

Streszczenie

W niniejszej pracy została opracowana nowa procedura frakcjonowania izoform kazeiny (CN) oraz metoda identyfikacji komórek bakteryjnych. Ponadto, w pracy została zaprezentowana kinetyka wiązania jonów srebra do laktoferryiny (LTF) oraz kazeiny i dodatkowo jonów cynku do kazeiny. Został przedstawiony mechanizm molekularny formowania się kompleksów Ag-LTF, Ag-CN oraz Zn-CN. Dodatkowo, wykazano działanie antybakteryjne nanokompleksów Ag-LTF wobec patogenów o znaczeniu klinicznym. Praca jest ważna ze względu na potrzebę poszukiwania nowych antybiotyków. Zrozumienie mechanizmów oraz kinetyki wiązania jonów srebra do laktoferryiny stanowi niezbędny etap nad wdrożeniem tego typu preparatów do przemysłu.

Przed przystąpieniem do głównego eksperymentu, została opracowana procedura identyfikacji mikroorganizmów wykorzystująca technikę elektroforetyczną oraz spektrometryczną. W następnym etapie zostały rozdzielone białka. Frakcje kazeiny rozdzielono w układzie elektroforezy kapilarnej (CZE), dwu-wymiarowej elektroforezy żelowej (2D GE) oraz wysokosprawnej chromatografii cieczonej (HPLC) sprzężonej ze spektrometrem masowym z laserową jonizacją próbki wspomaganą matrycą z tandemowym analizatorem czasu przelotu (MALDI TOF-TOF MS). Laktoferryina została wyizolowana z serwatki oraz oczyszczona w chromatograficznym układzie kationo-wymiennym. Analiza spektrometryczna pozwoliła na identyfikację sekwencji aminokwasowej, masy oraz profili molekularnych LTF oraz CN. W następnym kroku wyznaczono punkty izoelektryczne badanych białek stosując nowatorską metodę mikromiarczkowania. Badanie kinetyki wiązania metali do białka zostało zaobserwowane w wyniku pomiaru ubytku stężenia wolnych jonów srebra/cynku z roztworu LTF/CN. Wyniki eksperymentalne zostały dopasowane do modelu kinetyki zerowego, pierwszego rzędu oraz do modelu Weberra-Morrisa. W wyniku analizy procesu kinetycznego wyróżniono dwa oddzielne etapy wiązania jonów metali do białka. Tworzenie się nanokompleksów Ag-LTF, AgCN zostało potwierdzone na obrazach wykonanych za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM). Modelowanie molekularne (MD) pozwoliło na identyfikację czterech aminokwasów laktoferryiny uczestniczących w procesie wiązania jonów srebra. Badania spektroskopowe pozwoliły na potwierdzenie miejsc wiązania jonów srebra do laktoferryiny oraz kationów cynku i srebra do kazeiny. Symulacje mechaniki kwantowej (QM) umożliwiły wyjaśnienie dalszych zjawisk zachodzących w wyniku wiązania jonów metali do konkretnych aminokwasów białka. Wykazano, że w pierwszym etapie wiązania jonów metali do białka

następuje szybka adhezja metalu do zewnętrznej powierzchni białka, jego spontaniczna redukcja oraz utworzenie nanocząstek srebra. W drugim etapie kinetyki wiązania zachodzi dyfuzja jonów do wnętrza globuli białka. W ostatnim kroku przeprowadzono eksperyment potwierdzający właściwości antybakteryjne otrzymanych nanokompozytów przeciwko bakteryjnym szczepom o znaczeniu klinicznym, w którym wykazano antybakteryjne właściwości kompleksów Ag-LTF. Do tego celu wykorzystano cytometrię przepływową oraz klasyczne antybiogramy. W pracy wykazano, że połączenie metod instrumentalnych z modelowaniem teoretycznym pozwala na nowe możliwości interpretacyjne zjawisk zachodzących na granicy faz.

Przysiek, 29-08.2016

.....

Miejscowość i data

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Pawel...' followed by a stylized flourish.

Podpis

Abstract

In thesis the new procedure of fractionation casein (CN) isoforms was investigated and the methods of bacterial cell identification was developed. Moreover, the kinetics of silver ions binding into bovine lactoferrin (LTF) and casein and as well zinc ions to casein was presented. The molecular mechanisms of Ag-LTF, Ag-CN and Zn-CN complexes formation and the effectiveness of Ag-LTF complexes as an antimicrobial agent was shown. The work is important because of the need for novel, effective antibiotics and the large quantities of LTF commonly available in bovine milk. A thorough understanding of the kinetics and mechanisms of silver complexes with LTF could fundamentally facilitate its industrialization.

The procedure of microorganism identification using spectrometry and electrophoretic approach was developed before the main experiments. Further step the protein was separated. The casein fraction was separated in capillary electrophoresis (CE), two-dimentional gel electrophoresis (2D GE) and high performance liquid chromatography (HPLC) combine with matrix-assisted laser desorption/ionization with tandem time of flight analyzer mass spectrometer (MALDI TOF-TOF MS). Prior to the experiments, the LTF was isolated from whey and purified chromatographically in cation exchange and molecular weight cut-off columns. Mass spectrograms identified the amino acid sequences of LTF, CN molecular weight and characterized its molecular profile while titration studies found its isoelectric point. The kinetics of binding were then observed experimentally by observing the decrease in free silver/zinc ion concentration over time in a solution of LTF/CN. The kinetic results were fit to zero, first, and second order kinetic models and the values of the model parameters with regression analysis were reported. This analysis distinguished two separate stages of metal binding to protein over time. The formation of Ag-LTF, Ag-CN complexes was also confirmed in TEM images. Molecular dynamics (MD) analysis identified four candidate amino acid binding sites for the silver on the globular surface. Silver binding to these sites of LTF was supported by FTIR spectral data. Quantum mechanics (QM) simulations further explored the interaction between silver and those amino acid motifs. The modeling results supporting the mechanistic theory that the first kinetic stage of Ag-LTF, Ag-CN and Zn-CN complexes formation is the fast adhesion of metal to protein's external surface and spontaneous reduction and formation of silver nanoparticles. The second kinetic stage is the integration of metal ions into the protein's internal globular structure. The last set of experimental results assesses the effectiveness of Ag-LTF as an antibiotic against several

different laboratory strains of bacteria, as determined using flow cytometry and agar diffusion tests. The research conclusions pertaining to the kinetics and mechanism of silver-LTF complex formation are thus supported by an abundance of evidence from a complement of convincing experimental and modeling results.

Przysiek, 29-08.2016

.....

Miejscowość i data

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Pawel...' followed by a stylized flourish.

Podpis