

Received: 2015.03.26
Accepted: 2016.04.01
Published: 2016.06.13

Udział białek błony zewnętrznej we wrażliwości bakterii na nanosrebro

The participation of outer membrane proteins in the bacterial sensitivity to nanosilver

Anna Kędziora^{1*}, Eva Krzyżewska², Bartłomiej Dudek^{1*}, Gabriela Bugla-Płoskońska¹

¹Zakład Mikrobiologii, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Uniwersytet Wrocławski, Wrocław

²Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu

Streszczenie

Przedmiotem opracowania jest analiza udziału białek błony zewnętrznej we wrażliwości bakterii Gram-ujemnych na nanomateriały srebra. Mechanizm oddziaływania srebra z komórką bakterii najdokładniej opisano dla tej grupy mikroorganizmów. Istnieje kilka teorii dotyczących skuteczności antybakteryjnej jonów srebra i nanosrebra, a przy tym wskazywane są różnice w sposobie ich działania. Białka błony zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych są zaangażowane w pobieranie srebra ze środowiska i mają udział w rozwoju mechanizmów oporności na nanometal. Białka te stanowią mierzalny parametr w fenotypowej reakcji komórek bakterii Gram-ujemnych na obecność w środowisku nanoform srebra: jego właściwości, składu chemicznego, zawartości, czasu działania. Metody proteomiczne (w tym elektroforeza dwukierunkowa i MALDI TOF) są zatem właściwymi technikami do określania wrażliwości bakterii na srebro oraz zmian jakie zachodzą w błonie zewnętrznej pod wpływem: czasu działania/ekspozycji oraz parametrów fizycznych i chemicznych nanomateriałów srebra. Wiele preparatów zawierających nanosrebro nadal jest na etapie badań w zakresie charakterystyki fizyko-chemicznej oraz biologicznej aktywności, inne już wdrożono do wielu gałęzi przemysłu. W dobie bardzo dynamicznie rozwijającej się nanotechnologii i wprowadzania na rynek produktów biobójczych, opartych na biologicznie aktywnych nanocząstkach (głównie nanosrebra) istnieje konieczność analizy odpowiedzi komórek bakterii na nanosrebro zróżnicowane pod względem cech fizycznych i chemicznych.

Słowa kluczowe:

nanotechnologia • srebro • białka błony zewnętrznej (OMP) • elektroforeza dwukierunkowa

Summary

The presented study is to analyze the participation of outer membrane proteins of Gram-negative bacteria in sensitivity to silver nanomaterials. The mechanism of interaction of silver with the bacterial cell is best described in this group of microorganisms. There are several theories regarding the effectiveness of antimicrobial ions and nanosilver, and at the indicated differences in the way they work. Outer membrane proteins of Gram-negative bacteria are involved in the procurement of silver from the environment and contribute to the development mechanisms of resistance to nanometals. They are measurable parameter in the field of cell phenotypic response to the presence of Gram-negative bacteria in the environment silver nanoforms: its properties, chemical composition, content or times of action. Proteomic methods (including two dimensional electrophoresis and MALDI-TOF MS) are therefore

*Dr Anna Kędziora i mgr Bartłomiej Dudek są stypendystami Projektu „Akademia Rozwoju- kluczem wzmocnienia kadr polskiej gospodarki”, współfinansowanego przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego. Artykuł częściowo finansowany z grantu naukowego dla młodych naukowców i uczestników studiów doktoranckich na Wydziale Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego finansowanych z dotacji celowej MNiSW nr 1215/M/IGM/15



relevant techniques for determining the susceptibility of bacteria to silver and the changes taking place in the outer membrane under the influence: uptime/exposure and physical and chemical parameters of silver nanomaterials. Many products containing nanosilver is still in the research phase in terms of physico-chemical characteristics and biological activity, others have been already implemented in many industries. During the very fast nanotechnology developing and introduction to the market products based on the nanosilver the bacterial answer to nanosilver is needed.

Keywords: nanotechnology • silver • outer membrane proteins (OMP) • 2-DE electrophoresis

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1205005>

Word count: 2496

Tables: 2

Figures: –

References: 33

Adres autorki: dr Anna Kędziora, Zakład Mikrobiologii, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Uniwersytet Wrocławski, ul. S. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław; e-mail: anna.kedziora@uwr.edu.pl

WSTĘP

Nanotechnologia jest jedną z najdynamiczniej rozwijających się nauk w ostatnich latach. Jest interdyscyplinarną nauką, łączącą wiedzę chemików, fizyków, biologów, z którą wiąże się zarówno wielkie nadzieje, jak i obawy. Nanotechnologia zajmuje się projektowaniem, wytwarzaniem, charakterystyką i zastosowaniem cząstek o bardzo małych rozmiarach – rzędu 10^{-9} m. Umożliwia manipulowanie cząstką na poziomie atomów, a wyniki tych działań wywołują różnice we właściwościach fizyko-chemicznych nanomateriałów w porównaniu do ich odpowiedników w skali mikro. Odmiennostwo w cechach fizyko-chemicznych pozwala na nowe zastosowania produktów w skali nano. Jednym z głównych wyrobów nanotechnologii, mającym wiele zastosowań w różnych gałęziach przemysłu, jest nanosrebro. Dane statystyczne podają, że w 2014 r. 4% ogólnej produkcji sprzętów, w tym 50% elektroniki i sprzętu w technologii informacyjnej (information technology, IT), 16% artykułów gospodarstwa domowego zawierało rozwiązania, jakie niesie ze sobą nanotechnologia. W marcu 2011 r. aż 313 produktów dostępnych na amerykańskim rynku konsumenckim zawierało nanocząstki srebra (Ag-nanoparticles, AgNPs) i liczba ta stale rośnie [20]. Przykładem są produkty farmaceutyczne (maści, kremy, opatrunki), suplementy diety, kosmetyki, tekstylia, środki do dezynfekcji, opakowania żywności, zabawki, artykuły i sprzęt gospodarstwa domowego, czy elektronika konsumencka [12,20]. Nanosrebro znajduje szerokie zastosowanie również w badaniach biologicznych i w medycynie. Jony srebra są powszechnie używane w medycynie już od wielu lat, a srebro modyfikowane metodami nanotechnologii stwarza nowe możliwości w diagnostyce i terapii wielu chorób. Nanocząstki srebra wykazują aktywność wobec bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, grzybów, wirusów oraz pierwotniaków,

a w przeciwieństwie do jonów srebra zachowują biologiczną aktywność przez wydłużony czas. Aktywność nanocząstek srebra zależy od ich wielkości, kształtów, zawartości srebra i składu chemicznego nanokompozytu. Dzięki dużej biologicznej aktywności nanocząstki srebra są dodawane do materiałów opatrunkowych, suplementów diety, cewników, implantów medycznych w celu hamowania rozwoju patogenów i inhibicji tworzenia biofilmu. Nanosrebro jest dodawane do materiałów (wykorzystywanych m.in. do produkcji fartuchów szpitalnych, pościeli, ręczników) w celu redukcji liczby patogenów w środowisku klinicznym. AgNPs jako składniki kosmetyków przeznaczonych dla osób z problemami skórnymi regulują pracę gruczołów łojowych, nawilżają skórę i zapewniają odpowiednią grubość naskórka, a w przyszłości mogą być dodawane do kosmetyków jako środek antyseptyczny i konserwant. Nanosrebro jest coraz częściej stosowane jako dodatek do materiałów służących do produkcji bielizny, odzieży sportowej, dywanów, sprzętu komputerowego elektronicznego (np. klawiatur, myszy komputerowych), telefonów komórkowych oraz sprzętu AGD [13]. Przewiduje się, że w przyszłości zwiększy się wykorzystanie produktów nanotechnologii, w tym nanosrebra, w procesie monitorowania zanieczyszczeń środowiska oraz jego oczyszczania [21]. Związki zawierające nanocząstki srebra immobilizowane na nieorganicznych nośnikach uważa się obecnie za najskuteczniejsze środki dezynfekcyjne, które są stosowane na szeroką skalę w systemach dystrybucji wody pitnej. Ponadto AgNPs są wykorzystywane również jako dodatek do produktów spożywczych i licznych tworzyw sztucznych, wykorzystywanych do produkcji zabawek dziecięcych [13,17,21]. Tak szerokie wykorzystanie produktów nanotechnologii wymaga oceny ich wpływu na zdrowie ludzi, czy homeostazę ekosystemów. Jednym ze sposobów oceny jest zaproponowana przez nas ocena zmian wrażliwości bakterii na długotrwałe i podprogowe

zawartości nanocząstek srebra, mierzona zmianami zachodzącymi w proteomie błony zewnętrznej bakterii.

MECHANIZM AKTYWNOŚCI JONÓW Ag^+ I NANOCZĄSTEK SREBRA Ag^0

Działanie srebra na komórkę bakteryjną jest nieswoiste, bo wykazuje aktywność oligodynamiczną względem wielu miejsc docelowych w komórce, w przeciwieństwie do antybiotyków, które charakteryzują się wybiórczym działaniem w stosunku do określonych struktur komórkowych lub procesów komórkowych. Srebro wykazuje dużą skuteczność zarówno wobec komórek bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych, jednak ze względu na prowadzony charakter badań, artykuł dotyczy wpływu preparatów srebra na komórkę bakterii Gram-ujemnych i jej odpowiedzi molekularnej w zakresie zmian w proteomie błony zewnętrznej na skutek poddawania komórek bakterii presji selekcyjnej z zastosowaniem nanoform srebra.

W opinii badaczy [12,13,22,29] najważniejszymi mechanizmami warunkującymi bakterioobójcze działanie Ag^+ jest zdolność wiązania się jonów do osłon komórkowych, niszczenie funkcji błon cytoplazmatycznych, inaktywacja głównych enzymów procesów metabolicznych, oddziaływanie z kwasami nukleinowymi oraz generowanie wytwarzania reaktywnych form tlenu. Mimo intensywnych badań trwa dyskusja nad mechanizmem aktywności przeciwdrobnoustrojowej jonów i nanocząstek srebra. Istnieją trzy teorie, które w różnym stopniu wskazują na udział nanocząstki i/lub jonów srebra, w mechanizmie antibakteryjnego działania. Porównanie i opis sposobu działania jonów i nanocząstek srebra na komórkę bakterii przedstawiono w tabeli 1.

BIAŁKA OMP: BUDOWA, RODZAJE, FUNKCJE

Białka błony zewnętrznej (outer membrane proteins, OMP) są niezbędnym elementem strukturalnym komórki zaangażowanym w zjawisko wrażliwości bakterii Gram-ujemnych na substancje chemiczne, w tym również metale ciężkie. OMP są swoistym „kanałem komunikacyjnym” bakterii ze środowiskiem zewnętrznym oraz barierą zabezpieczającą przed negatywnym wpływem czynników zewnętrznych na komórkę. Różnorodne warunki środowiska, w tym również sztucznie zaadaptowane przez człowieka, mają wpływ na ekspresję białek błony zewnętrznej. Białka OMP ze względu na peryferyczne umiejscowienie w komórce bakteryjnej biorą aktywny udział w przystosowaniu komórki do zmieniających się warunków habitatu i zajmowania nowych nisz ekologicznych. Zmiana w poziomie ekspresji genów kodujących białka OMP może się pojawiać jako odpowiedź komórki na obecność w środowisku antybiotyków, metali ciężkich, detergentów, soli czy biocydów. Obecność danego białka lub ich zespołu może być związana z czasem działania i stężeniem czynnika, mającego wpływ na wzrost i rozwój bakterii [1,3].

Synteza OMP odbywa się w cytoplazmie; do ich przemieszczenia do błony zewnętrznej konieczna jest

sekwencja sygnałowa, usuwana z prekursorów białek podczas translokacji przez błonę cytoplazmatyczną przez peptydazę sygnałową. Białka są następnie uwalniane do przestrzeni peryplazmatycznej, gdzie następuje ich pofałdowanie przed wbudowaniem w błonę zewnętrzną. Kolejne etapy biogenezy białek OMP nie są jednak dokładnie poznane. Istnieje hipoteza, że lipopolisacharyd (lipopolysaccharides, LPS) jest zaangażowany w prawidłowe formowanie OMP i tylko białka wstępnie pofałdowane w kompleksie z LPS mogą być wbudowane w błonę zewnętrzną [3,32].

Białka błony zewnętrznej to najczęściej białka integralne, które spinają dwuwarstwę lipidową lub lipoproteiny, które warunkują stabilność ściany komórkowej i błony zewnętrznej (np. lipoproteina Brauna). Integralne białka błony zewnętrznej są zbudowane z równoległych do siebie łańcuchów o strukturze β -harmonijki. Transbłonowe odcinki β -nici są bogate w glicynę, reszty tryptofanu i tyrozyny, a fałdują się w cylindryczne struktury występujące jako monomery, dimery lub trimery. Wnętrza tych struktur tworzą kanał lub kanały, przez które przechodzą hydrofilowe substancje. Unikalne β -harmonijki warunkują zasadnicze funkcje błony, takie jak stabilność, integralność i przepuszczalność. Poziom ekspresji białek błonowych jest uzależniony od potrzeb komórki bakteryjnej i od czynników środowiska. Białka OMP można podzielić na białka główne (major proteins) oraz białka drugorzędne (minor proteins). Białka główne występują w komórce w dużej liczbie kopi i należą do nich np.: OmpA, OmpF, OmpX, natomiast do białek drugorzędnych należą m.in. białka FhuA i LamB i ich ekspresja w błonie jest zależna od potrzeb komórki [2,3,32]. Białka OMP bakterii Gram-ujemnych pełnią następujące funkcje: biorą udział w adhezji, wchodzi w interakcje z komórkami gospodarza będąc czynnikami wirulencji, uczestniczą w interakcjach z układem odpornościowym gospodarza oraz mogą być receptorami dla fagów oraz kolicyn i mikrocytn [3,32]. Masa cząsteczkowa poryn waha się 28-48 kDa, a kanały tworzone przez poryny w błonie zewnętrznej u różnych bakterii mają średnicę 0,6-2,3 nm [3]. Pokryte wodą kanały porynowe umożliwiają dyfundowanie przez nie różnego typu substancji (z wykluczeniem substancji hydrofobowych) o masie cząsteczkowej od kilkuset do około 5 kDa.

UDZIAŁ BIAŁEK OMP WE WRAŻLIWOŚCI I OPORNOŚCI BAKTERII NA JONY Ag^+ I NANOCZĄSTKI SREBRA Ag^0

Białka błony zewnętrznej wpływają na wrażliwość bakterii na jony (Ag^+) i nanocząstki srebra. Li i wsp. [18] wykazali, że mutacje w genach kodujących poryny wpływają na zmiany wrażliwości szczepu *E. coli* na srebro oraz że poryny są zaangażowane w transport Ag^+ . Radzig i wsp. [25] zbadali wpływ mutacji genów kodujących poryny OmpF oraz OmpC na zmiany wrażliwości *E. coli* na nanocząstki srebra i azotan srebra, $AgNO_3$. W przypadku azotanu srebra mutanty pozbawione poryny OmpF i/lub OmpC były bardziej odporne na jony srebra w stosunku do szczepu dzikiego. Dane te wskazują na udział białek porynowych w transporcie srebra do komórki. Wartości



Tabela 1. Porównanie czynników warunkujących toksyczność oraz oddziaływanie jonów srebra Ag^+ i nanocząstek srebra Ag^0 ze strukturami komórkowymi bakterii [5,13,22,23,29]

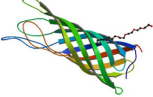
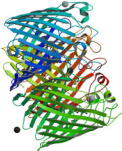
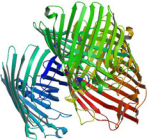
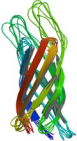
| Postać srebra | Srebro jonowe Ag^+ | Nanocząstki srebra Ag^0 |
|---|--|--|
| | | Obecnie trwa dyskusja odnośnie roli nanocząstek srebra i ich skuteczności przeciwdrobnoustrojowej |
| Czynniki warunkujące skuteczność antybakteryjną | Skuteczność antybakteryjna Ag^+ i jego związków jest wprost proporcjonalna do ilości uwalnianych, aktywnych biologicznie jonów srebra Działanie jonów srebra Ag^+ opisuje się jako oligodynamiczne: działa już w niskich stężeniach. Jony srebra mają najwyższy poziom aktywności przeciwdrobnoustrojowej spośród wszystkich metali ciężkich | Teoria 1: nanocząstka srebra wykazuje minimalną toksyczność i służy głównie jako źródło uwalnianych jonów Ag^+ Teoria 2: dominującym czynnikiem warunkującym działanie antybakteryjne jest bezpośredni kontakt drobnoustroju z nanocząstką srebra Ag^0 , a efektywność antybakteryjna uwalnianych z nanocząstki jonów srebra jest nieznaczna Teoria 3: dominującym czynnikiem warunkującym działanie antybakteryjne jest bezpośredni kontakt drobnoustroju z nanocząstką srebra Ag^0 , a wydzielane jony Ag^+ wzmacniają efekt antybakteryjny |
| Oddziaływanie z osłonami zewnętrznymi bakterii | – tworzenie porów w ścianie komórkowej – wiązanie się ze ścianą komórkową i otoczkami bakteryjnymi – akumulacja w ścianie i błonie komórkowej Efekt: wzrost przepuszczalności osłon komórkowych, niekontrolowany transport jonów, zaburzenia potencjału błonowego, utrata wewnątrzkomórkowego ATP | – generowanie wolnych rodników – tworzenie porów w ścianie komórkowej – akumulacja w błonie komórkowej Efekt: wzrost przepuszczalności osłon komórkowych, niekontrolowany transport jonów, zaburzenia potencjału błonowego, utrata wewnątrzkomórkowego ATP |
| Oddziaływanie z białkami | – wiązanie jonów srebra Ag^+ do grup sulfhydrylowych –SH, aminowych –NH ₂ , karboksylowych –COOH, imidazolowych –C ₃ H ₄ N ₂ , fosforanowych –PO ₄ białek – wiązanie do rybosomów Efekt: inaktywacja enzymów m.in. enzymów łańcucha oddechowego, produkcja wolnych rodników tlenowych (ROS), denaturacja białek, zahamowanie translacji | – wiązanie nanocząstek srebra Ag^0 do grup sulfhydrylowych –SH białek – defosforylacja reszt tyrozyny białek sensorowych Efekt: inaktywacja enzymów m.in. enzymów łańcucha oddechowego, produkcja wolnych rodników tlenowych (ROS), denaturacja białek, zaburzenie modulacji przekazywania sygnałów komórkowych |
| Oddziaływanie z DNA | – interakcje z zasadami azotowymi kwasów nukleinowych Efekt: zahamowanie replikacji | – interakcje z grupami fosforowymi kwasów nukleinowych Efekt: zahamowanie replikacji |

minimalnego stężenia hamującego wzrost bakterii (minimal inhibitory concentration, MIC) dla komórek pozbawionych pewnych białek porynowych wskazują na ich większą oporność względem AgNPs w porównaniu z komórkami szczepów dzikich. Komórki z brakiem białek porynowych wykazują 4-8-krotny wzrost oporności na nanocząstki srebra. To potwierdza wpływ poryn na wrażliwość bakterii na AgNPs [25].

Mechanizmy warunkujące oporność bakterii na metale ciężkie są procesami złożonymi. Powszechne jest występowanie wśród bakterii jednocześnie kilku mechanizmów warunkujących oporność na różne grupy związków, celem przetrwania niekorzystnych

warunków środowiska [6,24]. Pierwsza odnotowana wzmianka o bakteriach opornych na jony srebra pochodzi z 1975 r. i dotyczy determinanty genetycznej uzyskanej ze szczepu *Salmonella* Typhimurium (plazmidu pMG101), wyizolowanego od pacjentów przebywających na oddziale leczenia poparzeń w Massachusetts General Hospital [27]. Niektóre bakterie wydają się mieć naturalną oporność na srebro i są izolowane ze środowisk, w których toksyczność srebra może wywierać na mikroorganizmy presję selekcyjną. Do takich środowisk można zaliczyć m.in. oddziały szpitalne leczenia oparzeń (stosowanie sulfadiazyny srebra i azotanu srebra, jako antyseptyków), kopalnie srebra oraz zlewnie wód związane z przemysłem fotograficznym [28]. Geny decydujące

Tabela 2. Budowa i funkcje przykładowych białek błony zewnętrznej ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych [2,3,15,26,32]

| Białko | Struktura | β -baryłka | Funkcje |
|--------|---|---|---|
| OmpA | monomer (8-niciowa β -baryłka) jedno z białek głównych w błonie zewnętrznej zwija się w strukturę dwudomenową, część N-końcowa przechodzi całą szerokość błony, część C-końcowa znajduje się w przestrzeni peryplazmatycznej |  | wiąże błonę zewnętrzną z peptydoglikanem (białko strukturalne) poryna ogólnej dyfuzji receptor dla fagów K3, M1, O _x 2 receptor dla kolicyn K, L czynnik wirulencji |
| OmpC | trimer (monomer stanowi 16-niciowa β -baryłka) białko homologiczne do OmpF |  | poryna dyfuzji ogólnej receptor dla fagów Me1, T _{ulb} buduje kanały dla kationów |
| OmpX | monomer 8-niciowa β -baryłka syntetyzowane w dużych ilościach w warunkach ekstremalnych |  | białko wiążące toksyny adhezyna |
| OmpF | trimer (monomer stanowi 16-niciowa β -baryłka) jedno z białek głównych |  | poryna dyfuzji ogólnej buduje kanały dla kationów receptor dla fagów K20 receptor dla kolicyn N |

o oporności mikroorganizmów na metale ciężkie, w tym srebro, są umiejscowione głównie na plazmidach [27]. Pierwszy opis molekularnych podstaw oporności bakterii na srebro sporządzono na podstawie plazmidu pMG101 (kodującego m.in białka SilCBA, SilF, SilE oraz SilP). Plazmid pMG101 zawierający także geny oporności na antybiotyki (ampicylina, chloramfenikol, tetracyklina, streptomycyna) i metale ciężkie (srebro, rtęć) jest obecnie jedną z najbardziej szczegółowo poznanych struktur warunkujących oporność bakterii na jony srebra. Białka SilCBA tworzą kompleks błonowy odpowiedzialny za wymianę kationowo-protonową działającą na zasadzie antyportu. Białko błonowe SilA o długości 1048 aminokwasów i składa się z dwóch domen (cytoplazmatycznej oraz peryplazmatycznej), umożliwiających bezpośredni transport jonów srebra do białka błony zewnętrznej - SilC. Funkcją białka SilB jest łączenie białek SilA oraz SilC w funkcjonalną całość [28]. Percival i wsp. [24] wykazali możliwość transferu plazmidu pMG101 do komórek *E. coli*. Komórki z nabytą cechą oporności na srebro wykazywały wzrost w sześciokrotnie wyższym

stężeniu jonów Ag⁺ niż szczepy wrażliwe. Bakterie poddane długotrwałej ekspozycji na wzrastające stężenia metalu wykazywały zmniejszoną przepuszczalność osłon komórkowych wynikającą z utraty głównych białek porynowych oraz aktywnie działający system pomp efflux (obecnie zidentyfikowany jako CusCBFA) [6]. Białko CusC jest białkiem błony zewnętrznej, odpowiedzialnym za aktywny wyrzut jonów Cu²⁺ oraz Ag⁺ u *E. coli* na zewnątrz komórki. W mechanizm warunkujący oporność na metale ciężkie jest zaangażowane również peryplazmatyczne białko SilE, wykazujące 47% podobieństwa do białka warunkującego oporność na miedź u *E. coli* - PcoE. Funkcją białka SilE jest wiązanie jonów srebra na powierzchni komórki, zanim przedostaną się do cytoplazmy. Innym białkiem jest peryplazmatyczne białko pomocnicze SilF. Obecnie wiadomo, że białko SilF wykazuje 50% identyczności z białkiem CusF, którego funkcją jest wiązanie jonów srebra i miedzi, a następnie przekazywanie ich do właściwego transportera Cus-CBA Ag⁺/Cu⁺ działającego na zasadzie pompy efflux. Uważa się, że funkcją białka SilF jest transport jonów srebra do



chemiosmotycznej pompy SilBCA [6]. Białko SilP pełni funkcję błonowej ATP-azy typu P i jest odpowiedzialne za transport jonów srebra z cytoplazmy do przestrzeni peryplazmatycznej. Współdziałanie dwóch pomp efflux, antyportera kationowo-protonowego SilCBA i błonowej ATPazy typu P z peryplazmatycznym białkiem wiążącym Ag^+ , zapewnia komórce silną ochronę przed toksycznym działaniem srebra [7,28]

Odkryte do tej pory mechanizmy oporności na srebro, dotyczyły jego postaci jonowej. Brak jest natomiast informacji na temat rozwoju oporności na srebro drobnoustrojów poddanych ekspozycji na nanocząstki srebra. Wynika to z niejednoznaczności w opisach mechanizmu wrażliwości bakterii na AgNPs. Badania Hsu i wsp. [9] wykazały, że wolne nanocząstki srebra nie wykazują działania antibakteryjnego wobec szczepów mających cechę oporności na jony Ag^+ . Jako przyczynę braku aktywności upatruje się zmianę powierzchni aktywnej nanocząstek, wynikającą z naturalnej tendencji nanocząstek do agregacji. W celu zniwelowania ograniczenia w postaci agregacji jonów srebra i zbadania rzeczywistej skuteczności AgNPs wobec szczepów wykazujących oporność na jony Ag^+ , Su i wsp. [30] zsyntetyzowali nanocząstki srebra immobilizowane na nośniku krzemowym. Wyniki badań wykazały dużą skuteczność antibakterijną nanocząstek osadzonych na nośniku wobec szczepu *E. coli* opornego na jony srebra. W niskich stężeniach immobilizowane AgNPs znacznie ograniczyły przeżywalność bakterii, a w wyższych zupełnie go hamowały [13,30]. Antibakteryjna aktywność nanoform srebra jest częścią badań prowadzonych od 2004 r. w Zakładzie Mikrobiologii Instytutu Genetyki i Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego. W ramach współpracy z badaczami z Instytutu Niskich Temperatur Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu zaprojektowano i zsyntetyzowano nanoformy srebra różniące się właściwościami fizyko-chemicznymi [11,14,31,33]. Przeanalizowano ich antibakterijną skuteczność wobec bakterii izolowanych ze środowiska klinicznego z trudno gojących się ran. Wykazano dużą aktywność preparatów srebra immobilizowanych na nośnikach (SiO_2 , TiO_2 , SiO_2/TiO_2 , hydroksyapatycie, grafenie) wobec testowanych bakterii: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae*. Obecność nośnika w nanokompozycie zapobiega agregacji między atomami srebra, sprzyja zachowaniu dyspersji srebra, a przez to zwiększa jego biologiczną aktywność [4,10,11,14, 31].

Przeprowadzone badania własne dowodzą, że długotrwały kontakt bakterii z podprogowymi stężeniami srebra zawartego w nanoformach zmienia wrażliwość bakterii, co ma także odniesienie w zmianach zachodzących w obrębie proteomu błony zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych (dane prezentowane w postaci doniesienia konferencyjnego [16]). W komórkach szczepu *Enterobacter aerogenes* 323 o zmniejszonej wrażliwości na nanosrebro zaobserwowano utratę białka powierzchniowego o masie około 37 kDa, co odpowiada masie poryny OmpA. Natomiast w komórkach szczepu

Klebsiella pneumoniae ATCC 4352 o zmniejszonej wrażliwości na nanosrebro w proteinogramie zaobserwowano pojawienie się nowego białka o masie około 51,4 kDa, co odpowiada masie białka SilC kodowanego przez plazmid pMG101 zawierającego geny warunkujące oporność na jony srebra. Bez wątplenia udowodniono, że wrażliwość bakterii zmienia się w zależności od czasu działania, stężenia i właściwości fizyko-chemicznych nanoform srebra. Na podstawie analizy proteinogramów można wnioskować, że wrażliwość bakterii na nanoformy srebra jest indywidualną cechą każdego mikroorganizmu i zależy od rodzaju oraz postaci użytego nanokompozytu, jego właściwości fizyko-chemicznych oraz budowy osłon komórkowych.

METODYKA PROTEOMICZNA W ANALIZIE WRAŻLIWOŚCI BAKTERII NA NANOSREBRO

Metoda elektroforezy dwuwymiarowej (Two-Dimensional Electrophoresis, 2-DE) jest jedną z najbardziej efektywnych technik rozdziału elektroforetycznego białek i jest powszechnie wykorzystywana w badaniach nad proteomem bakterii. 2-DE jest wiodącą techniką stosowaną w programach badawczych z zakresu proteomiki i identyfikowania białek z użyciem spektrometrii masowej. 2-DE wykorzystuje się również do badań nad udziałem białek bakteryjnych w procesach stresu środowiskowego, jakim niewątpliwie jest obecność nanocząstek srebra. Badania te mają na celu zaobserwowanie rearanżacji i zmian w ekspresji białek zarówno cytosolowych, jak i membranowych oraz poszukiwanie białka lub grupy białek uczestniczących w odpowiedzi komórki bakteryjnej na czynniki środowiska zewnętrznego, np. nanocząsteczki srebra. Technika 2-DE wykorzystuje się do badania proteomu zarówno bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych. Lok i wsp. [19] wskazują na różnice w proteinogramach zaistniałe po długotrwałym kontakcie komórek *E. coli* z nanoformami srebra. Proteinogramy 2-DE przedstawiają 8 białek, dla których geny wykazują silniejszą ekspresję w wyniku ekspozycji komórki *E. coli* na działanie nanosrebra. W wyniku identyfikacji rozdzielonych elektroforetycznie białek OMP techniką MALDI TOF (matrix assisted laser desorption ionization time of flight) zostały wyróżnione białka błony zewnętrznej OmpA, OmpC i OmpF, OmpA, MetQ oraz białka IbpA, IbpB i podjednostka rybosomu 30S S6.

He i wsp. [8] opisują zmiany w profilu proteomicznym *Pseudomonas aeruginosa* zachodzące w komórkach bakterii w wyniku kontaktu z nanocząstkami srebra immobilizowanymi na nośniku grafenowym. Analiza elektroforetyczna, przeprowadzona z użyciem 2-DE wykazała ekspresję, pod wpływem działania nanocząstek srebra 7 genów *P. aeruginosa*, ekspresja 8 genów została zmniejszona, natomiast 9 genów zahamowana, w porównaniu ze szczepem dzikim *P. aeruginosa* [8].

PODSUMOWANIE

Szeroko rozpowszechnione zastosowanie nanocząstek srebra w otoczeniu człowieka wymaga

wnikliwej analizy wrażliwości bakterii na stosowane preparaty, jej zmienności pod wpływem czynników środowiska, takich jak: stężenie, czas działania, cechy fizyczne i chemiczne nanokompozytów. Ocenie podlegać powinny nie tylko procesy związane z produkcją nanocząstek srebra, ich optymalizacją, ale także oddziaływanie nanomateriałów na organizmy

żywe i środowisko po ich długotrwałym stosowaniu. Przedstawiony przegląd literatury dowodzi udziału białek błony zewnętrznej we wrażliwości bakterii Gram-ujemnych na nanocząstki srebra oraz wyznacza dalsze szlaki badawcze skoncentrowane na poznaniu zależności cech fizyko-chemicznych nanomateriałów i zmian we wrażliwości bakterii.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Achouak W., Heulin T., Pages J.M.: Multiple facets of bacterial porins. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2001; 199: 1-7
- [2] Baj J., Markiewicz Z.: *Biologia molekularna bakterii*. PWN, Warszawa, 2007; 45-56
- [3] Bugła-Płoskońska G., Futoma-Kołoch B., Doroszkiewicz W.: Rola białek błony zewnętrznej w oddziaływaniach bakterii Gram-ujemnych z organizmem gospodarza. *Postępy Mikrobiol.*, 2007; 46: 139-152
- [4] Bugła-Płoskońska G., Leszkiewicz A., Borak B., Jasiorski M., Drulis-Kawa Z., Baszczuk A., Maruszewski K., Doroszkiewicz W.: Bactericidal properties of silica particles with silver islands located on the surface. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2007; 29: 746-748
- [5] Fabrega J., Fawcett S.R., Renshaw J.C., Lead J.R.: Silver nanoparticle impact on bacterial growth: Effect of pH, concentration, and organic matter. *Env. Sci. Tech.*, 2009; 43: 7285-7290
- [6] Franke S., Grass G., Rensing C., Nies D.H.: Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 2003; 185: 3804-3812
- [7] Gupta A., Phung L.T., Taylor D.E., Silver S.: Diversity of silver resistance genes in IncH incompatibility group plasmid. *Microbiology*, 2001; 147: 3393-3402
- [8] He T., Liu H., Zhou Y., Yang J., Cheng X., Shi H.: Antibacterial effect and proteomic analysis of graphene-based silver nanoparticles on a pathogenic bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. *Biometals*, 2014; 27: 673-682
- [9] Hsu S.H., Tseng H.J., Lin Y.C.: The biocompatibility and antibacterial properties of waterborne polyurethane-silver nanocomposites. *Biomaterials*, 2010; 31: 6796-6808
- [10] Jasiorski M., Leszkiewicz A., Brzeziński S., Bugła-Płoskońska G., Malinowska G., Borak B., Karbownik I., Baszczuk A., Stręk W., Doroszkiewicz W.: Textile with silver silica spheres: its antimicrobial activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 2009; 51: 330-334
- [11] Kędziora A., Gerasymchuk Y., Sroka E., Bugła-Płoskońska G., Doroszkiewicz W., Rybak Z., Hreniak D.C., Wilgusz R., Stręk W.A.: Wykorzystanie materiałów opartych na częściowo zredukowanym tlenku grafenu z nanocząstkami srebra jako środków bakteriostatycznych i bakterioobójczych. *Polim. Med.*, 2013; 43: 129-134
- [12] Kędziora A., Gorzelańczyk K., Bugła-Płoskońska G.: Positive and negative aspects of silver nanoparticles usage. *Biol. Int.*, 2013; 53: 67-76
- [13] Kędziora A., Sobik K.: Oporność bakterii na srebro – problem stary, czy nowy? *Kosmos*, 2013; 62: 301
- [14] Kędziora A., Stręk W., Kępiński L., Bugła-Płoskońska G., Doroszkiewicz W.: Synthesis and antibacterial activity of novel titanium dioxide doped with silver. *J. Sol-Gel. Sci. Technol.*, 2012; 62: 79-86
- [15] Koebnik R., Locher K.P., Van Gelder P.: Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol. Microbiol.*, 2000; 37: 239-253
- [16] Krzyżewska E., Kędziora A., Dudek B., Pawlak A., Stręk W., Doroszkiewicz W., Bugła-Płoskońska G.: Analiza zmian w proteomie błony zewnętrznej *K. pneumoniae* i *E. aerogenes* po długotrwałej ekspozycji na nanocząstki srebra różniące się parametrami fizyko-chemicznymi. III Ogólnopolska Konferencja Naukowo-Szkoleniowa „Wektory i patogeny w przeszłości i przyszłości” 2014; Wrocław
- [17] Langauer-Lewowicka H., Pawlas K.: Nanocząstki, nanotechnologia – potencjalne zagrożenia środowiskowe i zawodowe. *Environ. Med.*, 2014; 17: 7-14
- [18] Li X.Z., Nikaido H., Williams K.E.: Silver-resistant mutants of *Escherichia coli* display active efflux of Ag⁺ and are deficient in porins. *J. Bacteriol.*, 1997; 179: 6127-6132
- [19] Lok C.N., Ho C.M., Chen R., He Q.Y., Yu W.Y., Sun H., Tam P.K., Chiu J.F., Che C.M.: Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *J. Proteome Res.*, 2006; 5: 916-924
- [20] Mijnenonckx K., Leys N., Mahillon J., Silver S., Van Houdt R.: Antimicrobial silver: uses, toxicity and potential for resistance. *Biometals*, 2013; 26: 609-621
- [21] Mroczek-Sosnowska N., Jaworski S., Siennicka A., Gondek A.: Unikalne właściwości nanocząstek srebra. *Polskie Drobniarstwo*, 2013; 2: 6-8
- [22] Navarro E., Piccapietra F., Wagner B., Marconi F., Kaegi R., Odzak N., Sigg L., Behra L.: Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Env. Sci. Tech.*, 2008; 42: 8959-8964
- [23] Pal S., Tak Y.K., Song J.M.: Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007; 73: 1712-1720
- [24] Percival S.L., Bowler P.G., Russell D.: Bacterial resistance to silver in wound care. *J. Hosp. Infect.*, 2005; 60: 1-7
- [25] Radzig M.A., Nadtochenko V.A., Koksharova O.A., Kiwi J., Lipasova V.A., Khmel I.A.: Antibacterial effects of silver nanoparticles on gram-negative bacteria: influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 2013; 102: 300-306
- [26] RCSB Protein Data Bank. <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> (05.02.2015)
- [27] Silver S.: Bacterial resistances to toxic metal ions - a review. *Gene*, 1996; 179: 9-19
- [28] Silver S.: Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2003; 27: 341-353
- [29] Sotiriou G.A., Pratsinis S.E.: Antibacterial activity of nanosilver ions and particles. *Environ. Sci. Technol.*, 2010; 44: 5649-5654
- [30] Su H.L., Lin S.H., Wei J.C., Pao I.C., Chiao S.H., Huang C.C., Lin S.Z., Lin J.J.: Novel nanohybrids of silver particles on clay platelets



for inhibiting silver-resistant bacteria. PLoS One, 2011; 6: e21125

[31] Wiglusz R.J., Kędziora A., Łukowiak A, Doroszkiewicz W., Strek W.: Hydroxyapatites and europium(III) doped hydroxyapatites as a carrier of silver nanoparticles and their antimicrobial activity. J. Biomed. Nanotechnol., 2012; 8: 605-612

[32] Witkowska D., Bartyś A., Gamian A.: Białka osłony komórkowej pałeczek jelitowych i ich udział w patogenności oraz odporności

przeciwbakteryjnej. Postępy Hig. Med. Dośw., 2009; 63: 176-199

[33] Wysocka K., Leszkiewicz A., Kowalczyk J., Stręk W., Doroszkiewicz W., Podbielska H.: Nanomateriały krzemionkowe domieszkowane srebrem i ich możliwe zastosowania w biomedycynie. Acta Bio-Opt. Inf. Med., 2007; 13: 180-183

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.