Z. Drulis-kawa, M. Arabski, Dendronized Silver Nanoparticles as Bacterial Membrane Permeabilizers and Their Interactions With *P. aeruginosa* Lipopolysaccharides, *Endolysins.* 10 (2019) 1–11. doi:10.3389/fmicb.2019.02771.
- [69] A. Samali, B. Zhivotovsky, D. Jones, S. Nagata, S. Orrenius, Apoptosis: Cell death defined by caspase activation [1], *Cell Death Differ.* 6 (1999) 495–496. doi:10.1038/sj.cdd.4400520.
- [70] S.L. Harris, M. Kazmierczak, T. Pangrsi, P. Shah, N. Chuchvara, A. Barrantes-Freer, T. Moser, M. Schwander, Conditional deletion of pejkakin in adult outer hair cells causes progressive hearing loss in mice, *Neuroscience.* 344 (2017) 380–393. doi:10.1016/j.neuroscience.2016.12.055.
- [71] N. Kayagaki, I.B. Stowe, B.L. Lee, K. O'Rourke, K. Anderson, S. Warming, T. Cuellar, B. Haley, M. Roose-Girma, Q.T. Phung, P.S. Liu, J.R. Lill, H. Li, J. Wu, S. Kummerfeld, J. Zhang, W.P. Lee, S.J. Snipas, G.S. Salvesen, L.X. Morris, L. Fitzgerald, Y. Zhang, E.M. Bertram, C.C. Goodnow, V.M. Dixit, Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling, *Nature.* 526 (2015) 666–671. doi:10.1038/nature15541.
- [72] P.J. Baker, D. Boucher, D. Bierschenk, C. Tebartz, P.G. Whitney, D.B. D'Silva, M.C. Tanzer, M. Monteleone, A.A.B. Robertson, M.A. Cooper, S. Alvarez-Diaz, M.J. Herold, S. Bedoui, K. Schroder, S.L. Masters, NLRP3 inflammasome activation downstream of cytoplasmic LPS recognition by both caspase-4 and caspase-5, *Eur. J. Immunol.* 45 (2015) 2918–2926. doi:10.1002/eji.201545655.
- [73] R.C. Coll, K. Schroder, P. Pelegrín, NLRP3 and pyroptosis blockers for treating inflammatory diseases, *Trends Pharmacol. Sci.* 43 (2022) 653–668. doi:10.1016/j.tips.2022.04.003.
- [74] M.L. Gonzalez Ramirez, M. Poreba, S.J. Snipas, K. Groborz, M. Drag, G.S. Salvesen, Extensive peptide and natural protein substrate screens reveal that mouse caspase-11 has much narrower substrate specificity than caspase-1, *J. Biol. Chem.* (2018). doi:10.1074/jbc.RA117.001329.
- [75] Y.Y. Yuan, K.X. Xie, S.L. Wang, L.W. Yuan, Inflammatory caspase-related pyroptosis: Mechanism, regulation and therapeutic potential for inflammatory bowel disease, *Gastroenterol. Rep.* 6 (2018) 167–176. doi:10.1093/gastro/goy011.
- [76] N. Song, T. Li, Regulation of NLRP3 inflammasome by phosphorylation, *Front. Immunol.* 9 (2018) 1–9. doi:10.3389/fimmu.2018.02305.
- [77] X. Huang, Y. Feng, G. Xiong, S. Whyte, J. Duan, Y. Yang, K. Wang, S. Yang, Y. Geng, Y. Ou, D. Chen, Caspase-11, a specific sensor for intracellular lipopolysaccharide recognition, mediates the non-canonical inflammatory pathway of pyroptosis, *Cell Biosci.* 9 (2019) 1–11. doi:10.1186/s13578-019-0292-0.
- [78] R. Heilig, M.S. Dick, L. Sborgi, E. Meunier, S. Hiller, P. Broz, The Gasdermin-D pore acts as a conduit for IL-1 β secretion in mice, *Eur. J. Immunol.* 48 (2018) 584–592. doi:10.1002/eji.201747404.
- [79] D. Yang, Y. He, R. Muñoz-Planillo, Q. Liu, G. Núñez, Caspase-11 requires the pannexin-1 channel and the purinergic P2X7 pore to mediate pyroptosis and endotoxic shock, *Physiol. Behav.* 176 (2017) 139–148. doi:10.1016/j.physbeh.2017.03.040.
- [80] D. Kuc-Ciepluch, K. Ciepluch, M. Arabski, Gasdermin family proteins as a permeabilization factor of

- cell membrane in pyroptosis process, *Postepy Hig. Med. Dosw.* 75 (2021) 337–344. doi:10.5604/01.3001.0014.8985.
- [81] S. Qiu, J. Liu, F. Xing, “Hints” in the killer protein gasdermin D: Unveiling the secrets of gasdermins driving cell death, *Cell Death Differ.* 24 (2017) 588–596. doi:10.1038/cdd.2017.24.
- [82] S. Xia, J. Ruan, H. Wu, *Monitoring gasdermin pore formation in vitro*, 1st ed., Elsevier Inc., 2019. doi:10.1016/bs.mie.2019.04.024.
- [83] Y. Yi, Regulatory Roles of the Caspase-11 Non-Canonical Inflammasome in Inflammatory Diseases, 18 (2018) 3–5. doi:10.4110/in.2018.18.e41.
- [84] J. Shi, Y. Zhao, K. Wang, X. Shi, Y. Wang, H. Huang, Y. Zhuang, T. Cai, F. Wang, F. Shao, Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death, *Nature.* 526 (2015) 660–665. doi:10.1038/nature15514.
- [85] A. Pfalzgraff, G. Weindl, Intracellular Lipopolysaccharide Sensing as a Potential Therapeutic Target for Sepsis, *Trends Pharmacol. Sci.* xx (2019) 1–11. doi:10.1016/j.tips.2019.01.001.
- [86] J.A. Hayward, A. Mathur, C. Ngo, S.M. Man, Cytosolic Recognition of Microbes and Pathogens: Inflammasomes in Action, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 82 (2018) 1–40. doi:10.1128/MMBR.00015-18.
- [87] R.A. Panganiban, M. Sun, A. Dahlin, H. Park, M. Kan, B.E. Himes, J.A. Mitchel, C. Iribarren, E. Jorgenson, S.H. Randell, E. Israel, K. Tantisira, S. Shore, J. Park, S.T. Weiss, A.C. Wu, Q. Lu, A functional splicing variant associated with decreased asthma risk abolishes the ability of gasdermin B (GSDMB) to induce epithelial cell pyroptosis. | Department of Population Medicine, 142 (2018) 1469–1478. doi:10.1016/j.jaci.2017.11.040.A.
- [88] S.B. Kovacs, E.A. Miao, Gasdermins: Effectors of Pyroptosis, *Trends Cell Biol.* 27 (2017) 673–684. doi:10.1016/j.tcb.2017.05.005.
- [89] L. Sborgi, S. Rühl, E. Mulvihill, J. Pipercevic, R. Heilig, H. Stahlberg, C.J. Farady, D.J. Müller, P. Broz, S. Hiller, GSDMD membrane pore formation constitutes the mechanism of pyroptotic cell death, *EMBO J.* 35 (2016) 1766–1778. doi:10.15252/embj.201694696.
- [90] P.J. Baker, D. Boucher, D. Bierschenk, C. Tebartz, P.G. Whitney, D.B. D’Silva, M.C. Tanzer, M. Monteleone, A.A.B. Robertson, M.A. Cooper, S. Alvarez-Diaz, M.J. Herold, S. Bedoui, K. Schroder, S.L. Masters, NLRP3 inflammasome activation downstream of cytoplasmic LPS recognition by both caspase-4 and caspase-5, *Eur. J. Immunol.* 45 (2015) 2918–2926. doi:10.1002/eji.201545655.
- [91] K. Ciepluch, B. Maciejewska, K. Gałczyńska, D. Kuc-Ciepluch, M. Bryszewska, D. Appelhans, Z. Drulis-Kawa, M. Arabski, The influence of cationic dendrimers on antibacterial activity of phage endolysin against *P. aeruginosa* cells, *Bioorg. Chem.* 91 (2019). doi:10.1016/j.bioorg.2019.103121.
- [92] A. Barrios-Gumiel, J. Sánchez-Nieves, E. Pedziwiatr-Werbicka, V. Abashkin, N. Shcharbina, D. Shcharbin, S. Glińska, K. Ciepluch, D. Kuc-Ciepluch, D. Lach, M. Bryszewska, R. Gómez, F.J. de la Mata, Effect of PEGylation on the biological properties of cationic carbosilane dendronized gold nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 573 (2020). doi:10.1016/j.ijpharm.2019.118867.
- [93] C.E. Peña-González, E. Pedziwiatr-Werbicka, D. Shcharbin, C. Guerrero-Beltrán, V. Abashkin, S. Loznikova, J.L. Jiménez, M.Á. Muñoz-Fernández, M. Bryszewska, R. Gómez, J. Sánchez-Nieves, F.J. De La Mata, Gold nanoparticles stabilized by cationic carbosilane dendrons: Synthesis and biological properties, *Dalt. Trans.* 46 (2017) 8736–8745. doi:10.1039/c6dt03791g.
- [94] D. Kuc-Ciepluch, M. Gorzkiewicz, E. Pędziwiatr-Werbicka, A. Barrios-Gumiel, M. Lasak, A. Mariak, K. Sztandera, R. Gomez, F.J. de la Mata, A. Lankoff, B. Klajnert-Maculewicz, M. Bryszewska, M. Arabski, K. Ciepluch, The effect of surface modification of dendronized gold nanoparticles on activation and release of pyroptosis-inducing pro-inflammatory cytokines in presence of bacterial lipopolysaccharide in monocytes, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 217 (2022). doi:10.1016/j.colsurfb.2022.112652.
- [95] Q. Xie, W.W. Shen, J. Zhong, C. Huang, L. Zhang, J. Li, Lipopolysaccharide/adenosine triphosphate induces IL-1 β and IL-18 secretion through the NLRP3 inflammasome in RAW264.7 murine macrophage cells, *Int. J. Mol. Med.* 34 (2014) 341–349. doi:10.3892/ijmm.2014.1755.
- [96] S. Alfei, A.M. Schito, From nanobiotechnology, positively charged biomimetic dendrimers as novel antibacterial agents: A review, *Nanomaterials.* 10 (2020) 1–50. doi:10.3390/nano10102022.
- [97] M. Ciolkowski, B. Pałecz, D. Appelhans, B. Voit, B. Klajnert, M. Bryszewska, The influence of maltose modified poly(propylene imine) dendrimers on hen egg white lysozyme structure and thermal stability, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 95 (2012) 103–108. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.02.021.
- [98] P. Abbasi, H. Fahimi, S. Khaleghi, Novel Chimeric Endolysin Conjugated Chitosan Nanocomplex as a Potential Inhibitor Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria, *Appl. Biochem. Biotechnol.* (2023). doi:10.1007/s12010-023-04484-z.
- [99] V.S. Gondil, K. Harjai, S. Chhibber, Investigating the potential of endolysin loaded chitosan nanoparticles in the treatment of pneumococcal pneumonia, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* (2020) 102142. doi:10.1016/j.jddst.2020.102142.

- [100] C.K.O. Dzuovor, C.K.O. Dzuovor, S. Bhuvana K., Y. Tayyaba, S. Hsin-Hui, V. Haritos, L. He, Engineering Self-Assembled Endolysin Nanoparticles against Antibiotic-Resistant Bacteria, *ACS Appl. Bio Mater.* 5 (2022) 4993–5003.
- [101] T. Kaiser, H. Frey, Hyperbranched polymer architectures: From Flory’s AB(f-1) polycondensates to controlled structures, *Polymer (Guildf)*. 211 (2020) 123113. doi:10.1016/j.polymer.2020.123113.
- [102] Y. Li, Z. Shi, I. Radauer-Preiml, A. Andosch, E. Casals, U. Luetz-Meindl, M. Cobaleda, Z. Lin, M. Jaber-Douraki, P. Italiani, J. Horejs-Hoeck, M. Himly, N.A. Monteiro-Riviere, A. Duschl, V.F. Puentes, D. Boraschi, Bacterial endotoxin (lipopolysaccharide) binds to the surface of gold nanoparticles, interferes with biocorona formation and induces human monocyte inflammatory activation, *Nanotoxicology*. 11 (2017) 1157–1175. doi:10.1080/17435390.2017.1401142.
- [103] Q. Du, D. Ge, V. Mirshafiee, C. Chen, M. Li, C. Xue, X. Ma, B. Sun, Assessment of neurotoxicity induced by different-sized Stöber silica nanoparticles: Induction of pyroptosis in microglia, *Nanoscale*. 11 (2019) 12965–12972. doi:10.1039/c9nr03756j.
- [104] W. Huang, Z. Zhang, Y. Qiu, Y. Gao, Y. Fan, Q. Wang, Q. Zhou, NLRP3 inflammasome activation in response to metals, *Front. Immunol.* 14 (2023) 1–12. doi:10.3389/fimmu.2023.1055788.
- [105] W. Zhen, Y. Liu, S. An, X. Jiang, Glutathione-Induced In Situ Michael Addition between Nanoparticles for Pyroptosis and Immunotherapy, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 202301866 (2023). doi:10.1002/anie.202301866.
- [106] X. Tong, R. Tang, M. Xiao, J. Xu, W. Wang, B. Zhang, J. Liu, X. Yu, S. Shi, Targeting cell death pathways for cancer therapy: recent developments in necroptosis, pyroptosis, ferroptosis, and cuproptosis research, *BioMed Central*, 2022. doi:10.1186/s13045-022-01392-3.
- [107] G. Gupta, F. Cappellini, L. Farcas, R. Gornati, G. Bernardini, B. Fadeel, Copper oxide nanoparticles trigger macrophage cell death with misfolding of Cu/Zn superoxide dismutase 1 (SOD1), *Part. Fibre Toxicol.* 19 (2022) 1–27. doi:10.1186/s12989-022-00467-w.
- [108] Z. Yu, W. Cao, C. Han, Z. Wang, Y. Qiu, J. Wang, M. Wei, J. Wang, S. Zhang, S. Liu, S. Mo, J. Chen, Biomimetic Metal-Organic Framework Nanoparticles for Synergistic Combining of SDT-Chemotherapy Induce Pyroptosis in Gastric Cancer, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 10 (2022) 1–14. doi:10.3389/fbioe.2022.796820.
- [109] E. Mulvihill, L. Sborgi, S.A. Mari, M. Pfreundschuh, S. Hiller, D.J. Müller, Mechanism of membrane pore formation by human gasdermin-D, *EMBO J.* 37 (2018) e98321. doi:10.15252/embj.201798321.
- [110] H. Shropshire, R.A. Jones, M.M. Aguilo-Ferretjans, D.J. Scanlan, Y. Chen, Proteomics insights into the *Burkholderia cenocepacia* phosphorus stress response, *Environ. Microbiol.* 23 (2021) 5069–5086. doi:10.1111/1462-2920.15451.
- [111] Z.Z. Liu, Y.J. Yang, F.H. Zhou, K. Ma, X.Q. Lin, S.Q. Yan, Y. Gao, W. Chen, GSDMD contributes to host defence against *Staphylococcus aureus* skin infection by suppressing the Cxcl1–Cxcr2 axis, *Vet. Res.* 52 (2021) 1–13. doi:10.1186/s13567-021-00937-7.
- [112] X. Gou, W. Xu, Y. Liu, Y. Peng, W. Xu, Y. Yin, X. Zhang, IL-6 Prevents Lung Macrophage Death and Lung Inflammation Injury by Inhibiting GSDME- and GSDMD-Mediated Pyroptosis during Pneumococcal Pneumosepsis, *Microbiol. Spectr.* 10 (2022). doi:10.1128/spectrum.02049-21.
- [113] K. Tsuchiya, S. Hosojima, H. Hara, H. Kushiyama, M.R. Mahib, T. Kinoshita, T. Suda, Gasdermin D mediates the maturation and release of IL-1 α downstream of inflammasomes, *Cell Rep.* 34 (2021) 108887. doi:10.1016/j.celrep.2021.108887.
- [114] K. Eder, C. Vizler, E. Kusz, I. Karcagi, H. Glavinas, G.E. Balogh, L. Vigh, E. Duda, Z. Gyorfy, The role of lipopolysaccharide moieties in macrophage response to *Escherichia coli*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 389 (2009) 46–51. doi:10.1016/j.bbrc.2009.08.082.
- [115] M. Moossavi, N. Parsamanesh, A. Bahrami, S.L. Atkin, A. Sahebkar, Role of the NLRP3 inflammasome in cancer, *Mol. Cancer*. 17 (2018) 158. doi:10.1186/s12943-018-0900-3.
- [116] J. Lee, D.S. Patel, I. Kucharska, L.K. Tamm, W. Im, Refinement of OprH-LPS Interactions by Molecular Simulations, *Biophys. J.* 112 (2017) 346–355. doi:10.1016/j.bpj.2016.12.006.
- [117] R.E. MacRedmond, C.M. Greene, C.T. Taggart, N.G. McElvaney, S. O’Neill, Respiratory epithelial cells require Toll-like receptor 4 for induction of human β -defensin 2 by lipopolysaccharide, *Respir. Res.* 6 (2005) 1–11. doi:10.1186/1465-9921-6-116.

12. Dorobek naukowy

Publikacje naukowe

Kuc-Ciepluch Dorota, Gorzkiewicz Michał, Pędziwiatr-Werbicka Elżbieta, Barrios-Gumiel Andrea, Lasak Magdalena, Mariak Aleksandra, Sztandera Krzysztof, Gomez Rafael, de la Mata F. Javier, Lankoff Anna, Klajnert-Maculewicz Barbara, Bryszewska Maria, Arabski Michał, Ciepluch Karol. The effect of surface modification of dendronized gold nanoparticles on activation and release of pyroptosis-inducing pro-inflammatory cytokines in presence of bacterial lipopolysaccharide in monocytes, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2022; 217: 112652, ISSN 0927-7765. DOI: doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112652.

Punkty MNiSW: 100, IF=5.999, IF 5-letni=5,126

Kuc-Ciepluch Dorota, Ciepluch Karol, Arabski Michał. Rodzina białek gazdermin jako czynnik permeabilizujący błonę komórkową w procesie pyroptozy/Gasdermin family proteins as a permeabilization factor of cell membrane in pyroptosis process. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 2021; 75: 337-344, e-ISSN 1732-2693. DOI: 10.5604/01.3001.0014.8985.

Punkty MNiSW: 40, IF= 0,357, IF 5-letni= 0,708

Barrios-Gumiel Andrea; Sánchez-Nieves Javier; Pędziwiatr-Werbicka Elżbieta; Abashkin Viktor; Shcharbina Natallia; Shcharbin Dzmitry; Glińska Sława; Ciepluch Karol; **Kuc-Ciepluch Dorota**; Lach Dominika Bryszewska Maria; Gómez Rafael; de la Mata Javier. Effect of PEGylation on the biological properties of cationic carbosilane dendronized gold nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 2020; 573: 118867. ISSN 0378-5173. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.118867.

Punkty MNiSW: 100, IF= 5,875, IF 5-letni=5,756

Ciepluch Karol, Maciejewska Barbara, Gałczyńska Katarzyna, **Kuc-Ciepluch Dorota**, Bryszewska Maria, Appelhans Dietmar, Drulis-Kawa Zuzanna, Arabski Michał. The influence of cationic dendrimers on antibacterial activity of phage endolysin against *P. aeruginosa* cells. *Bioorganic Chemistry*, 2019; 91: 103121. ISSN: 0045-2068. DOI: 10.1016/j.bioorg.2019.103121.

Punkty MNiSW: 100, IF=4.831, IF 5-letni=5,087

Suma IF wszystkich publikacji: **17,062**

Suma IF 5-letniego wszystkich publikacji: **16,677**

Suma punktów MNiSW wszystkich publikacji : **340**

Komunikaty naukowe

Lasak M., Ciepluch K., **Kuc-Ciepluch D.**, Fahmi A., Nirwan V. P. „Biological properties of nanofibers functionalized with gold nanoparticles”. 11th International Congress Nanotechnology in Biology & Medicine 23; 12-14.04.2023, Graz, Austria, (poster).

Kuc-Ciepluch D., Ciepluch K., Drulis-Kawa Z., Arabski M. „Induction of pyroptosis to enhance antibacterial effect of antimicrobial proteins”. 2nd Drug Discovery Conference, 58 ; 22–24.08. 2022, Ryga, Łotwa, (poster).

Kuc-Ciepluch D., Gorzkiewicz M., Pędziwiatr-Werbicka E., Barrios-Gumiel A., Lasak M., Mriak A., Gomez R., de la Mata F. J., Klajnert-Maculewicz B., Bryszewska M., Arabski M, Ciepluch K. „Dendronized gold nanoparticles induce pyroptosis-like mechanisms in THP-1 cells”. 8th Central European Congress of Life Sciences Eurobiotech, 7; 16.06.2021, Kraków, Polska, (poster).

Kuc-Ciepluch D. Arabski M. „New strategies of outer cell membrane permeabilization to enhanced bactericidal effect of recombinant phage endolysins against *Pseudomonas aeruginosa*”. V Forum Doktorantów, UJK, 02.-03.06.2022, Kielce, (wystąpienie ustne).

Kuc-Ciepluch D. Arabski M. „New strategies of outer cell membrane permrabilization to enhanced bactericidal effect of recombinant phage endolysins against *Pseudomonas aeruginosa*”. IV Forum Doktorantów, UJK, 17-19.11.2020, Kielce, (wystąpienie ustne).

Stáže naukowe

Department Organic Chemistry and Inorganic Chemistry, University of Alcalá, Hiszpania, Alcalá de Henares 04.06.21- 05.05.21.

Projekty naukowe

- Badania przeprowadzone do rozprawy doktorskiej sfinansowano w ramach: projekt OPUS UMO-2017/27/B/NZ6/00199 Gasdermin as a potential permeabilizing agent of outer cell membrane of *Pseudomonas aeruginosa* in order to enhanced bactericidal effect of recombinant phage endolysins (kierownik dr hab. Michał Arabski, prof. UJK) - stypendysta/wykonawca.
- Projekt AKCELERATOR ROZWOJU Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach, o numerze POWR.03.05.00-00-Z212/18 realizowanego przez Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach, współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego, Oś III Szkolnictwo wyższe dla gospodarki i rozwoju Działanie 3.5 Kompleksowe programy szkół wyższych Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014 – 2020 - uczestnik

Kursy i szkolenia

- Szkolenie z zaawansowanej analizy danych uzyskanych z mikromacierzy do badania ekspresji genów - analiza biostatystyczna, analiza skupień, interpretacja z wykorzystaniem narzędzi komercyjnych i open source” prowadzonym przez Perlan Technologies Polska Sp. z o.o., 16.11.2021.
- Szkolenie z analiz transkryptomicznych na platformie mikromacierzowej Agilent Technologies”, prowadzonym przez Perlan Technologies Polska Sp. z o.o., 17-19.04.2019.
- Szkolenie statystyczne: „Statistica kurs podstawowy”, realizowany przez StatStof Polska, 15 i 23 04. 2020.