

**Autoreferat przedstawiający osiągnięcie  
naukowe zgłaszane jako przedmiot  
postępowania habilitacyjnego**

Dr Joanna Nakonieczna

Identyfikacja czynników komórkowych istotnych w procesie  
fotoinaktywacji drobnoustrojów oraz opracowanie strategii  
zwiększania jej efektywności

Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii  
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu  
Medycznego

Gdańsk 2018

**1. Imię i nazwisko:** Joanna Nakonieczna

Zakład Diagnostyki Molekularnej  
Katedra Biotechnologii  
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed  
Ul. Antoniego Abrahama 58  
80-307 Gdańsk  
Polska  
Tel.: 0048 58 5236329  
Tel.kom.: 0048 692102485  
Fax: 0048 58 5236426  
e-mail: [joanna.nakonieczna@biotech.ug.edu.pl](mailto:joanna.nakonieczna@biotech.ug.edu.pl)

**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:**

2007 r. doktor nauk biologicznych, specjalność biochemia, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed, Gdańsk, Polska

Tytuł rozprawy doktorskiej: Analiza strukturalna i funkcjonalna enzymu restrykcyjno-modyfikacyjnego MmeI z *Methylophilus methylotrophus*.

Promotor pracy: prof. dr hab. Tadeusz Kaczorowski (Wydział Biologii UG)

Recenzenci w przewodzie doktorskim:

prof. dr hab. Andrzej Piekarowicz (Wydział Biologii Uniwersytet Warszawski)

prof. dr hab. Jarosław Marszałek (Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed)

2013 r. świadectwo ukończenia studiów podyplomowych Zarządzanie Projektem Badawczym, Akademia Morska w Gdyni, Wydział Przedsiębiorczości i Towaroznawstwa.

2000 r. magister biotechnologii, specjalność biologia molekularna, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed, Gdańsk, Polska

**3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu**

2007 – obecnie: nauczyciel akademicki (adiunkt); Zakład Diagnostyki Molekularnej, Katedra Biotechnologii, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed

2006 – 2007 r.: pracownik techniczny, Katedra Biotechnologii, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed

2000 – 2006 r.: słuchaczka studium doktoranckiego przy Wydziale Chemii UG

**4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. W Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.)**

**(A) Tytuł osiągnięcia naukowego:**

Identyfikacja czynników komórkowych istotnych w procesie fotoinaktywacji drobnoustrojów oraz opracowanie strategii zwiększania jej efektywności.

**(B) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego**

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl jednotematyczny, który obejmuje 8 prac (1 praca przeglądowa i 7 prac eksperymentalnych) pod tytułem wskazanym w punkcie 4A. Prace te obejmują okres 2010-2018 i wszystkie były publikowane po obronie pracy doktorskiej. We wszystkich pracach składających się na osiągnięcie naukowe jestem autorem korespondencyjnym.

IF – współczynnik oddziaływania z roku opublikowania pracy; IF<sub>5-letni</sub> – 5-letni współczynnik oddziaływania; MNiSW – punktacja czasopism wg Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego; Lc – Liczba cytowań.

1. Taraszkiewicz A, Fila G, Grinholc M, **Nakonieczna J.** (2013) Innovative strategies to overcome biofilm resistance. (review)  
BIOMED RES INT, 2013:150653.  
**IF = 2,70; IF<sub>5-letni</sub> = 2,75; MNiSW = 25 pkt; Lc = 52.**
2. **Nakonieczna J,** Michta E, Rybicka M, Grinholc M, Gwizdek-Wiśniewska A, Bielawski KP. (2010) Superoxide dismutase is upregulated in *Staphylococcus aureus* following protoporphyrin-mediated photodynamic inactivation and does not directly influence the response to photodynamic treatment.  
BMC MICROBIOLOGY, 10, 323.  
**IF = 2,96; IF<sub>5-letni</sub> = 3,06; MNiSW = 30 pkt; Lc = 36.**
3. Taraszkiewicz A., Grinholc M., Bielawski KP., Kawiak A., **Nakonieczna J.** (2013) Imidazoacridinone derivatives as efficient sensitizers in photoantimicrobial chemotherapy.  
APPL. ENVIRON. MICROB., 79(12):3692-702.  
**IF = 3,95; IF<sub>5-letni</sub> = 4,48; MNiSW = 40 pkt; Lc = 4.**
4. Taraszkiewicz A., Szewczyk G., Sarna T., Bielawski K.P., **Nakonieczna J.** (2015) Photodynamic inactivation of *Candida albicans* with imidazoacridinones: influence of irradiance, photosensitizer uptake and reactive oxygen species generation.  
PLOS ONE, 8;10(6):e0129301.  
**IF = 3,05; IF<sub>5-letni</sub> = 3,35; MNiSW = 40 pkt; Lc = 7.**
5. **Nakonieczna J.,** Kossakowska-Zwierucho M., Filipiak M., Hewelt-Belka W., Grinholc M., Bielawski K.P. (2016) Photoinactivation of *Staphylococcus aureus* using protoporphyrin IX: the role of haem-regulated transporter HrtA.  
APPL. MICROBIOL. BIOTECHNOL. 100(3):1393-405.  
**IF = 3,42; IF<sub>5-letni</sub> = 3,71; MNiSW = 35 pkt; Lc = 3.**

6. Kossakowska-Zwierucho M, Kaźmierkiewicz R, Bielawski KP, **Nakonieczna J.** (2016) Factors determining *Staphylococcus aureus* susceptibility to photoantimicrobial chemotherapy: RsbU activity, staphyloxanthin level, and membrane fluidity. FRONTIERS IN MICROBIOL. 19; 7:1141.  
**IF = 4,07; IF<sub>5-letni</sub> = 4,55; MNiSW = 35 pkt; Lc = 1.**
7. Ogonowska P, Woźniak A, Pierański MK, Wasylew T, Kwiek P, Brasel M, Grinholc M, **Nakonieczna J.** (2018) Application and characterization of new light-emitting diodes for photodynamic inactivation. LICHTING RES & TECH. 0:1-13.  
**IF = 1,92; IF<sub>5-letni</sub> = 1,95; MNiSW = 35 pkt; Lc = 0.**
8. **Nakonieczna J,** Wolnikowska K, Ogonowska P, Neubauer D, Bernat A, Kamysz W. (2018) Rose Bengal-mediated photoinactivation of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* is enhanced in the presence of antimicrobial peptides. FRONTIERS IN MICROBIOL. 20; 9:1949.  
**IF = 4,01; IF<sub>5-letni</sub> = 4,55 MNiSW = 35 pkt, Lc = 0.**

Sumaryczny IF publikacji wchodzących w skład cyklu = **26,08**

Sumaryczny IF<sub>5-letni</sub> publikacji wchodzących w skład cyklu = **28,4**

Sumaryczna wartość punktów MNiSW publikacji wchodzących w skład cyklu = **275**

**(C) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich potencjalnego wykorzystania.**

*Wstęp*

Po wprowadzeniu do leczenia penicyliny a następnie szeregu nowych antybiotyków, wydawało się, że bakteryjne choroby zakaźne znalazły się pod kontrolą. W ostatnich latach obserwujemy jednak znaczny wzrost odsetka izolatów opornych na antybiotyki stosowane w leczeniu. Jednocześnie liczba nowych leków przeciwdrobnoustrojowych nie wzrasta w tempie wystarczającym do efektywnej kontroli zakażeń bakteriami lekoopornymi (Ventola 2015). Podobna sytuacja dotyczy grzybów, np. *Candida albicans*, wśród których obserwuje się selekcję szczepów opornych na powszechnie stosowane leki przeciwgrzybiczne takie jak azole czy echinokandyny (Perlin et al. 2017). Szacuje się, że liczba zgonów na świecie będących skutkiem zjawiska oporności wzrośnie z obecnych 700 000 do 10 mln rocznie do roku 2050 (O'Neill 2016). Z tego powodu poszukuje się metod alternatywnych, które będą skuteczne wobec lekoopornych mikroorganizmów. Światowe gremia, w tym Światowa Organizacja Zdrowia (WHO), Europejskie

Centrum ds. Zapobiegania i Kontroli Chorób (ECDC), Unia Europejska (EU) zwracają uwagę na to, że nowe metody powinny zapobiegać dalszej selekcji szczepów opornych, na przykład poprzez działanie na wiele celów komórkowych, w odróżnieniu od działających na jeden konkretny cel/mechanizm antybiotyków (Wainwright et al. 2017). Przykładem takiej metody, która działa na wiele celów komórkowych oraz takiej, która jest skuteczna wobec szczepów wielolekoopornych jest fotodynamiczna inaktywacja drobnoustrojów (ang. antimicrobial photodynamic inactivation - aPDI).

Fotodynamiczna inaktywacja jest to metoda polegająca na zastosowaniu światła wraz z drobnocząsteczkowymi związkami aktywowanymi światłem widzialnym (tzw. fotouczulaczy) w celu zabicia komórek mikroorganizmów. W literaturze anglojęzycznej proces ten funkcjonuje pod nazwą aPDI (ang. *antimicrobial photodynamic inactivation*) lub PACT (ang. *photoantimicrobial chemotherapy*) lub PDT (ang. *photodynamic therapy*), przy czym ostatnia nazwa przyjęła się w odniesieniu do fotoinaktywacji komórek zmienionych nowotworowo. Pierwsze doniesienie dotyczące efektu aPDI pochodzi z roku 1904, kiedy pokazano bójcze działanie barwników akrydynowych wobec gatunku *Paramecium caudatum* po ekspozycji na światło słoneczne (Raab 1904). Rok później opublikowano wyniki działania fotouczulaczy na komórki nowotworowe (Jesionek 1905), a samo zjawisko określono jako „fotodynamiczne”, wskazując jednocześnie na istotny w nim udział tlenu. Metoda ta jest zatem znana o wiele dłużej niż obecnie wykorzystywane klasyczne antybiotyki.

#### *Podstany działania aPDI*

Zasada działania aPDI opiera się na współdziałaniu 3 elementów: (i) nietoksycznego niskocząsteczkowego związku fotouczulającego, (ii) światła w zakresie zdolnym do wzbudzenia związku fotouczulającego (najczęściej jest to światło widzialne lub podczerwień), (iii) tlenu cząsteczkowego. Po absorpcji fotonu światła, związek fotouczulający przechodzi do wysokoenergetycznego stanu wzbudzonego. Nadmiar energii może zostać wyemitowany w postaci fluorescencji lub ciepła, co sprowadza cząsteczkę fotouczulacza ponownie do stanu podstawowego. Alternatywną ścieżką jest konwersja do metatrwałego stanu tripletowego. Ze stanu tripletowego związek może powrócić do stanu podstawowego poprzez dwa mechanizmy (typ I i typ II), w wyniku których generowane są reaktywne formy tlenu (RFI), będące kluczowymi czynnikami bójczymi w procesie aPDI. W reakcji typu I dochodzi do transferu elektronu ze związku fotouczulającego na sąsiadujący substrat, co prowadzi w dużej mierze do powstania anionorodnika ponadtlenkowego ( $O_2^{\bullet-}$ ). Dwie cząsteczki  $O_2^{\bullet-}$  podlegają procesowi dysmutacji

tworząc nadtlenek wodoru ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), który jest z kolei prekursorem najbardziej reaktywnej formy tlenu – rodnika hydroksylogowego ( $\text{HO}^\bullet$ ). W reakcji typu II dochodzi do transferu energii (nie elektronu) bezpośrednio na tlen cząsteczkowy, co prowadzi do powstania tlenu singletowego ( $^1\text{O}_2$ ). Powstające w ten sposób RFT mają działanie bójcze względem komórek szybko dzielących się, np. drobnoustrojów, komórek zmienionych nowotworowo. Po oddaniu energii związek fotouczulający powraca do stanu podstawowego i jest gotowy do wejścia w kolejne cykle prowadzące do wygenerowania większej ilości RFT. Dzięki temu jedna cząsteczka związku fotouczulającego może wygenerować tysiące RFT zanim związek ulegnie inaktywacji. Ogromna większość związków fotouczulających działa zarówno według reakcji typu I, jak i typu II a przewaga któregoś z nich zależy od struktury chemicznej związku (Bacellar et al. 2015; Baptista et al. 2017). Dla przykładu, fenotiazyny (błękit metylenowy, błękit toluidynowy) działają głównie według mechanizmu typu I, prowadzącego do wytworzenia wolnych rodników, natomiast tetrapiole (porfiryny, chloryny) czy ksanteny (róż bengalski) są wydajnymi producentami tlenu singletowego.

#### *Źródła światła stosowane w aPDI*

Odpowiednie źródło światła stanowi nieodłącznie ważny element aPDI. W literaturze opisano 3 podstawowe źródła światła, które są wykorzystywane w aPDI: lasery (np. argonowe, neodymowe), diody (ang. *Light Emitting Diodes*, LED) i lampy wyladowcze (halogenowe, kwarcowe, ksenonowe). Każdy rodzaj źródła światła ma swoje ograniczenia. Lasery charakteryzują się wysoką monochromatycznością i wytwarzają światło koherentne o wąskim strumieniu, dzięki czemu mogą być łączone z urządzeniami endoskopowymi dostarczającymi światło w trudno dostępne miejsca wewnątrz ciała. Ogromnym ograniczeniem w ich stosowaniu są jednak wysokie koszty. Dlatego coraz częściej zastępuje się je źródłami światła LED. Spektrum światła produkowanego przez LED jest szersze niż w przypadku laserów, a koszt produkcji znacznie niższy. Ogromną zaletą LED jest możliwość konstrukcji paneli diodowych, które odzwierciedlają krzywizny ciała, dostarczając zdefiniowaną porcję energii w sposób homogenny na dużą powierzchnię. Najtańsze są lampy halogenowe, które dzięki zastosowaniu filtrów optycznych mogą być wykorzystane do wzbudzenia każdego rodzaju związku fotouczulającego. Produkują one jednak dużo ciepła, co jest poważnym ograniczeniem w stosowaniu klinicznym tego typu źródeł światła oraz nie mogą być stosowane z włóknami optycznymi (Nagata et al. 2012). Rodzaj źródła światła ma znaczenie drugorzędne, natomiast ważna jest jego moc i spektrum emisji, które musi być zgodne z zakresem absorpcji określonego związku fotouczulającego. Warto nadmienić, że w ostatnich latach coraz większą uwagę przykładają się do kwestii precyzyjnej dozymetrii. W klinicznym zastosowaniu aPDI ważne

jest, aby ściśle i precyzyjnie kontrolować dawkę dostarczanego światła. Jak dotąd nie skonstruowano urządzeń pomiarowych, dzięki którym można monitorować energię świetlną dostarczoną do tkanki (a nie wyprodukowaną przez źródło światła), co jest jednym z ograniczeń w powszechnym stosowaniu metody fotodynamicznej.

#### *Cele komórkowe aPDI*

Podstawową zaletą metody aPDI jest jej nieselektywny sposób działania, czyli możliwość oddziaływania fotogenerowanych RFT z praktycznie każdą strukturą komórkową, taką jak ściana komórkowa, błona cytoplazmatyczna, wewnątrzkomórkowe struktury białkowe, czy DNA [Almeida 2015]. To, która struktura komórkowa ulegnie fotooksydacji w efekcie aPDI, zależy w głównej mierze od lokalizacji komórkowej fotouczulacza oraz od tego, na jaką odległość wygenerowane RFT są w stanie się przemieścić (Maisch et al. 2007). Możliwe są trzy podstawowe scenariusze działania fotouczulacza (Alves et al. 2014):

- (i) pozostaje on na zewnątrz komórki bakteryjnej, nie wiążąc się ściśle z komórką,
- (ii) wiąże się z osłonami komórkowymi (np. błoną cytoplazmatyczną, ścianą komórkową) doprowadzając do ich zniszczenia,
- (iii) wiąże się z komórką, a następnie wnika do jej wnętrza na zasadzie dyfuzji lub aktywnego transportu powodując zniszczenia cząsteczek wewnątrzkomórkowych (białek, DNA).

Liczba badań dotyczących lokalizacji fotouczulaczy w komórkach jest dość ograniczona, a niektóre publikowane dane wydają się sprzeczne, np. dla fotouczulacza TMPyP [toluenosulfonian (5,10,15,20-tetrakis (1-metylo-4-pirydynio) porfiryny)] pokazano, że nie wnika on do komórek bakteryjnych (Gollmer et al. 2017; Preuss et al. 2013), w innym badaniu wykazano, że jest związany ze ścianą komórkową i DNA (Ragas et al. 2010). Z kolei dla fotouczulaczy z grupy fenotiazyn (np. błękitu metylenowego) pokazano, że wnikają do wnętrza komórek bakteryjnych, a następnie są z nich usuwane poprzez działanie pomp typu „efflux” (Tegos et al. 2008).

#### *Zastosowanie aPDI w medycynie*

Terapia fotodynamiczna (PDT) jako metoda leczenia nowotworów została zatwierdzona już wiele lat temu do leczenia raka pęcherza (po raz pierwszy w Kanadzie w 1993 r.), raka przelyku (w USA w roku 1995), a potem raka płuc (1998 r.) i przelyku Barretta (2003 r.) w oparciu o pochodne porfiryne (np. Photofrin®). Obecnie zakres chorób leczonych fotodynamicznie został



poszerzony o kolejne wskazania przeciwnowotworowe takie jak: rak głowy, szyi, jamy brzusznej, klatki piersiowej, mózgu, skóry, piersi, jelita, szyjki macicy (Ormond and Freeman 2013). Do leczenia pacjentów zatwierdzono kolejne fotouczulacze, będące mieszaniną oligomerów porfiryńowych: Photosan-3<sup>®</sup>, Photogem<sup>®</sup> w Rosji i Brazylii, a także w krajach Unii Europejskiej. Obecnie liczba dostępnych na rynku fotouczulaczy uległa poszerzeniu o kolejne związki, np. Foscan<sup>®</sup> (temoporfina, meta-tetrahydroksyfenylchloryna, mTHPC; Biolitec AG), Visudyne<sup>®</sup> (verteporfina, benzoporfiryne, BPD-MA; Novartis Pharmaceuticals), Levulan<sup>®</sup> (kwas 5-aminolewulanowy, ALA; DUSA Pharmaceuticals, Inc.), Metvix<sup>®</sup> (metylowa pochodna kwasu aminolewulanowego, M-ALA; PhotoCure ASA). Ogromna większość tych związków ma zastosowanie w onkologii. Dwa związki fotouczulające są zatwierdzone do leczenia ciężkich postaci trądziku pospolitego, tj. schorzenia o etiologii bakteryjnej. Coraz więcej grup badawczych pracuje nad związkami fotouczulającymi dedykowanymi do zwalczania drobnoustrojów. Największą dziedziną medycyny, w której aPDI wykazuje dużą skuteczność jest dermatologia i stomatologia. Miejskowy charakter schorzeń dermatologicznych i stomatologicznych daje możliwość łatwej aplikacji zarówno fotouczulacza jak i światła, co w konsekwencji prowadzi do efektywnego i kontrolowanego wyleczenia. Na rynku medycznym dostępny jest system Periowave<sup>®</sup> (Ondine Biomedical Inc., Kanada), składający się ze związku fotouczulającego (błękit metylenowy) i źródła światła (660nm), który jest dedykowany leczeniu ostrych zapaleń przyzębia, próchnicy zębów, choroby endodontycznej. Należący do tej samej grupy, co błękit metylenowy, związek PPA904 badano w leczeniu chronicznych owrzodzeń uzyskując bardzo dobre efekty terapeutyczne (Brown 2012; Morley et al. 2013). Obecnie prowadzone są badania kliniczne na grupie dzieci (pacjenci onkologiczni poddani chemioterapii) nad wykorzystaniem aPDI w leczeniu zapalenia śluzówki jamy ustnej (NCT02555501), a także badania nad zastosowaniem aPDI w leczeniu przewlekłego zapalenia zatok przynosowych (NCT01854619) czy dezynfekcji skóry (NCT01981460). Wymienione badania kliniczne przeprowadzane są w oparciu o zastosowanie znanych od wielu lat związków fenotiazynowych (błękitu metylenowego, błękitu toluidynowego). Obecnie poszukuje się nowych związków fotouczulających, które wykazywałyby lepsze od fenotiazyn właściwości fizyko-chemiczne (brak agregacji w roztworach wodnych) oraz właściwości biologiczne (wysoka efektywność względem drobnoustrojów przy jednoczesnym braku toksyczności wobec komórek ludzkich). Poszukuje się takich związków, które będą efektywne wobec tzw. wymagających gatunków, tj. bakterii Gram ujemnych, drożdży, czy też biofilmu tworzonego przez mikroorganizmy, który ze względu na swoją strukturę i właściwości jest bardzo trudny do eradykacji. Istotne informacje na temat podstaw działania aPDI, modeli *in vitro* oraz *in vivo*

opisanych w literaturze dotyczących aPDI, ze szczególnym uwzględnieniem biofilmu bakteryjnego zawarłam w pracy przeglądowej **P.1**.

Aby stosować nowe związki fotouczulające, których wysoka efektywność względem wielolekoopornych patogenów ludzkich została udowodniona w badaniach *in vitro* czy też z wykorzystaniem przedklinicznych modeli *in vivo*, potrzebne są systematyczne badania dotyczące mechanizmów działania określonych związków fotouczulających. Ciągłe brakuje odpowiedzi na szereg pytań pozwalających na zrozumienie wewnątrzkomórkowych procesów składających się na mechanizm działania aPDI oraz czynników komórkowych biorących udział w odpowiedzi na stres fotooksydacyjny.

**Z wyżej wymienionych powodów celem moich badań, których wyniki złożyły się na prezentowane osiągnięcie naukowe była identyfikacja czynników komórkowych odpowiadających za efektywność aPDI.** W momencie rozpoczęcia badań składających się na przedstawione osiągnięcie znakomita większość publikowanych prac dotyczyła analiz efektywności działania określonych związków fotouczulających *in vitro* na wybranych gatunkach mikroorganizmów. Moje zainteresowanie skupiłam na zgleźbieniu roli czynników potencjalnie chroniących komórkę bakteryjną (enzymy antyoksydacyjne, czynnik sigmaB, transportery hemu, karotenoidy błonowe) przed warunkami stresowymi generowanymi przez aPDI. Wybór tych czynników do analiz w moim układzie modelowym był zasadny o tyle, że aPDI jest procesem, który zachodzi z udziałem reakcji wolnorodnikowych. Z kolei wybór białek transportujących hem podyktowany był rodzajem fotouczulacza, który wykorzystałam w analizach. Związkiem fotouczulającym, który wykorzystywałam w większości analiz była protoporfiryna IX, czyli cząsteczką będącą strukturalnym analogiem hemu pozbawionym jonów żelaza. Ponadto znaczna większość związków fotouczulających zatwierdzonych do leczenia ludzi to pochodne porfiryne. Tę część mojego osiągnięcia zawarłam w omówionych poniżej pracach **P.2, P.3, P.4**. Równoległym nurtem badawczym, który realizowałam w ramach moich zainteresowań naukowych była charakterystyka nowych związków przeciwdrobnoustrojowych pod kątem ich przydatności w aPDI, przy czym szczególnie skupiłam się na analizie gatunku *C. albicans* (prace **P.5, P.6**). Swoje zainteresowania badawcze skupiłam również na poprawie efektywności aPDI poprzez funkcjonalizację działania związków fotouczulających za pomocą przeciwdrobnoustrojowych peptydów (**P.8**). Z tego powodu, że światło jest niezbędnym elementem aPDI, interesowało mnie również badanie właściwości źródeł i parametrów fizycznych strumienia światła w celu precyzyjnej kontroli i możliwości uzyskania najlepszego efektu aPDI (**P.7**).

Moje osiągnięcie przedstawiam jako cykl publikacji pod wspólnym tytułem: „**Identyfikacja czynników komórkowych istotnych w procesie fotoinaktywacji drobnoustrojów oraz opracowanie strategii zwiększania jego efektywności.**” Prace składające się na przedstawione osiągnięcie były realizowane w Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii UG i GUMed. Finansowane były w głównej mierze ze środków Narodowego Centrum Nauki oraz ze środków Uniwersytetu Gdańskiego. W obydwu przypadkach badania wykonywałam w ramach realizacji projektów, których byłam kierownikiem.

### **Omówienie szczegółowe prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego**

**P. 1** Taraszkiewicz A, Fila G, Grinholc M, **Nakonieczna J.** (2013) Innovative strategies to overcome biofilm resistance. (praca przeglądowa) BIOMED RES INT, 2013:150653

#### **Cel naukowy pracy:**

Celem pracy był przegląd literatury dotyczący efektywności aPDI względem gatunków patogenów ludzkich hodowanych w formie kultur planktonicznych jak i tworzących biofilm.

#### **Syntetyczny opis pracy i jej znaczenie:**

Praca zawiera przegląd literatury dotyczący efektywności aPDI względem głównych patogenów ludzkich: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*. Przede wszystkim skupiłam się na przedstawieniu biofilmu jako tej struktury, która jest związana z infekcjami chronicznymi pacjentów, infekcjami pacjentów o obniżonej odporności lub kolonizacją powierzchni medycznych, czy urządzeń szpitalnych. W pracy przedstawiłam sposób formowania biofilmu, jego właściwości i problemy związane z opornością biofilmu na klasyczne traktowanie przeciwdrobnoustrojowe. Zaproponowałam metodę aPDI jako efektywną alternatywę wobec antybiotyków, która jest skuteczna wobec mikroorganizmów tworzących biofilm. W dalszym etapie zebrałam i usystematyzowałam wiedzę dotyczącą różnych związków, które wykazywały efektywność wobec biofilmu tworzonego przez Gram-dodatnie, Gram-ujemne bakterie oraz grzyby. Do tej grupy związków należą enzymy (DnazaI, lizostafina,  $\alpha$ -amylaza, itd.), nanocząsteczki srebra, ekstrakty roślinne, czy mniej kojarzone z tego typu zastosowaniami: ibuprofen, kwas mlekowy, chitozan. Jako ciekawą propozycję wskazałam możliwość synergistycznego działania pomiędzy wymienionymi związkami a antybiotykami lub łączenie związków o aktywności naruszającej strukturę biofilmu z działaniem aPDI.

**P.2 Nakonieczna J,** Michta E, Rybicka M, Grinholc M, Anna Gwizdek-Wiśniewska, Bielawski KP. (2010) Superoxide dismutase is upregulated in *Staphylococcus aureus* following protoporphyrin-mediated photodynamic inactivation and does not directly influence the response to photodynamic treatment. BMC MICROBIOLOGY, 10, 323.

#### **Cel naukowy pracy:**

Powstające w dużej ilości RFT (np. generowane przez neutrofile gospodarza w czasie infekcji organizmu) wywołują w komórce bakteryjnej stres oksydacyjny. Komórki bronią się przed nim wytwarzając wysoko wyspecjalizowane enzymy detoksykujące RFT - dysmutazy ponadtlenkowe (SOD), katalazy, peroksydazy, a także glutation (Staerck et al. 2017). Pytanie postawione w pracy brzmiało, czy dzięki tym enzymom bakterie mogą adoptować się do warunków stresu fotooksydacyjnego generowanego w wyniku aPDI? W momencie rozpoczęcia prac związanych z przedstawianym osiągnięciem, zagadnienie to nie było badane.

Celem pracy było zbadanie roli enzymów antyoksydacyjnych – dysmutaz ponadtlenkowych SodA i SodM u gronkowca złocistego w ochronie przed aPDI. Z wcześniejszych badań prowadzonych w Zakładzie Diagnostyki Molekularnej wynikało, że mikroorganizmy należące do tego samego gatunku w różny sposób odpowiadają na aPDI. Efektywność aPDI wahała się od 20% do 99,999% redukcji liczby żywych bakterii (Grinholc et al. 2008). Ponieważ podstawową funkcją dysmutaz ponadtlenkowych jest obrona komórek przed stresem oksydacyjnym, oczekiwałam korelacji pomiędzy obecnością genów *sod* a efektywnością aPDI. W ramach tej pracy chciałam sprawdzić, czy SodA i/lub SodM są istotnymi czynnikami odpowiedzi bakterii na aPDI z wykorzystaniem protoporfiryny IX jako związku fotouczulającego.

### **Syntetyczny opis uzyskanych wyników:**

W doświadczeniach posłużyłam się mutantami *S. aureus* pozbawionymi genów kodujących dysmutazę ponadtlenkową A ( $\Delta sodA$ ) i dysmutazę ponadtlenkową M ( $\Delta sodM$ ), oraz podwójnymi mutantami pozbawionymi obu genów kodujących omawiane białka ( $\Delta sodA\Delta sodM$ ). Okazało się, że w typowych warunkach eksperymentalnych nie obserwowałam różnic w efektywności aPDI w stosunku do analizowanych mutantów oraz szczepu typu dzikiego. Dopiero po usunięciu jonów  $Mn^{2+}$  ze środowiska reakcji zaobserwowałam znaczne różnice w efektywności aPDI. Co ciekawe, tylko mutant pozbawiony całkowitej aktywności Sod nie przeżywał w warunkach eksperymentu. Jeśli szczep *S. aureus* pozbawiony był tylko jednej aktywności Sod, obecność drugiej była wystarczająca dla ochrony komórki przed generowanym stresem fotooksydacyjnym. Świadczy to o tym, że dysmutazy ponadtlenkowe nie są odpowiedzialne za obserwowane różnice w efektywności aPDI, przynajmniej w naszych warunkach eksperymentalnych, gdzie jako fotouczulacza użyliśmy protoporfirynę IX, a do jej wzbudzenia światła czerwonego (624nm) lub niebieskiego (411nm).

W kolejnym etapie prezentowanej pracy sprawdziłam, czy aktywność dysmutaz wewnątrzkomórkowych oraz/lub ich ilość zmienia się w efekcie aPDI. Aby odpowiedzieć na to pytanie zmierzyłam poziom ekspresji genów *sodA* i *sodM* oraz aktywność białek SodA i SodM w komórkach traktowanych fotodynamicznie. Wyselekcjonowałam pulę 8 szczepów, które określiłam jako wrażliwe bądź odporne na zastosowane warunki aPDI. Okazało się, że zarówno poziom transkryptów *sodA*, *sodM*, jak i aktywność białek rośnie w efekcie traktowania fotodynamicznego. Niezwykle ciekawą okazała się obserwacja, że poziomy transkryptów i białek rosną, ale tylko u tych szczepów, które były wrażliwe na aPDI.

**Uzyskane przeze mnie wyniki wskazały na istotną rolę wewnątrzkomórkowych dysmutaz ponadtlenkowych w odpowiedzi na stres fotooksydacyjny, co jest zgodne z ich antyoksydacyjną funkcją. Jednocześnie jednak pokazały, że za różnice w efektywności aPDI nie odpowiada aktywność wewnątrzkomórkowych dysmutaz ponadtlenkowych.** Uzyskane wyniki pokazują, że stres fotooksydacyjny z wykorzystaniem protoporfiryny IX jako związku fotouczulającego nie jest generowany wewnątrz komórki, ale raczej na poziomie osłon komórkowych. I to raczej właściwości osłon komórkowych mogą mieć znaczenie w obserwowanych różnicach efektywności aPDI.

### **Znaczenie uzyskanych wyników:**

Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że dysmutazy ponadtlenkowe nie są czynnikami, które bezpośrednio wpływają na efektywność metody fotodynamicznej z wykorzystaniem PpIX w przypadku *S. aureus*. Ma to duże znaczenie poznawcze i aplikacyjne ze względu na to, że efektywność metody aPDI, której podstawą jest generacja RFT, nie jest obniżona w efekcie działania wewnątrzkomórkowych systemów antyoksydacyjnych. To z kolei sugeruje, że prawdopodobieństwo selekcji szczepów opornych na aPDI w oparciu o mechanizm obrony antyoksydacyjnej jest znikome.

**P.3 Nakonieczna J.**, Kossakowska-Zwierucho M., Filipiak M., Hewelt-Belka W., Grinholc M., Bielawski K.P. (2016) Photoinactivation of *Staphylococcus aureus* using protoporphyrin IX: the role of haem-regulated transporter HrtA. APPL. MICROBIOL. BIOTECHNOL. 100(3):1393-405.

### **Cel naukowy pracy:**

Proces akumulacji związku fotouczulającego w komórce bakteryjnej może mieć istotne znaczenie dla efektywnej fotoinaktywacji. Dlatego celem pracy było zbadanie udziału transporterów hemu, będącego strukturalnym analogiem porfiryn, w procesie fotoinaktywacji *S. aureus* z wykorzystaniem protoporfiryny IX. Niewiele wiadomo na temat mechanizmu, dzięki któremu bakterie *S. aureus* akumulują zewnątrzkomórkowe porfiryny. Niektórzy autorzy sugerują, że ze względu na strukturalne podobieństwo cząsteczek, komórkowe systemy transportu hemu mogłyby odgrywać rolę w tym procesie (Moriwaki et al. 2011). Na przykład system transportu Isd (ang. *Iron surface determinant*) to wyspecjalizowana grupa białek współpracujących ze sobą w procesie wychwytywania, transportu przez błonę, a następnie wewnątrz komórki, dla którego substratem jest pochodzący z krwi hem. Będące składową tego systemu białko IsdC wiąże efektywnie protoporfirynę IX i w mniejszym stopniu hem (Mack et al. 2004). W literaturze opisano również zlokalizowany w błonie transporter typu ABC – HtsA (ang. *Heme transport system A*), o którym wiadomo, że jest zaangażowany w transport hemu (Skaar et al. 2004) jak również import stafyloferyny A (Beasley et al. 2009). Innym znanym transporterem typu ABC jest para kooperujących białek Hrt (ang. *Heme-regulated transporter A* (ATPaza) i *B* (permeaza)), które tworzą w błonie kanał aktywnie transportujący hem na zewnątrz komórki (Stauff et al. 2008). Jako że protoporfiryna IX i jej pochodne są często wykorzystywane w aPDI, sprawdziłam czy wspomniane transportery odgrywają rolę w akumulacji protoporfiryny IX w komórkach *S. aureus*, a tym samym wpływają na efektywność aPDI.

### **Syntetyczny opis uzyskanych wyników:**

W pierwszym etapie pracy poddałam fotoinaktywacji szczep *S. aureus* typu dzikiego oraz jego 3 izogeniczne mutanty, pozbawione genów kodujących transportery hemu:  $\Delta hrtA$ ,  $\Delta htsA$ ,  $\Delta isdD$ . Hipoteza zakładała, że jeśli któryś z analizowanych transporterów hemu będzie miał znaczenie w procesie fotoinaktywacji, zaobserwuję różnice w efektywności aPDI pomiędzy typem dzikim, a jego izogenicznymi mutantami. W doświadczeniach fotoinaktywacji zaobserwowałam, zależną od stężenia fotouczulacza (PpIX), dawki światła oraz rodzaju światła (405 nm - niebieskie, 632 nm - czerwone), redukcję liczby komórek bakteryjnych szczepu  $\Delta hrtA$ . W odróżnieniu od szczepu typu dzikiego i pozostałych dwóch mutantów,  $\Delta hrtA$  wykazał znacząco wyższą wrażliwość na stosowane w doświadczeniach warunki fotoinaktywacji. HrtAB to transporter, którego zadaniem jest usuwanie nadmiaru potencjalnie toksycznego hemu z komórki (Stauff et al. 2008).

Założyłam, że w przypadku mutantu  $\Delta hrtA$ , fotouczulacz – PpIX pozostawałby zakumulowany w komórce w większej ilości niż w komórkach typu dzikiego. Rzeczywiście obserwowałam taką prawidłowość dla zastosowanego w naszym układzie doświadczalnym fotouczulacza - PpIX. W przypadku błękitu metylenowego, czyli fotouczulacza o zupełnie różnej od PpIX strukturze, nie obserwowałam zwiększonej akumulacji w szczepie  $\Delta hrtA$ , co stanowi pośredni dowód na to, że PpIX może być substratem dla HrtA. Różnica w akumulacji PpIX pomiędzy szczepem typu dzikiego a mutantem  $\Delta hrtA$  była jednak zbyt mała, aby wytłumaczyć znaczącą różnicę w efektywności aPDI pomiędzy szczepem typu dzikiego i mutantem.

Ponadto, w doświadczeniach, w których wykorzystałam trypsynę do usunięcia białek powierzchniowych *S. aureus*, w tym HrtA (tzw. „golenie komórek”), nie obserwowałam różnic w akumulacji PpIX w szczepie typu dzikiego traktowanego i nietraktowanego trypsyną. Wynik ten sugeruje, że to raczej fizyczna obecność białka HrtA w błonie cytoplazmatycznej a nie jego funkcja ma znaczenie dla procesu akumulacji PpIX. Aspekt ten wymaga jednak pogłębionych analiz. Z danych literaturowych wynika, że osłony komórkowe, a przede wszystkim błona komórkowa, są podstawowym celem aPDI, a jej uszkodzenie prowadzi do śmierci komórek drobnoustrojów. Wysunęłam więc hipotezę, że w efekcie inaktywacji HrtA dochodzi do zmian struktury lub ładunku osłon komórkowych, co może skutkować zmianą efektywności aPDI. Aby zweryfikować tę hipotezę, przeanalizowałam całkowity skład lipidowy oraz płynność błony *S. aureus* typu dzikiego i mutantu. Zastosowałam opracowaną we współpracy z grupą prof. dr. hab. inż. Agaty Kot-Wasik metodykę analizy profilu lipidowego *S. aureus* w oparciu o technologię spektrometrii mas (Hewelt-Belka et al. 2014). Zastosowana technika LC-Q-TOF MS umożliwiła identyfikację wszystkich głównych klas lipidów obecnych w komórkach *S. aureus*, tj. fosfoglicerole (PG), lizylofosfatydyloglicerole (Lys-PG), kardiolipiny (CL), diglikozylo-diacyloglicerole (DGDG), diacyloglicerole (DG). Identyfikacja poszczególnych lipidów odbyła się w oparciu o skonstruowaną wcześniej bazę danych (Hewelt-Belka et al. 2014) i manualną analizę uzyskanych widm MS/MS. Co ciekawe, analizując profile lipidowe obu szczepów: typu dzikiego oraz izogenicznego mutantu  $\Delta hrtA$ , zidentyfikowałam istotne różnice. W szczepie dzikim obserwowałam wyższe ilości Lys-PG, natomiast mutant  $\Delta HrtA$  charakteryzował się wyższą zawartością DG. Po zastosowaniu sondy DPH (1,6-difenylo-1,3,5-heksatrien), lokalizującej się w hydrofobowym rdzeniu błony w celu pomiaru anizotropii fluorescencji DPH, zaobserwowałam znacząco wyższą płynność błony u mutantu  $\Delta HrtA$ .

**Podsumowując, białko HrtA jest zaangażowane w obserwowane zjawisko zwiększonej efektywności aPDI wobec *S. aureus*.** Pokazałam, że to fizyczny brak białka HrtA w błonie, skutkujący zmianą jej składu i właściwości fizycznych, a nie jego funkcja transportująca, wpływa na efektywność aPDI. **Uzyskane przeze mnie wyniki podkreślają rolę fizycznych właściwości błony cytoplazmatycznej w procesie fotoinaktywacji *S. aureus*, a potencjalnie również innych mikroorganizmów.**

#### **Znaczenie uzyskanych wyników:**

Związki fotouczulające, szczególnie te zbliżone strukturalnie do naturalnie wykorzystywanych przez komórki bakteryjne, mogą być substratami dla bakteryjnych systemów transportujących. W efekcie czynią komórki niewrażliwymi na określony związek fotouczulający. Z drugiej strony analiza bakteryjnych systemów importu związków do wnętrza komórki może stanowić ciekawy i zupełnie nowy trend w dziedzinie aPDI, a mianowicie celowaną aPDI. W prezentowanej pracy pokazałam, że pompa typu „efflux” HrtAB nie jest odpowiedzialna za usuwanie związku fotouczulającego z komórki. Wiadomo natomiast, że PpIX, a także jej pochodna

zawierająca jony  $Ga^{2+}$ , może być aktywnie transportowana do komórki dzięki bakteryjnym systemom importu hemu. W świetle takich doniesień można się spodziewać, że efektywność aPDI może być zwiększana poprzez łączenie efektywnej akumulacji i produkcji niespecyficznie działających RFT. **Podsumowując, uzyskane wyniki przyczyniają się do poszerzenia wiedzy na temat mechanizmu działania aPDI, poprzez wskazanie właściwości fizykochemicznych błon komórkowych jako istotnego czynnika wpływającego na efektywność aPDI.**

**P.4** Kossakowska-Zwierucho M, Kaźmierkiewicz R, Bielawski KP, **Nakonieczna J.** (2016) Factors determining *Staphylococcus aureus* susceptibility to photoantimicrobial chemotherapy: RsbU activity, staphyloxanthin level, and membrane fluidity. FRONTIERS IN MICROBIOL. 19; 7:1141.

### **Cel naukowy pracy:**

Obecnie, coraz więcej autorów zauważa szczerowo-zależną odpowiedź na aPDI (Grinholc et al. 2008). Pojawiają się prace, gdzie autorzy prezentują wyniki analiz przeprowadzonych na większej liczbie, niż jeden przedstawiciel szczepów, co jest niezwykle istotne z perspektywy wykorzystania aPDI jako efektywnej metody leczenia (Nakonieczna and Grinholc 2012). Jednocześnie pojawia się potrzeba wyjaśnienia obserwowanego zjawiska różnej odpowiedzi na aPDI w obrębie szczepów należących do jednego gatunku. Autorzy zaczynają poszukiwać określonej „molekularnej sygnatury”, czyli niejako zestawu cech, które czynią komórki mniej lub bardziej wrażliwymi na aPDI. Dotychczas podjęto pracę nad proteomem *S. aureus* poddanym działaniu aPDI, gdzie zidentyfikowano wyższą produkcję białek metabolizmu beztlenowego jako zaangażowanych w proces aPDI (Dosselli et al. 2012). Z kolei w badaniach lipidomu *Staphylococcus warneri* zidentyfikowano modyfikacje fosfolipidów błony cytoplazmatycznej w postaci tlenków i nadtlenków lipidów, które skutkowały efektem bójczym dla komórek bakteryjnych (Alves et al. 2013). Stres fotooksydacyjny generowany w wyniku aPDI wywołuje efekt plejotropowy, dlatego w dalszych etapach pracy byłam zainteresowana sprawdzeniem roli głównych regulatorów komórkowych, mających znaczenia dla funkcjonowania komórki w warunkach stresu. W przypadku modelu badawczego *S. aureus* ważnym regulatorem stresu komórkowego jest czynnik Sigma B (SigB), który kontroluje ekspresję ponad 150 genów zaangażowanych w odpowiedź na stres środowiskowy (Gertz et al. 1999; Senn et al. 2005), transport przezbłonowy, kompozycję osłon komórkowych, regulację produkcji czynników wirulencji, m.in. stafyloksantyny (Muller et al. 2014). Jako cel w przedstawionej pracy postawiłam zbadanie roli elementów operonu Sigma B w odpowiedzi na aPDI.

Oprócz wyspecjalizowanych systemów enzymatycznych komórki mogą wytwarzać niskocząsteczkowe związki, które „wyciszają” wzbudzone związki fotouczulające, działając jako antyoksydanty, np. karotenoidy (Krieger-Liszakay et al., 2008). Wiele mikroorganizmów chorobotwórczych, w tym MRSA (metrycylino-oporny *S. aureus*) wytwarza barwniki, które odgrywają rolę w odpowiedzi na stres oksydacyjny.

### **Syntetyczny opis uzyskanych wyników:**

W pracy wykorzystalam 6 różnych związków fotouczulających, należących do różnych grup chemicznych: fenotiazyna (błękit toluidynowy), porfiryny (arginizowana pochodna

protoporfiryny IX – PPA<sub>Arg2</sub>, tetrakationowa pochodna porfiryrynowa – TMPyP), ftalocyjanina cynkowa (ZnPc), przedstawiciel ksantenów (róż bengalski - RB) i scharakteryzowana w naszym zespole pochodna fullereny (Grinholc, Nakonieczna et al. 2015). Każdy związek był wykorzystany w aPDI szczepu *S. aureus* typu dzikiego (USA300) oraz jego izogenicznych mutantów w genach kodujących składowe operonu Sigma B:  $\Delta sigB$ ,  $\Delta rsbW$ ,  $\Delta rsbV$ ,  $\Delta rsbU$ . W przypadku 3 badanych fotouczulaczy (PPA<sub>Arg2</sub>, ZnPc, RB) obserwowałam znaczący efekt fototoksyczny (spadek przeżywalności >5 jednostek w skali logarytmicznej; log<sub>10</sub>) w stosunku do mutantów  $\Delta sigB$ ,  $\Delta rsbW$ ,  $\Delta rsbV$ ,  $\Delta rsbU$ , ale nie w stosunku do szczepu typu dzikiego. Podobne analizy zostały przeprowadzone dla wybranych izolatów klinicznych, z których 6 wykazało wysoką wrażliwość na aPDI z wykorzystaniem 3 badanych fotouczulaczy, natomiast jeden charakteryzował się niską wrażliwością na aPDI. Dzięki sekwencjonowaniu genów operonu Sigma B zidentyfikowałam szereg aberracji w analizowanych wysoko wrażliwych szczepach klinicznych, nie zidentyfikowałam natomiast żadnych zmian w obrębie operonu Sigma B w szczepie nisko wrażliwym na aPDI. Co ciekawe, zidentyfikowane aberracje zlokalizowane były głównie w genie *rsbU*, który koduje białko RsbU – pozytywny regulator funkcji SigB (Senn et al. 2005). Analiza funkcjonalności SigB (na podstawie pomiaru poziomu ekspresji genu *asp23*, regulowanego wyłącznie przez funkcję SigB), wykazała obniżoną aktywność SigB w 4 szczepach klinicznych, wskazując na potencjalną istotność zidentyfikowanych mutacji dla aktywności SigB.

Jednym z najbardziej charakterystycznych fragmentów DNA w regulacji SigB jest operon odpowiedzialny za biosyntezę stafyloksantyny (STX), czyli charakterystycznego żółtego barwnika o właściwościach antyoksydacyjnych, który jest zlokalizowany w błonie cytoplazmatycznej (Bischoff et al. 2004). Stafyloksantyna produkowana przez *S. aureus* niweluje destrukcyjne działanie oksydacyjne neutrofilów gospodarza w czasie infekcji. Utrata tego złotego pigmentu obniża potencjał antyoksydacyjny i wirulencję *S. aureus* w mysim modelu infekcji systemowej (Liu et al., 2005). Obecność stafyloksantyny może zatem wpływać na efektywność aPDI, zważywszy na fakt, że ok. 90% opisanych w literaturze izolatów posiada zlokalizowane w błonie barwniki karotenoidowe (Zhang et al., 2018). Wyniki przedstawione w prezentowanej pracy pokazują, że nadprodukcja STX w komórkach *S. aureus* prowadzi do zwiększonej w porównaniu z typem dzikim oporności na aPDI, natomiast delekcja kluczowych genów, skutkująca brakiem pigmentacji, w znacznym stopniu uwrażliwia komórki na aPDI. Zależność taką obserwowałam dla 3 badanych fotouczulaczy (PPA<sub>Arg2</sub>, ZnPc, RB). Pomiar ilości karotenoidów (STX jest głównym karotenoidem komórkowym) w analizowanych szczepach klinicznych wskazuje na korelację ilości karotenoidów z aktywnością SigB, co jest zgodne z regulacyjną funkcją SigB. **Wyniki uzyskane w ramach tej pracy wskazują zatem, że produkcja karotenoidów, w tym stafyloksantyny, jest znaczącym elementem sigmaB-zależnego mechanizmu odpowiedzi na aPDI.** Na uwagę zasługuje jednak fakt, że niektóre szczepy o zachowanej aktywności SigB i stosunkowo wysokiej produkcji karotenoidów pozostają bardzo wrażliwe na stosowane w naszych doświadczeniach warunki aPDI.

Stafyloksantyna jest barwnikiem zlokalizowanym w błonie i może wpływać na właściwości fizyczne błony, takie jak płynność. Z tego powodu zanalizowałam płynność błony w badanych szczepach, a następnie stosując analizy statystyczne (klastrowanie hierarchiczne - aglomeracja Warda, obliczanie dystansu metodą Manhattan) wyznaczyłam 3 grupy szczepów charakteryzujące się różną płynnością błony cytoplazmatycznej. W grupie, która charakteryzowała się najniższą płynnością błony znalazły się tylko szczepy, które wykazywały niską wrażliwość na aPDI. Z kolei w grupie drugiej i trzeciej szczepów o wyższej płynności błony znalazły się szczepy znacząco bardziej wrażliwe na aPDI. Uzyskane wyniki potwierdzają moje wcześniejsze obserwacje dotyczące istotności parametru płynności błony w efektywnej fotoinaktywacji (praca P.3).



### **Znaczenie uzyskanych wyników:**

Wyniki przedstawione w pracy z jednej strony pokazują dość złożony charakter powiązań pomiędzy bakteryjnymi czynnikami komórkowymi, które mają wpływ na efektywność aPDI, z drugiej strony wyraźnie wskazują na znaczenie rodzaju związku fotouczulającego w procesie fotoinaktywacji. W pracy zanalizowałam szeroki panel związków fotouczulających, dla połowy z nich **funkcja badanego czynnika SigmaB okazała się istotna**. Związki te ogólnie można scharakteryzować jako efektywnie akumulujące się w komórkach *S. aureus*, działające wg mechanizmu typu II (producenci tlenu sigletowego). **Ponadto, pokazałam, że zlokalizowana błonowo stafyloksantyna ma wpływ na płynność błony, a w dalszym etapie na efektywność fotoinaktywacji, przez co stanowi istotny czynnik komórkowy mający znaczenie w efektywności aPDI**. Uważam ponadto, że stafyloksantyna może stanowić potencjalny obiekt dla celowanej aPDI.

**P.5** Taraszkiewicz A., Grinholc M., Bielawski KP., Kawiak A., **Nakonieczna J.** (2013) Imidazoacridinone derivatives as efficient sensitizers in photoantimicrobial chemotherapy. APPL. ENVIRON. MICROB., 79(12):3692-702,

### **Cel naukowy pracy:**

Lekooporne szczepy drożdżaków stanowią coraz większy odsetek wśród ludzkich patogenów grzybiczych. Dostępne obecnie opcje terapeutyczne są ograniczone ze względu na toksyczność leków, wysokie koszty leczenia lub trudności w ich stosowaniu (Beardsley et al. 2018). Zapadalność na choroby grzybicze na świecie rośnie gwałtownie w ostatnich latach, a obecne szacunki sugerują, że rocznie występuje około 300 milionów infekcji grzybiczych powodujących zagrożenie życia, co skutkuje 1,6 miliona zgonów (Jermy 2017). Najbardziej popularnym przedstawicielem grzybów, będących patogenami człowieka jest *Candida albicans*, który kolonizuje powszechnie śluzówkę jamy ustnej i gardła oraz nabłonek pochwy a także inne nabłonki ludzkiego organizmu. W przypadku pacjentów z zaburzeniami układu odpornościowego (chorzy na AIDS, pacjenci onkologiczni) może dochodzić do infekcji systemowych, w przypadku których śmiertelność jest wyższa niż sepsy bakteryjnej i sięga nawet 40% (Picazo et al. 2008). Podobnie, jak w przypadku leczenia antybiotykami zakażeń bakteryjnych, efektywność leczenia mykostatykami spada ze względu na rosnące zjawisko oporności, dlatego poszukuje się nowych metod, które mogłyby skutecznie leczyć zakażenia grzybami. Celem pracy było zbadanie efektywności aPDI w stosunku do *Candida albicans* z wykorzystaniem nowych związków fotouczulających.

### **Syntetyczny opis uzyskanych wyników:**

Jako związki fotouczulające wybrałam pochodne imidazoakrydyny (IA) (Cholody et al. 1990). Związki te opracowywano jako leki przeciwnowotworowe, wykazujące cytotoksyczność względem szybko dzielących się komórek. Z danych literaturowych wynika, że niektóre pochodne imidazoakrydyny akumulują się w jądrze komórkowym i hamują syntezę DNA, jednakże nie wykazują aktywności transformującej (Berger et al. 1996). Imidazoakrydyny absorbują światło niebieskie w zakresie 420 - 440 nm a także wykazują fluorescencję w zakresie 500 – 540 nm, co wskazywało, że mogą wykazywać właściwości fotodynamiczne.

W pierwszym etapie do analiz wybrałam 10 losowych pochodnych IA i sprawdziłam ich zależną od światła aktywność bójczą względem *C. albicans in vitro*. W przypadku żadnego z analizowanych związków nie obserwowałam toksyczności w ciemności, natomiast trzy związki

wykazały znaczącą aktywność, zależną od światła (redukcja liczby komórek min. ~3 jednostki w skali logarytmicznej;  $\log_{10}$ ). W kolejnym etapie sprawdziłam, czy badane pochodne akumulują się w komórkach drożdżowych. Dzięki zdolności do fluorescencji proces akumulacji pochodnych IA może być stosunkowo łatwo monitorowany za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej. Wyniki tych analiz wykazały, że tylko związki, które były toksyczne względem *C. albicans*, efektywnie akumulowały się w komórkach. A zatem podstawą fototoksyczności badanych pochodnych IA jest wewnątrzkomórkowa akumulacja związków.

Wszystkie badania zostały przeprowadzone z wykorzystaniem referencyjnego szczepu *C. albicans* ATCC 2091. Stosując aPDI obserwuje się szczepowo-zależną odpowiedź, dlatego sprawdziłam efektywność działania najskuteczniejszego związku z badanych, C-1330 wobec innych szczepów *C. albicans*, w tym szczepów opornych na kapsosunginę i mikofunginę. Analizując 7 klinicznych izolatów obserwowałam redukcję liczby komórek w zakresie od 2 do 6 jednostek w skali logarytmicznej;  $\log_{10}$ .

Analizowałam również efektywność badanej pochodnej wobec izolatów klinicznych innych gatunków drobnoustrojów, np. dla *S. aureus* liczby te wahały się w granicach 2 - 5 jednostek w skali logarytmicznej;  $\log_{10}$ , podobnie dla innych gatunków bakterii Gram-dodatnich (*Enterococcus faecium*, *Streptococcus agalactiae*). W przypadku bakterii Gram-ujemnych (*Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*) uzyskana redukcja liczby żywych komórek była stosunkowo niska i wynosiła od 0,9 – 1,5 jednostki w skali logarytmicznej;  $\log_{10}$ . Natomiast w przypadku innego znanego ludzkiego patogenu należącego do bakterii Gram-ujemnych, *Pseudomonas aeruginosa*, obserwowałam wysoką efektywność aPDI w oparciu o pochodne IA, porównywalną do bakterii Gram-dodatnich redukcję liczby żywych komórek wynoszącą 3 - 5 jednostki w skali logarytmicznej;  $\log_{10}$ .

Aby sprawdzić, czy i jakie reaktywne formy tlenu biorą udział w mechanizmie śmierci komórek *C. albicans* w przypadku aktywowanych światłem pochodnych IA, zastosowałam tzw. „wyciszacze” RFT. Azydek sodu hamuje działanie tlenu singletowego (mechanizm typu II), natomiast glicerol - głównie wolnych rodników (mechanizmu typu I). Tryptofan jest uznawany za najmniej specyficzny „wyciszacz”, i działa na obydwa rodzaje RFT. Wyniki przeprowadzonych analiz wykazały, że zastosowanie każdego związku skutkowało efektem ochronnym dla komórek i wzrostem ich przeżywalności w porównaniu do komórek poddanych aPDI bez dodatku „wyciszaczy” RFT. Co ciekawe, tryptofan wykazał najlepszy efekt ochronny, co sugeruje, że pochodne IA pod wpływem światła niebieskiego produkują zarówno wolne rodniki, jak i ten singletowy.

Aby wstępnie ocenić potencjał klinicznego stosowania pochodnej C1330 jako związku przeciwgrzybiczego przeprowadzono analizę cyto- i fototoksyczności związku względem ludzkich komórek skóry linii HaCaT. W warunkach, w których liczba komórek drożdży w wyniku aPDI spadała o ~3 jednostki w skali logarytmicznej;  $\log_{10}$  (tj. o 99,9%), około 43% keratynocytów przeżywało traktowanie, co wskazuje na potencjał badanego związku w leczeniu zakażeń *C. albicans*.

### **Znaczenie uzyskanych wyników:**

Przeprowadzone analizy pochodnych IA pozwoliły na zidentyfikowanie tzw. „okna terapeutycznego”, czyli warunków, w których mikroorganizmy są efektywnie eliminowane, przy zachowaniu akceptowalnego poziomu toksyczności względem ludzkich komórek. aPDI jest metodą o działaniu lokalnym i ograniczoną możliwością dostarczenia światła. Zapewnia to wysoką selektywność metody i daje możliwość szybkiego i skutecznego działania w momencie, gdy

chory wymaga niezwłocznego podjęcia decyzji o włączeniu leczenia, co jest często krytyczne dla zdrowia i życia pacjenta. **Zaprezentowane wyniki przedstawiają nową grupę związków jako potencjalnie użytecznych w leczeniu zakażeń grzybiczych.** Warto nadmienić, że jedna z pochodnych, związek o najlepszej aktywności, została opatentowana (Kompozycja farmaceutyczna oraz dezynfekująca zawierająca pochodną imidazoakrydiny jako środek fotouczulający oraz ich zastosowanie: PL399411; Taraszkiewicz A, Nakonieczna J, Grinholc MS, Bielawski KP).

**P.6 Taraszkiewicz A., Szewczyk G., Sarna T., Bielawski K.P., Nakonieczna J. (2015)**

Photodynamic inactivation of *Candida albicans* with imidazoacridinones: influence of irradiance, photosensitizer uptake and reactive oxygen species generation. PLOS ONE, 8;10(6):e0129301,

### **Cel naukowy pracy:**

Z racji tego, że *C. albicans* jest przedstawicielem *Eucaryota*, podobnie jak człowiek, mamy do czynienia z większym podobieństwem komórek, a co za tym idzie z mniejszą możliwością uzyskania selektywności związków. Skutkiem tego jest trudność wyznaczenia tzw. „okna terapeutycznego”, czyli takich warunków fotoinaktywacji, które będą skuteczne wobec patogenu, ale bezpieczne dla komórek gospodarza. W przypadku aPDI sytuacja jest o tyle złożona, że oprócz samego stężenia związku fotouczulającego, należy rozpatrywać dodatkowo składową, jaką jest światło. Miarą energii świetlnej padającej na określoną powierzchnię, czyli tzw. fluencji (ang. *fluence*) lub „dawki światła” jest  $J/cm^2$ . Zgodnie z praktykami stosowanymi w badaniach biomedycznych moc jest wyrażana w  $mW/cm^2$  i definiowana przez irradancję (ang. *irradiance*), zgodnie ze wzorem: fluencja [ $J/cm^2$ ] = irradancja [ $mW/cm^2$ ] × czas [s]. Zaletą modulacji „dawki światła” jest większa możliwość precyzyjnego wyznaczenia „okna terapeutycznego”. Z tego powodu celem przedstawionej pracy była analiza zależnej od irradancji efektywności aPDI, a także charakterystyka wybranych pochodnych imidazoakrydynowych pod kątem właściwości fotochemicznych (produkcji określonych RFT) i akumulacji związków fotouczulających w komórkach *C. albicans*.

### **Syntetyczny opis uzyskanych wyników:**

Do analiz wybrałam 3 pochodne IA, które po inkubacji z komórkami *C. albicans*, poddawane były działaniu światła niebieskiego (405 nm,  $20 J/cm^2$ ). Poprzez zastosowanie rosnącej mocy źródła światła ( $3,5 - 63 mW/cm^2$ ) taka sama dawka światła była dostarczana w coraz krótszym czasie. Z punktu widzenia klinicznego czas naświetlania ma ogromne znaczenie dla pacjenta, ale też dla personelu medycznego i powinien być możliwie najkrótszy. Z przeprowadzonych w ramach przedstawionej pracy doświadczeń wynikało, że ani najmniejsza (najdłuższy czas naświetlania), ani największa (najkrótszy czas naświetlania) moc energii nie były najefektywniejsze w zabijaniu komórek *C. albicans*. Najlepszy efekt aPDI uzyskaliśmy stosując pośrednią moc światła ( $7 mW/cm^2$ ) i pośrednie czasy naświetlania. Taką zależność obserwowałam dla wszystkich badanych pochodnych IA. Podobną zależność zaobserwowałam również dla wyższej energii światła ( $30 J/cm^2$ ). Z danych literaturowych wynika, że podobną zależność obserwowano również dla komórek zmienionych nowotworowo (Henderson et al. 2006). Efekt ten tłumaczono dostępnością tlenu, którego retencja w otoczeniu związku fotouczulającego może być niewystarczająca do fotoprodukcji RFT w czasie gdy reakcja przebiega zbyt gwałtownie. Podsumowując, należy stwierdzić, że oprócz dawki światła, również czas ekspozycji, a co za tym idzie moc światła jest krytyczną składową efektywnej aPDI.

Kolejną składową, mogącą mieć znaczenie dla efektywności aPDI, jest akumulacja związku fotouczulającego w komórkach. Obserwowałam ogólną zależność pomiędzy fototoksycznością badanych związków a ich akumulacją w komórkach *C. albicans*. Fluorescencja obserwowana po 30 minutach inkubacji grupy pochodnych charakteryzujących się średnią fototoksycznością prezentowała rozproszony wzór, wskazujący na lokalizację w cytoplazmatycznych strukturach wewnątrz komórki. Najbardziej fototoksyczny związek – pochodna C1330 reprezentowała unikalny wzór akumulacji w postaci drobnych punktów rozsianych wewnątrz komórki, odpowiadający najprawdopodobniej ułożeniu wewnątrzkomórkowemu lizosomów. Najmniej fototoksyczne związki nie wykazywały fluorescencji wewnątrz komórek, co pozostaje zgodne z wynikami prezentowanymi we wcześniejszych badaniach zespołu (P.5) (Taraszkiewicz et al. 2013).

Jednym z kluczowych mechanizmów oporności na stosowane leczenie przeciwdrobnoustrojowe jest aktywność błonowych białek, tzw. pomp 'efflux', które usuwają toksyczne dla komórki związki poza komórkę. Pokazano, że nadekspresja genów kodujących białka CaCDR1/CaCDR2 (transportery ABC) jest odpowiedzialna za obniżoną fototoksyczność błękitu metylenowego w stosunku do *C. albicans* (Prates et al. 2011). Białko to jest również zaangażowane w transport jonów nieorganicznych, steroidów, czy też translokację fosfolipidów. Z tego powodu sprawdziliśmy, czy zablokowanie transporterów typu ABC spowoduje efektywniejszą akumulację pochodnych IA w komórkach *C. albicans*. Zastosowaliśmy werapamil jako inhibitor pomp typu ABC, a następnie mierzyliśmy poziom akumulacji związków IA w komórkach. Zastosowanie werapamilu powodowało obniżenie akumulacji IA, wskazując raczej na zaburzenia w akumulacji spowodowane obecnością inhibitora, albo niezależny od CaCDR1/CaCDR2 wyciek IA z komórek. Nie obserwowaliśmy istotnych różnic w akumulacji pomiędzy badanymi pochodnymi IA w obecności i bez obecności werapamilu, co może być efektem wielu czynników, na które wpływa obecność CaCDR1. Podsumowując, ABC transporter CaCDR1 nie jest odpowiedzialny za usuwanie IA z komórek *C. albicans*.

W celu scharakteryzowania rodzaju RFT produkowanych przez aktywowane światłem pochodne IA, zastosowaliśmy podejście oparte o bezpośredni pomiar luminescencji tlenu singletowego w zakresie podczerwieni, a także pułapkowanie spinowe i pomiar rezonansu paramagnetycznego sondy DMPO w celu detekcji wolnorodnikowych form tlenu. Badania te były wykonywane we współpracy z prof. dr hab. Tadeuszem Sarną (Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński). Z przeprowadzonych przez nas analiz wynika, że pochodne imidazoakrydynowe nie są wydajnymi producentami tlenu singletowego, wydajność kwantowa (tzw. *quantum yield*) wynosi od 2 – 16% w przypadku najbardziej fotoaktywnego związku. Porównując te dane z referencyjnymi producentami  $^1\text{O}_2$  takimi jak róż bengalski (70%) czy pochodne porfiryne (np. TMPyP - 75%), wynik nie wydaje się szczególnie imponujący. Trudno też na tym etapie wnioskować, czy to właśnie  $^1\text{O}_2$  odpowiada za fototoksyczność IA względem *C. albicans*. Nie mniej jednak należy pamiętać, że nawet niewielka ilość wyprodukowanych RFT może mieć kluczowe znaczenie dla efektu bójczego, jeśli znajdują się one w bliskości wrażliwych struktur komórkowych na modyfikacje oksydacyjne. Z drugiej strony wykazaliśmy, że aktywowane światłem IA produkują anionorodnik ponadtlenkowy ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ). Wydajność produkcji tego związku była również niewielka, ale w obecności NADH wytwarzanie  $\text{O}_2^{\cdot -}$  było stymulowane nawet o dwa rzędy wielkości. Ma to istotne znaczenie ze względu na fakt, że NADH jest cząsteczką naturalnie produkowaną i obecną stale w komórkach. Uważam, że w przypadku pochodnych IA, mechanizm fototoksyczności jest w głównej mierze oparty o mechanizm typu I (wolnorodnikowy).

### **Znaczenie uzyskanych wyników:**

Według zasady wzajemności (prawo Bunsena-Roscoe), obserwowane fotochemiczne czy też fotobiologiczne efekty są proporcjonalne do całkowitej dawki światła (w tym wypadku fluencji), niezależnie od czasu w jakim energia jest dostarczana. Uzyskane w ramach przedstawianej pracy wyniki wskazują, że oprócz całkowitej dawki światła (energii), również jego moc (a co za tym idzie czas) ma znaczenie dla procesu aPDI. Jest to niezwykle cenna informacja w perspektywie potencjalnego zastosowania klinicznego aPDI, ponieważ wskazuje na możliwość optymalizacji stosowanych protokołów aPDI.

**Po raz pierwszy pokazałam, że pochodne IA (związki o działaniu przeciwnowotworowym) wykazują właściwości fotodynamiczne, tj. mogą produkować reaktywne formy tlenu w wyniku aktywacji światłem, co skutkuje efektywnym zabijaniem izolatów klinicznych drożdży, niezależnie od prezentowanego statusu lekooporności.** Związki te nie wykazywały efektu mutagennego, nie obserwowałam również selekcji klonów opornych w wyniku wielokrotnego pasażowania komórek. W świetle przedstawionych wyników, pochodne IA wydają się ciekawymi związkami o potencjale leczniczym w miejscowych zakażeniach grzybiczych.

**P.7 Ogonowska P, Woźniak A, Pierański MK, Wasylew T, Kwiek P, Brasel M, Grinholc M, Nakonieczna J. (2018) Application and characterization of new light-emitting diodes for photodynamic inactivation. LIGHTING RES & TECH. 0:1-13.**

### **Cel naukowy pracy:**

Historycznie do naświetlania komórek w warunkach *in vitro*, *in vivo*, jak i u pacjentów używano laserów, jednakże w ostatnich latach coraz częściej wykorzystuje się w aPDI diody. Ze względu na różnorodność diód oraz możliwości tworzenia złożonych konstrukcji diodowych (np. odzwierciedlających krzywizny ciała), zawierających elementy optyczne, niezwykle istotna jest kwestia dokładnego scharakteryzowania stosowanych źródeł światła. Umożliwia to precyzyjną dozymetrię, ale również porównywanie wyników pochodzących z różnych laboratoriów. Z tego powodu za cel prezentowanej pracy postawiłam sobie szczegółową charakterystykę źródeł światła wykorzystywanych w fotoinaktywacji i sprawdzenie ich efektywności na modelu *S. aureus*.

### **Syntetyczny opis uzyskanych wyników:**

Skonstruowaliśmy 3 źródła światła: niebieskie – 411nm ( $90 \text{ W/cm}^2$ ), zielone – 515 nm ( $45 \text{ W/cm}^2$ ), czerwone – 632 nm ( $43 \text{ W/cm}^2$ ). Każdy z trzech układów zawierał soczewkę optyczną zamontowaną na pojedynczej diodzie, dzięki czemu obszar naświetlania był okrągłego kształtu o promieniu  $\sim 5,5 \text{ cm}$ . W założeniu soczewka powinna dostarczać światło o równym rozkładzie energii. Dioda jest umieszczona na ruchomym rusztowaniu, co umożliwia dostosowane odległości diody od powierzchni traktowanej. Dodatkowo jest ona połączona z panelem sterującym, umożliwiającym kontrolę parametrów mocy, fluencji, i/lub czasu naświetlania. Źródła światła wykonane były we współpracy z inż. R. Chmielewskim (EMD Technology sp. z o.o., Polska, Warszawa), natomiast charakterystyka spektralna uzyskanych źródeł została przeprowadzona we współpracy z prof. dr hab. Piotrem Kwiekiem (Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki, Uniwersytet Gdański). Zmierzyliśmy spektrum emisji uzyskanych źródeł światła: spektrograf kalibrowany względem lasera helowo-neonowego (dla diody 632 nm), lasera neodymowego z drugą harmoniczną światła (dla diody 532 nm), laser GaN (dla diody 411 nm), a także szerokość wiązki światła. W wyniku przeprowadzonych pomiarów rozkładu gęstości mocy na powierzchni naświetlanej, uzyskaliśmy różnicę rozkładu mocy sięgającą 50 - 60% pomiędzy

punktem centralnym a krawędzią obszaru naświetlanego. Następnie zanalizowałam w jaki sposób otrzymany rozkład gęstości mocy wpływa na przeżywalność komórek bakterii na całym obszarze naświetlanym. W doświadczeniach wykorzystaliśmy 3 związki fotouczulające o widmach absorpcji zgodnych z widmami emisji skonstruowanych źródeł światła: arginizowana pochodna protoporfiryny IX, róż bengalski, pochodna fulerenu C60. Zgodnie z przewidywaniami zaobserwowałam różnicę w przeżywalności pokrywającą się z rozkładem gęstości mocy, tj. największa redukcja liczby komórek bakteryjnych miała miejsce w punkcie naświetlania o najwyższej gęstości mocy, redukcja liczby komórek malała w kierunku krawędzi obszaru naświetlanego, czyli o niższej gęstości mocy. Zależność taką obserwowałam dla wszystkich analizowanych fotouczulaczy. Badania wykonane były dla 100%, 50% i 25% mocy maksymalnej każdego źródła światła. Warto wspomnieć, że w przypadku fulerenu aktywowanego światłem niebieskim, a także arginizowanej pochodnej protoporfiryny IX, zastosowane wyższej gęstości mocy (wyższej irradiancji) przy zachowaniu tej samej całkowitej dawki światła (fluencji) skutkowało niższą efektywnością aPDI. Wyniki uzyskane na modelu *S. aureus* potwierdzają tym samym rezultaty wcześniejszych doświadczeń z pochodnymi IA na modelu *C. albicans* (P.6) (Taraszkiewicz, 2015) i wskazują na konieczność optymalizacji protokołów aPDI, nie tylko w oparciu o stężenie związku fotouczulającego, fluencję (całkowitą dawkę światła mierzona w J/cm<sup>2</sup>), ale również irradiancję (gęstość mocy mierzona w mW/cm<sup>2</sup>).

#### **Znaczenie uzyskanych wyników:**

Przedstawione w pracy wyniki w pełni charakteryzują właściwości źródła światła stosowanego w aPDI, co umożliwiła precyzyjną dozymetrię światła jako niezbędnego elementu procedury aPDI.

**P.8 Nakonieczna J, Wolnikowska K, Ogonowska P, Neubauer D, Bernat A, Kamysz W. (2018)** Rose Bengal-mediated photoinactivation of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* is enhanced in the presence of antimicrobial peptides. FRONTIERS IN MICROBIOL. 20; 9:1949.

#### **Cel naukowy pracy:**

Z danych literaturowych wynika, że praktycznie każdy mikroorganizm może zostać inaktywowany w efekcie działania aPDI (Wainwright et al. 2017). Nie mniej jednak wydajność aPDI w stosunku do gatunków Gram-ujemnych jest niższa w porównaniu do Gram-dodatnich, ze względu na różnice w budowie osłon komórkowych, w szczególności obecność błony zewnętrznej charakterystycznej dla bakterii Gram-ujemnych. Z tego powodu, aby uzyskać satysfakcjonujący efekt kliniczny fotoinaktywacji bakterii Gram-ujemnych należy stosować wyższe stężenia fotouczulaczy. To z kolei pociąga za sobą niebezpieczeństwo wystąpienia efektów cyto- lub/i fototoksycznych w stosunku do komórek gospodarza. Aby zwiększyć efektywność związków fotouczulających modyfikuje się je np. poprzez koniugację z peptydami przeciwdrobnoustrojowymi. W literaturze opisano przykłady takich modyfikacji wskazując na polepszone właściwości związków fotouczulających. W niektórych przypadkach zwykle jednoczesne podawanie związku fotouczulającego i peptydu może skutkować lepszą efektywnością aPDI. Celem tej pracy było zbadanie efektu aPDI w oparciu o róż bengalski (RB) w stosunku do Gram-ujemnego gatunku *P. aeruginosa* z wykorzystaniem peptydów przeciwdrobnoustrojowych jako wzmacniaczy aPDI.

#### **Syntetyczny opis uzyskanych wyników:**

W badaniach wykorzystałam róż bengalski i dwa syntetyczne peptydy przeciwdrobnoustrojowe: CAMEL (CAM) i pexiganan (PEX). Badania przeprowadziłam na 35 izolatach klinicznych *P. aeruginosa*, z czego 14 scharakteryzowano jako szczepy XDR (ang. *extensively drug resistant*) lub MDR (ang. *multidrug resistant*). *P. aeruginosa* jest stosunkowo odporny na działanie RB w aPDI, dopiero wysokie 100µM stężenie RB w obecności światła (60 J/cm<sup>2</sup>) skutkuje redukcją liczby bakterii >5 jednostek w skali logarytmicznej; log<sub>10</sub>. W przypadku dodatkowego zastosowania peptydów przeciwdrobnoustrojowych (CAM lub PEX), stężenie RB mogło zostać zmniejszone do 10 µM lub do 5 µM, przy zastosowaniu dawki światła o połowę niższej (tj. 30 J/cm<sup>2</sup>). W tych warunkach żywotność i zdolność do proliferacji ludzkich komórek skóry (linia HaCaT) nie uległa zmianie. Jako że obserwuje się przypadki różnej odpowiedzi szczepów klinicznych na zastosowany konkretny protokół aPDI, sprawdziłam efektywność zoptymalizowanego protokołu aPDI wobec 35 szczepów *P. aeruginosa*. Z przeprowadzonych analiz wynika, że w przypadku około połowy badanych izolatów liczba komórek inkubowanych jednocześnie z RB i peptydem nawet bez dostępu światła znacząco spadała. Wskazuje to na fakt, że samo oddziaływanie RB i peptydu z komórką ma obserwowalny efekt bólczy. Kiedy do układu wprowadzony zostaje element światła (tj. dochodzi do indukcji procesu fotodynamicznego, czyli produkcji RFT), przeżywalność wszystkich analizowanych izolatów spadła poniżej poziomu detekcji (redukcja minimum 5 jednostek w skali logarytmicznej; log<sub>10</sub>). Niezwykle cenną obserwacją jest fakt, iż efektywność aPDI w żaden sposób nie korelowała ze wzorem lekooporności badanych izolatów klinicznych. Szczepy, które scharakteryzowałam jako XDR lub MDR były zabijane z równie wysoką efektywnością jak pozostałe. U podstaw obserwowanego zjawiska leżała efektywniejsza akumulacja RB w komórkach bakteryjnych w obecności badanych peptydów w porównaniu do braku peptydów.

#### **Znaczenie uzyskanych wyników:**

Uzyskane wyniki pokazały, że efektywność związków – w tym wypadku RB, który nie był skuteczny względem *P. aeruginosa*, może być modulowana w kierunku uzyskania znaczącego efektu bólczego. Jednoczesny brak efektu cyto- i fototoksycznego w stosunku do ludzkich komórek skóry, a także efektywność zastosowanego podejścia wobec kilkudziesięciu izolatów klinicznych o różnym profilu lekooporności pokazuje, że metoda aPDI stanowi skuteczną opcję terapeutyczną w leczeniu miejscowych zakażeń *P. aeruginosa*.

#### **Podsumowanie najważniejszych osiągnięć przedstawianego cyklu badań**

Do najważniejszych osiągnięć uzyskanych w ramach przedstawionego cyklu monotematycznego zaliczam:

1. *Oznaczenie istotności drobnoustrojowych czynników komórkowych w aPDI, a w szczególności:*
  - wykazanie, że enzymy antyoksydacyjne (SodA, SodM) mają drugorzędne znaczenie w odpowiedzi *S. aureus* na stres fotooksydacyjny, generowany przez związki porfirynowe,
  - wykazanie, że fizyczna obecność transportera hemu HrtA a nie jego funkcja jest istotnym czynnikiem w efektywności aPDI,

- wykazanie, że skład i właściwości błony komórek bakteryjnych są istotnym czynnikiem wpływającym na efektywność aPDI,
- wykazanie, że lokalizacja wewnątrzkomórkowa oraz poziom akumulacji związków fotouczulających są istotnymi czynnikami warunkującymi efektywność aPDI
- wykazanie, że funkcjonalność operonu SigmaB, jest istotnym czynnikiem wpływającym na efektywność aPDI.

## 2. Opracowanie strategii prowadzącej do zwiększenia efektywności aPDI, a w szczególności:

- wykazanie, że obniżenie aktywności SigmaB jest strategią prowadzącą do uwrażliwienia drobnoustrojów na aPDI,
- identyfikacja właściwości fotodynamicznych u pochodnych IA oraz wykazanie wysokiej aktywności przeciwdrobnoustrojowej nowych pochodnych IA w stosunku do tzw. trudnych mikroorganizmów, tj. drożdży z rodzaju *Candida* i bakterii Gram ujemnych *P. aeruginosa*,
- opracowanie metody zwiększenia efektywności aPDI poprzez łączne zastosowanie peptydów o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych i wykazanie *in vitro* bezpieczeństwa metody,
- zaprojektowanie i charakterystyka nowych źródeł światła w oparciu o system LED (ang. *light emitting diodes*); zapewnienie precyzyjnej kontroli warunków dozymetrycznych w aPDI.

## Plany dalszych badań

Moje plany badawcze będą koncentrować się na możliwościach klinicznego wykorzystania aPDI w zwalczaniu patogenów, głównie *S. aureus*, kolonizujących pacjentów z problemami skórnymi. Obecnie w mikrobiologii z coraz większym uznaniem spotyka się podejście badawcze opierające się na zwalczaniu nie tylko samych komórek bakteryjnych, ale produkowanych przez nie czynników wirulencji. To właśnie czynniki wirulencji są często odpowiedzialne za objawy chorobowe, a klasyczne antybiotyki nie powodują dezaktywacji czynników wirulencji. Ponieważ metoda aPDI może być wykorzystana do inaktywacji białek, lipidów czy kwasów nukleinowych, uważam, że może to być bardzo dobra metoda zwalczania bakteryjnych czynników wirulencji. Temu zagadnieniu poświęcony jest projekt naukowy pt. „Wpływ przeciwdrobnoustrojowej fotoinaktywacji na wirulencję szczepów *Staphylococcus aureus* kolonizujących chorych z atopowym zapaleniem skóry: badania *in vitro* oraz *in vivo*”, którego realizację rozpoczęłam w sierpniu 2018 r. (Projekt finansowany jest przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursu OPUS, zakończenie projektu planuję na rok 2021).

Kolejnym aspektem jest możliwość zastosowania aPDI jako metody dezynfekcji powierzchni, np. w placówkach medycznych. Jest to zagadnienie o dużym potencjale aplikacyjnym, dlatego w ramach inicjatywy Cornet (Narodowe Centrum Badań i Rozwoju) we



wrześniu br. został złożony projekt z moim udziałem pt. „Eradication and control of extended drug resistant (XDR) bacteria and *Clostridium difficile* on surfaces – emerging threats in health care facilities.” W ramach tej inicjatywy rozpoczęłam współpracę z dwoma grupami badawczymi: z Belgii (Guillame Wegria, Materia Nova ASBL, Mons, Belgium) i Niemiec (Markus Wehrl, Wfk – Cleaning Technology Institute e.V., Krefeld, Germany; David Dietz, Fraunhofer Institut, Potsdam, Germany). Jest to zupełnie nowa tematyka badawcza, która będzie dotyczyć zwalczania mikroorganizmów o rozszerzonym spektrum lekooporności i przetrwalnikujących bakterii *C. difficile* z wykorzystaniem m.in. metody aPDI.

Kontynuując moje dotychczasowe zainteresowania, planuję podjąć tematykę poszukiwania i analizy nowych związków fotouczulających. W praktyce klinicznej metoda aPDI wykorzystywana jest głównie w oparciu o związki porfiryne. Ze względu na neutralny lub ujemny ładunek tych związków, ich oddziaływanie z komórkami drobnoustrojów jest znikome. Stąd moje zainteresowanie takimi modyfikacjami związków porfirykowych, które będą zwiększać ich efektywność wobec mikroorganizmów. Z moich dotychczasowych doświadczeń wynika, że protoporfiryna IX nie jest substratem dla pomp typu efflux (np. transportera HrtAB, który usuwa nadmiar toksycznego hemu z komórek *S. aureus*), a zatem modyfikacje tej struktury chemicznej będą stanowić dobry punkt wyjściowy do uzyskania związków przeciwdrobnoustrojowych, które nie będą usuwane z komórki przez działanie przezbłonowego transportera HrtAB. Z dotychczasowych badań przeprowadzonych w naszym zespole wynika, że protoporfiryna IX modyfikowana poprzez dodanie peptydów wykazuje większą hydrofilowość, a jednocześnie efektywnie lokalizuje się w błonie zewnętrznej komórek Gram-ujemnych, doprowadzając do ich efektywnej fotoinaktywacji. W ramach realizacji tego zagadnienia podjęłam współpracę z grupą badawczą kierowaną przez dr hab. Tim’a Maisch’a (University Hospital Regensburg, Niemcy). W ramach tej współpracy planuję złożenie wspólnego międzynarodowego projektu w ramach konkursu Beethoven Life 1 (Narodowe Centrum Nauki), pt.: „Photoantimicrobials for tackling drug-resistant infections.” Projekt dotyczy wykorzystania metody aPDI w oparciu o nowe związki fotouczulające w zwalczaniu bakterii z grupy ESKAPE.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Moja praca naukowo-badawcza rozpoczęła się w trakcie jednolitych studiów magisterskich podjętych na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii UG i GUMed (wówczas UG i AMG). Studiowanie na tym wydziale dawało unikalną możliwość bardzo szybkiego dołączenia do wybranej grupy badawczej i rozpoczęcia praktyki w laboratorium. Stąd też, będąc na drugim roku studiów pod opieką dr Krzysztofa Bielawskiego zaczęłam zgłębiać tajniki pracy z ludzkim i bakteryjnym DNA.

W trakcie pracy magisterskiej wykonywanej pod opieką dr Diany Wojtkowiak zajęłam się konstruowaniem wektorów ekspresyjnych do nadprodukcji białek antyoksydacyjnych (ludzkich dysmutaz ponadtlenkowych, katalazy) w systemie bakteryjnym (*E. coli*) i drożdżowym (*Pichia pastoris*). W konsekwencji moja praca magisterska dotyczyła stworzenia bakteryjnego systemu do ekspresji genu ludzkiej katalazy. Po obronie pracy magisterskiej dołączyłam do grupy prof. dr hab. Anny Podhajskiej, która wówczas była kierownikiem Katedry Biotechnologii na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii UG i GUMed.

Początkowy etap mojej pracy skupiał się wokół tematyki opracowywania nowych technologii uzyskiwania rekombinowanych białek dla celów terapeutycznych i przemysłowych. W ramach projektu KBN (0293/P04/2001/21 (2001-2004), który realizowany był we współpracy z prof. dr hab. Józefem Dulakiem przygotowywałam konstrukty plazmidowego DNA, które służyły do

uzyskiwania szczepów *Pichia pastoris* wydajnie nadprodukujących rekombinowane białko ludzkiej katalazy, optymalizowałam proces produkcji i oczyszczania białka z komórek *Pichia pastoris*. Dodatkowo skonstruowałam wektory zawierające gen ludzkiej katalazy pod kontrolą eukariotycznego promotora do badań nad wpływem reaktywnych form tlenu na proces angiogenezy w komórkach eukariotycznych. Efektem tych doświadczeń są publikacje w materiałach konferencyjnych i jedna publikacja recenzowana (Grzenkowicz-Wydra et al. 2004).

W 2002 roku rozpoczęłam badania nad systemem restrykcyjno-modyfikacyjnym MmeI pochodzącym z bakterii *Methylophilus methylotrophus*. W skład systemu restrykcyjno-modyfikacyjnego MmeI wchodzi endonukleaza restrykcyjna opisana po raz pierwszy przez Boyd i in. oraz metylotransferaza odkryta i scharakteryzowana w zespole prof. dr hab. Anny Podhajskiej. Ze względu na duże znaczenie komercyjne endonukleazy restrykcyjnej MmeI, polegające na wykorzystaniu jej jako narzędzia w metodzie SAGE (ang. Serial Analysis of Gene Expression) przez wiele lat przygotowywałam, wspólnie z innymi członkami Laboratorium Opracowań Biotechnologicznych, preparat enzymatyczny MmeI z przeznaczeniem na sprzedaż. W ramach tej działalności przygotowywałam wzorce masowe DNA, które były sprzedawane do innych laboratoriów. Wspólna działalność pracowników Laboratorium Opracowań Biotechnologicznych została nagrodzona pierwszą nagrodą na Targach INNOWACJE 2003 w Gdańsku za przygotowywanie preparatów o znaczeniu dla diagnostyki molekularnej.

Moje zainteresowania naukowe skierowałam jednak ku badaniom podstawowym, a mianowicie postanowiłam zgłębiać wiedzę dotyczącą zależności pomiędzy strukturą i funkcją białek. Jako model badawczy wybrałam enzymy restrykcyjne. Tematyka badawcza związana z enzymami restrykcyjnymi była mnie dla mnie o tyle interesująca, że pozwalała na łączenie badań podstawowych z działalnością o charakterze aplikacyjnym. W ramach realizacji pracy doktorskiej badałam właściwości przedstawiciela bardzo ciekawej grupy enzymów restrykcyjnych klasy IIS – enzymu MmeI (Nakonieczna et al. 2009; Nakonieczna et al. 2007). Scharakteryzowałam pod względem genetycznym i funkcjonalnym poszczególne domeny białka (endonukleolityczną, metylującą, wiążącą DNA), co przyczyniło się do wyjaśnienia mechanizmu działania tego enzymu. Wówczas nawiązałam współpracę z dr Januszem Bujnickim z Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie, Laboratorium Bioinformatyki i Inżynierii Białek. W ramach tej współpracy stworzony został model cząsteczki MmeI *in silico*, który bardzo dobrze koreluje z wynikami analiz biochemicznych przeprowadzonych w celu identyfikacji centrum aktywnego MmeI. Badania te były finansowane z grantu promotorskiego przyznanego przez MNiSW (nr 2 P04B 007 28), którego byłam głównym wykonawcą, a kierownikiem była prof. dr hab. Anna J. Podhajska. Po śmierci prof. A.J. Podhajskiej promotorem mojej pracy doktorskiej został prof. dr hab. Tadeusz Kaczorowski (Wydział Biologii UG).

Po obronie pracy doktorskiej w listopadzie 2007 r. dołączyłam do zespołu badawczego prof. dr. hab. Krzysztofa P. Bielawskiego, gdzie realizowałam tematykę związaną z diagnostyką molekularną zakażeń bakteriami z rodzaju *Helicobacter*. Wyniki pracy naukowej z tamtego okresu opublikowałam w czasopiśmie krajowych i międzynarodowych (Nakonieczna et al. 2010; Rybicka et al. 2011; Rybicka et al. 2010). W tym czasie uzyskałam finansowanie z Narodowego Centrum Nauki na badania dotyczące metody fotodynamicznej i rozpoczęłam realizację tematyki związanej z poszukiwaniem i analizą bakteryjnych czynników komórkowych mających wpływ na efektywność aPDI jako wiodącej tematyki badawczej (co złożyło się na moje osiągnięcie naukowe). Jednocześnie brałam udział w badaniach naukowych dotyczących innych aspektów tematyki fotodynamicznej. Jako główny wykonawca grantu Lider pt.: "Nanobiotechnologia jako

innowacyjne podejście w leczeniu zakażeń ran oparzeniowych.” analizowałam wpływ nanocząsteczek srebra na bakterie *S. aureus* rosnące w formie planktonicznej i w formie biofilmu (Nakonieczna et al. 2013). W ramach realizacji wspomnianego grantu byłam odpowiedzialna również za poprawne przeprowadzenie badań *in vivo* na mysim modelu ran chronicznych. W tym celu nawiązałam współpracę z prof. Lotharem Lilge, kierownikiem Katedry Biofizyki na Uniwersytecie w Toronto (Kanada). Efekty tej współpracy zawarte są w dwóch publikacjach naukowych (Fila et al. 2016; Grinholc et al. 2015). Byłam również wykonawcą innego grantu Narodowego Centrum Nauki realizowanego w Zakładzie Diagnostyki Molekularnej, który dotyczył analizy mechanizmów szczepowo-zależnej odpowiedzi *S. aureus* na aPDI, gdzie miałam udział głównie w projektowaniu doświadczeń, analizie uzyskanych wyników, a także przygotowaniu manuskryptów (Grinholc et al. 2011; Kossakowska et al. 2013).

W roku 2011 zainteresowałam się metodami „omicznymi”, które stanowią bardzo dobre narzędzie do wieloczynnikowej analizy danego układu badawczego. Aby poznać możliwości stosowania tego typu metodyki aplikowałam o krótkoterminowe stypendium na pobyt w zagranicznym ośrodku badawczym specjalizującym się w analizach proteomicznych. Odbyłam staż, finansowany przez FEBS, w grupie badawczej kierowanej przez prof. Michaela Heckera, (Ernst-Moritz-Arndt Universität, Greifswald, Niemcy), w czasie którego realizowałam własny projekt pt.: „Proteomic analysis of *Staphylococcus aureus* strains differently responding to photodynamic inactivation.” Dodatkowo uzyskałam, w ramach otwartego konkursu, finansowanie na odbycie stażu w firmie Decodon GmbH (Greifswald, Germany), zajmującej się tworzeniem programów komputerowych do analiz biologicznych. Flagowym produktem firmy jest oprogramowanie Delta2D do ilościowej analizy sygnałów fluorescencji w żelach poliakrylamidowych po rozdziale elektroforetycznym białek w elektroforezie dwukierunkowej (2D-PAGE).

Kontynuując tematykę badań „omicznych” od kilku lat współpracuję z prof. dr hab. Agatą Kot-Wasik (Katedra Chemii Analitycznej Politechniki Gdańskiej) realizując projekt dotyczący lipidomiki *S. aureus*. W ramach realizacji tego projektu opracowałam metodę hodowli i ekstrakcji lipidów z komórek bakteryjnych. Współpracowałam jako bezpośredni opiekun z Weroniką Hewelt-Belka (wówczas doktorantką prof. A. Kot-Wasik) w biologicznej części doświadczeń. Współpraca ta zaowocowała publikacjami naukowymi, z których jedna dotyczyła opracowania i walidacji metody analitycznej polegającej na stworzeniu profilu lipidowego z *S. aureus* (Hewelt-Belka et al. 2014), a druga na wykorzystaniu tejże metody do zbadania korelacji pomiędzy składem lipidów błony bakteryjnej a opornością na antybiotyki (Hewelt-Belka et al. 2016). W obydwu publikacjach jestem drugim autorem.

### *Cytowana literatura*

- Alves E, Faustino MA, Neves MG, Cunha A, Tome J, Almeida A (2014) An insight on bacterial cellular targets of photodynamic inactivation. *Future Med Chem* 6(2):141-164
- Alves E, Melo T, Simoes C, Faustino MA, Tome JP, Neves MG, Cavaleiro JA, Cunha A, Gomes NC, Domingues P, Domingues MR, Almeida A (2013) Photodynamic oxidation of *Staphylococcus warneri* membrane phospholipids: new insights based on lipidomics. *Rapid Commun Mass Spectrom* 27(14):1607-18 doi:10.1002/rcm.6614
- Bacellar IO, Tsubone TM, Pavani C, Baptista MS (2015) Photodynamic Efficiency: From Molecular Photochemistry to Cell Death. *Int J Mol Sci* 16(9):20523-59 doi:10.3390/ijms160920523

- Baptista MS, Cadet J, Di Mascio P, Ghogare AA, Greer A, Hamblin MR, Lorente C, Nunez SC, Ribeiro MS, Thomas AH, Vignoni M, Yoshimura TM (2017) Type I and type II photosensitized oxidation reactions: guidelines and mechanistic pathways. *Photochem Photobiol* 93(4):912-919 doi:10.1111/php.12716
- Beardsley J, Halliday CL, Chen SC, Sorrell TC (2018) Responding to the emergence of antifungal drug resistance: perspectives from the bench and the bedside. *Future Microbiol* 13:1175-1191 doi:10.2217/fmb-2018-0059
- Beasley FC, Vines ED, Grigg JC, Zheng Q, Liu S, Lajoie GA, Murphy ME, Heinrichs DE (2009) Characterization of staphyloferrin A biosynthetic and transport mutants in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 72(4):947-963
- Berger B, Marquardt H, Westendorf J (1996) Pharmacological and toxicological aspects of new imidazoacridinone antitumor agents. *Cancer Res* 56(9):2094-2104
- Bischoff M, Dunman P, Kormanec J, Macapagal D, Murphy E, Mounts W, Berger-Bachi B, Projan S (2004) Microarray-based analysis of the *Staphylococcus aureus* sigmaB regulon. *J Bacteriol* 186(13):4085-99 doi:10.1128/JB.186.13.4085-4099.2004
- Brown S (2012) Clinical antimicrobial photodynamic therapy: phase II studies in chronic wounds. *J Natl Compr Canc Netw* 10 Suppl 2:S80-3
- Cholody WM, Martelli S, Paradziej-Lukowicz J, Konopa J (1990) 5-[(Aminoalkyl)amino]imidazo[4,5,1-de]acridin-6-ones as a novel class of antineoplastic agents. Synthesis and biological activity. *J Med Chem* 33(1):49-52
- Dosselli R, Million R, Puricelli L, Tessari P, Arrigoni G, Franchin C, Segalla A, Teardo E, Reddi E (2012) Molecular targets of antimicrobial photodynamic therapy identified by a proteomic approach. *J Proteomics* 77:329-43 doi:10.1016/j.jprot.2012.09.007
- Fila G, Kasimova K, Arenas Y, Nakonieczna J, Grinholc M, Bielawski KP, Lilge L (2016) Murine model imitating chronic wound infections for evaluation of antimicrobial photodynamic therapy efficacy. *Front Microbiol* 7:1258 doi:10.3389/fmicb.2016.01258
- Gertz S, Engelmann S, Schmid R, Ohlsen K, Hacker J, Hecker M (1999) Regulation of sigmaB-dependent transcription of sigB and asp23 in two different *Staphylococcus aureus* strains. *Mol Gen Genet* 261(3):558-66
- Gollmer A, Felgentraeger A, Maisch T, Flors C (2017) Real-time imaging of photodynamic action in bacteria. *J Biophotonics* 10(2):264-270 doi:10.1002/jbio.201500259
- Grinholc M, Nakonieczna J, Fila G, Taraszkievicz A, Kawiak A, Szewczyk G, Sarna T, Lilge L, Bielawski KP (2015) Antimicrobial photodynamic therapy with fulleropyrrolidine: photoinactivation mechanism of *Staphylococcus aureus*, *in vitro* and *in vivo* studies. *Appl Microbiol Biotechnol* 99(9):4031-43 doi:10.1007/s00253-015-6539-8
- Grinholc M, Richter M, Nakonieczna J, Fila G, Bielawski KP (2011) The connection between agr and SCCmec elements of *Staphylococcus aureus* strains and their response to photodynamic inactivation. *Photomed Laser Surg* 29(6):413-419
- Grinholc M, Szramka B, Kurlenda J, Graczyk A, Bielawski KP (2008) Bactericidal effect of photodynamic inactivation against methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* is strain-dependent. *J Photochem Photobiol B* 90(1):57-63
- Grzenkowicz-Wydra J, Cisowski J, Nakonieczna J, Zarebski A, Udilova N, Nohl H, Jozkowicz A, Podhajaska A, Dulak J (2004) Gene transfer of CuZn superoxide dismutase enhances the synthesis of vascular endothelial growth factor. *Mol Cell Biochem* 264(1-2):169-81
- Henderson BW, Busch TM, Snyder JW (2006) Fluence rate as a modulator of PDT mechanisms. *Lasers Surg Med* 38(5):489-493
- Hewelt-Belka W, Nakonieczna J, Belka M, Baczek T, Namiesnik J, Kot-Wasik A (2014) Comprehensive methodology for *Staphylococcus aureus* lipidomics by liquid chromatography and quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1362:62-74
- Hewelt-Belka W, Nakonieczna J, Belka M, Baczek T, Namiesnik J, Kot-Wasik A (2016) Untargeted lipidomics reveals differences in the lipid pattern among clinical isolates of *Staphylococcus*

- aureus* resistant and sensitive to antibiotics. J Proteome Res 15(3):914-22 doi:10.1021/acs.jproteome.5b00915
- Jermy A (2017) Stop neglecting fungi. Nature Microbiology 2:17120 doi:10.1038/nmicrobiol.2017.120
- Jesionek HvT, H. (1905) Zur Behandlung der Hautcarcinome mit fluoreszierenden Stoffe. [On the treatment of skin carcinomas with fluorescent substances]. Dtsch Arch Klin Med 82:3
- Kossakowska M, Nakonieczna J, Kawiak A, Kurlenda J, Bielawski KP, Grinholc M (2013) Discovering the mechanisms of strain-dependent response of *Staphylococcus aureus* to photoinactivation: oxidative stress toleration, endogenous porphyrin level and strain's virulence. Photodiagnosis Photodyn Ther doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2013.02.004
- Mack J, Vermeiren C, Heinrichs DE, Stillman MJ (2004) *In vivo* heme scavenging by *Staphylococcus aureus* IsdC and IsdE proteins. Biochem Biophys Res Commun 320(3):781-788
- Maisch T, Baier J, Franz B, Maier M, Landthaler M, Szeimies RM, Baumler W (2007) The role of singlet oxygen and oxygen concentration in photodynamic inactivation of bacteria. Proc Natl Acad Sci U S A 104(17):7223-8 doi:10.1073/pnas.0611328104
- Moriwaki Y, Caaveiro JM, Tanaka Y, Tsutsumi H, Hamachi I, Tsumoto K (2011) Molecular basis of recognition of antibacterial porphyrins by heme-transporter IsdH-NEAT3 of *Staphylococcus aureus*. Biochemistry 50(34):7311-7320
- Morley S, Griffiths J, Philips G, Moseley H, O'Grady C, Mellish K, Lankester CL, Faris B, Young RJ, Brown SB, Rhodes LE (2013) Phase IIa randomized, placebo-controlled study of antimicrobial photodynamic therapy in bacterially colonized, chronic leg ulcers and diabetic foot ulcers: a new approach to antimicrobial therapy. Br J Dermatol 168(3):617-24 doi:10.1111/bjd.12098
- Muller M, Reiss S, Schluter R, Mader U, Beyer A, Reiss W, Marles-Wright J, Lewis RJ, Pfortner H, Volker U, Riedel K, Hecker M, Engelmann S, Pane-Farre J (2014) Deletion of membrane-associated Asp23 leads to upregulation of cell wall stress genes in *Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol 93(6):1259-68 doi:10.1111/mmi.12733
- Nagata JY, Hioka N, Kimura E, Batistela VR, Terada RS, Graciano AX, Baesso ML, Hayacibara MF (2012) Antibacterial photodynamic therapy for dental caries: evaluation of the photosensitizers used and light source properties. Photodiagnosis Photodyn Ther 9(2):122-31 doi:10.1016/j.pdpdt.2011.11.006
- Nakonieczna J, Grinholc M (2012) Photodynamic inactivation requires innovative approach concerning numerous bacterial isolates and multicomponent sensitizing agents. Photodiagnosis Photodyn Ther 9(4):359-61 doi:10.1016/j.pdpdt.2012.04.002
- Nakonieczna J, Kaczorowski T, Obarska-Kosinska A, Bujnicki JM (2009) Functional analysis of MmeI from methanol utilizer *Methylophilus methylotrophus*, a subtype IIC restriction-modification enzyme related to type I enzymes. Appl Environ Microbiol 75(1):212-23 doi:10.1128/AEM.01322-08
- Nakonieczna J, Rapacka-Zdonczyk A, Kawiak A, Bielawski KP, Grinholc M (2013) Sub-lethal photodynamic inactivation renders *Staphylococcus aureus* susceptible to silver nanoparticles. Photochem Photobiol Sci
- Nakonieczna J, Stalke P, Al-Soud WA, Wadstrom T, Bielawski KP (2010) Detection of *Helicobacter rodentium*-like DNA in the liver tissue of patients with chronic liver diseases by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis and DNA sequence analysis. Diagn Microbiol Infect Dis 68(3):201-207
- Nakonieczna J, Zmijewski JW, Banecki B, Podhajaska AJ (2007) Binding of MmeI restriction-modification enzyme to its specific recognition sequence is stimulated by S-adenosyl-L-methionine. Mol Biotechnol 37(2):127-35
- O'Neill J (2016) Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. The review on antimicrobial resistance.

- Ormond AB, Freeman HS (2013) Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy. *Materials* (Basel) 6(3):817-840 doi:10.3390/ma6030817
- Perlin DS, Rautemaa-Richardson R, Alastrucy-Izquierdo A (2017) The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *Lancet Infect Dis* 17(12):e383-e392 doi:10.1016/S1473-3099(17)30316-X
- Picazo JJ, Gonzalez-Romo F, Candel FJ (2008) Candidemia in the critically ill patient. *Int J Antimicrob Agents* 32 Suppl 2:S83-S85
- Prates RA, Kato IT, Ribeiro MS, Tegos GP, Hamblin MR (2011) Influence of multidrug efflux systems on methylene blue-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother* 66(7):1525-1532
- Preuss A, Zeugner L, Hackbarth S, Faustino MA, Neves MG, Cavaleiro JA, Roeder B (2013) Photoinactivation of *Escherichia coli* (SURF2) without intracellular uptake of the photosensitizer. *J Appl Microbiol* 114(1):36-43 doi:10.1111/jam.12018
- Raab O (1904) Über die Wirkung Fluoreszierenden Stoffe aus Infusorien. [On the effect of fluorescent substances on infusoria.]. *Z Biol* 39:22
- Ragas X, Agut M, Nonell S (2010) Singlet oxygen in *Escherichia coli*: new insights for antimicrobial photodynamic therapy. *Free Radic Biol Med* 49(5):770-6 doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.05.027
- Rybicka M, Nakonieczna J, Stalke P, Bielawski KP (2011) Host response to the presence of *Helicobacter spp.* DNA in the liver of patients with chronic liver diseases. *Pol J Microbiol* 60(2):175-8
- Rybicka M, Stalke P, Bielawski KP, Nakonieczna J (2010) [*Helicobacter spp.* infections in chronic liver damage]. *Postępy Hig Med Dosw (Online)* 64:386-95
- Senn MM, Giachino P, Homerova D, Steinhuber A, Strassner J, Kormanec J, Fluckiger U, Berger-Bachi B, Bischoff M (2005) Molecular analysis and organization of the sigmaB operon in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 187(23):8006-19 doi:10.1128/JB.187.23.8006-8019.2005
- Skaar EP, Humayun M, Bae T, DeBord KL, Schneewind O (2004) Iron-source preference of *Staphylococcus aureus* infections. *Science* 305(5690):1626-1628
- Staerck C, Gastebois A, Vandeputte P, Calenda A, Larcher G, Gillmann L, Papon N, Bouchara JP, Fleury MJJ (2017) Microbial antioxidant defense enzymes. *Microb Pathog* 110:56-65 doi:10.1016/j.micpath.2017.06.015
- Stauff DL, Bagaley D, Torres VJ, Joyce R, Anderson KL, Kuechenmeister L, Dunman PM, Skaar EP (2008) *Staphylococcus aureus* HrtA is an ATPase required for protection against heme toxicity and prevention of a transcriptional heme stress response. *J Bacteriol* 190(10):3588-3596
- Taraszkiewicz A, Grinholc M, Bielawski KP, Kawiak A, Nakonieczna J (2013) Imidazoacridinone derivatives as efficient sensitizers in photoantimicrobial chemotherapy. *Appl Environ Microbiol* 79(12):3692-3702
- Tegos GP, Masago K, Aziz F, Higginbotham A, Stermitz FR, Hamblin MR (2008) Inhibitors of bacterial multidrug efflux pumps potentiate antimicrobial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother* 52(9):3202-3209
- Ventola CL (2015) The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T* 40(4):277-83
- Wainwright M, Maisch T, Nonell S, Plaetzer K, Almeida A, Tegos GP, Hamblin MR (2017) Photoantimicrobials-are we afraid of the light? *Lancet Infect Dis* 17(2):e49-e55 doi:10.1016/S1473-3099(16)30268-7

