

Streszczenie rozprawy doktorskiej

mgr Dominika Bartnicka

Promotor: prof. dr hab. Maria Rapała-Kozik

Tytuł: „Protekcjna rola komórek *Candida albicans* względem bakterii *Porphyromonas gingivalis* formujących biofilm mieszany występujący w schorzeniach przyzębia”

Jama ustna należy do jednych z nisz organizmu ludzkiego zasiedlanych przez szereg różnorodnych mikroorganizmów, które oddziałując ze sobą oraz z komórkami gospodarza, tworzą stabilne struktury przestrzenne nazywane biofilmami. W konsekwencji tych oddziaływań może dochodzić do rozwoju chorób przyzębia, które obecnie zaliczane są do jednych z najczęstszych chorób infekcyjnych. Do cech charakteryzujących chroniczne infekcje przyzębia zaliczane jest obniżenie linii dziąseł i kości wyrostka okołożębowego, a także degradacja tkanek podporowych zębów. Gdy stany infekcyjne pozostają nieleczone, procesy destrukcyjne dziąseł mogą doprowadzić nie tylko do krwawień, ale nawet do wypadania zębów. Istnieje wiele doniesień literaturowych wskazujących na powiązanie chorób przyzębia z licznego rodzaju chorobami układowymi, spośród których wymienić można reumatoidalne zapalenie stawów, cukrzycę, osteoporozę, choroby układu krążenia czy chorobę Alzheimera.

Jednymi z najistotniejszych organizmów zaangażowanych w rozwój infekcji obejmujących przyzębie, są beztlenowe bakterie *Porphyromonas gingivalis*. Dysponują one całym arsenałem czynników wirulencji, które są wykorzystywane nie tylko podczas interakcji z komórkami gospodarza, ale także w oddziaływaniu z innymi mikroorganizmami, zarówno bakteriami jak i drożdżakami.

Drożdżaki z gatunku *Candida albicans* są zaliczane do jednych z ważniejszych kolonizatorów jamy ustnej. Komórki drożdżaka są składnikiem mikroflory organizmu człowieka i występują nawet u około 70% osobników populacji. W sytuacji, w której dochodzi do obniżenia odporności gospodarza, te na ogół komensalne mikroorganizmy, mogą przekształcać się w chorobotwórcze patogeny wywołujące u ludzi, nie tylko nawracające zakażenia śluzówki, ale w sprzyjających warunkach nawet zagrażające życiu ogólnoustrojowe zakażenia o wysokim wskaźniku śmiertelności. Drożdżaki *C. albicans* dysponują szeregiem czynników wirulencji,

które są wykorzystywane podczas adhezji, zasiedlania i infekcji komórek gospodarza oraz są zaangażowane w oddziaływanie z innymi mikroorganizmami, m. in. z bakteriami *P. gingivalis*.

Komórki *C. albicans* tworzą biofilmy zdolne do wytwarzania w swoim obrębie heterogennych warunków wspomagających wzrost innych mikroorganizmów. Wykazano, że w biofilmie drożdżowym występuje gradient stężenia tlenu, co skutkuje tym, że we wnętrzu tej struktury powstaje mikrośrodowisko hipoksyczne, które wspiera wzrost niektórych bakterii beztlenowych.

W świetle danych literaturowych, celem badań przeprowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej było m. in. zbadanie czy koegzystencja drożdżaków *C. albicans* i bakterii *P. gingivalis* ma charakter kooperacji czy konkurencji i czy tworzone przez te mikroorganizmy struktury biofilmów mają dla bakterii charakter protekcyjny w warunkach obecności tlenu.

W toku prowadzonych badań podjęto próbę określenia w jaki sposób oddziałują ze sobą komórki *C. albicans* i *P. gingivalis* oraz jaka panuje pomiędzy nimi relacja podczas formowania mieszanych biofilmów. W tym celu opracowano trzy modele eksperymentalne biofilmu reprezentujące kontakt mikroorganizmów, zarówno w warunkach tlenowych jak i beztlenowych oraz badano krótki i długi czas ich formowania. Modele te obrazowały różne sytuacje w stanach infekcyjnych przyzębia i pozwoliły określić sposoby oddziaływania badanych mikroorganizmów w wybranych warunkach. Pierwsze dwa modele, sekwencyjny typu I i typu II, obrazowały sytuacje, w których wstępnie uformowany, dojrzały biofilm wchodził w kontakt z drugim patogenem. Natomiast trzeci model, wspólny, reprezentował sytuację, w której dochodziło do równoczesnego tworzenia biofilmu przez oba typy mikroorganizmów, na wspólnie zasiedlanej sztucznej powierzchni.

Bakterie *P. gingivalis* posiadają szereg czynników wirulencji, pośród których fimbrie są wskazywane jako struktury, które nie tylko uczestniczą w oddziaływaniu z komórkami gospodarza, ale także zaangażowane są w kontakt z innymi mikroorganizmami. Zatem w rozprawie doktorskiej rozważano udział fimbrii w formowaniu mieszanego biofilmu przez bakterie *P. gingivalis* i drożdżaki *C. albicans* oraz analizowano jak oba typy mikroorganizmów wpływają wzajemnie na swoją żywotność. W badaniach tych zastosowano dwa szczepy bakterii *P. gingivalis* o różnicowanej ekspozycji fimbrii: szczep *P. gingivalis* W83 oraz szczep ATCC 33277. Otrzymane wyniki wykazały, że podczas krótkiego kontaktu dojrzałego biofilmu bakteryjnego utworzonego przez szczep ATCC 33277 z komórkami *C. albicans* w warunkach tlenowych dochodziło do wzrostu żywotności drożdżaka, wskazując na stymulację

wzrostu jego komórek przez nieznaną czynnik bakteryjny. W tych samych warunkach, faworyzujących wzrost drożdżaków wykazano, że obecność komórek *C. albicans* działa protekcyjnie na żywotność bakterii obu szczepów. Z kolei w warunkach beztlenowych, gdzie rozwój bakterii dominuje, krótki kontakt z drożdżakami powodował znaczący spadek ich żywotności, natomiast podczas wydłużonego kontaktu, ponownie obserwowano zwiększony rozwój biofilmu drożdżowego, który przewyższał poczyniony wcześniej uszczerbek w żywotności komórek *C. albicans*, potwierdzając istnienie niezidentyfikowanego stymulatora ich wzrostu, niezależnie od tego, czy bakterie, z którymi drożdżaki miały kontakt posiadały bardziej lub mniej rozbudowane fimbrie.

Kolejnym ważnym czynnikiem wirulencji bakterii *P. gingivalis* są gingipainy, które są jednymi z głównych enzymów proteolitycznych tych bakterii, zaliczanych do proteinaz cysteinowych. Mają one zasadniczy wkład w aktywność proteolityczną tych bakterii, niezbędną w pozyskiwaniu składników odżywczych. Wykazano także ich zaangażowanie w procesy adhezji i kolonizacji komórek gospodarza, oraz w modulacji odpowiedzi zapalnej komórek obronnych gospodarza. Enzymy te biorą także udział w interakcji z innymi mikroorganizmami i mogą wspomagać wzrost innych bakterii oraz uczestniczyć w modyfikacji biofilmów. W związku z tym, podjęto próbę odpowiedzi na pytanie: w jaki sposób gingipainy zaangażowane są w tworzenie mieszanych biofilmów z udziałem drożdżaków *C. albicans*. Analizę funkcji gingipain przeprowadzono z wykorzystaniem trzech szczepów bakteryjnych: dzikiego szczepu W83, szczepu pozbawionego gingipainy RgpB (w tle szczepu W83) i szczepu pozbawionego wszystkich gingipain: RgpA, RgpB i Kgp (w tle szczepu W83). Otrzymane wyniki analizy oddziaływań między tymi bakteriami i drożdżakami wskazują na zdolność gingipain do regulacji postępu formowania mieszanego biofilmu. Stwierdzono to m.in., że eliminacja genów kodujących gingipainy wywołała spadek właściwości adhezyjnych drożdży do dojrzałego biofilmu bakteryjnego. Potwierdzono także protekcyjne działanie utworzonego wcześniej biofilmu drożdżowego względem bakterii w środowisku tlenowym. Efekt ten był najbardziej wyraźny dla szczepu dzikiego bakterii *P. gingivalis* i szczepu pozbawionego RgpB. W sytuacji, w której drożdżaki i bakterie równocześnie rozpoczęły zasiedlanie powierzchni, zaobserwowano podobne zależności.

Kolejnym czynnikiem wirulencji bakterii *P. gingivalis*, którego wpływ na formowanie mieszanego biofilmu rozważano był bakteryjny zewnątrzkomórkowy enzym, deiminaza peptydyloargininowa (PPAD). Katalizuje on proces cytrulinacji reszt argininy, który w konsekwencji prowadzi nie tylko do modyfikacji białek gospodarza, przez co w istotny sposób

może wpływać na homeostazę organizmu gospodarza, ale także bierze udział w modyfikacji części białek znajdujących na powierzchni bakterii *P. gingivalis*. Tego typu modyfikacje wykazują znaczny wkład w wirulencje bakterii, ponieważ mogą wywierać wpływ nie tylko na kolonizację komórek gospodarza, ale także na formowanie mieszanych biofilmów. By zweryfikować ten problem przeprowadzono analizę porównawczą formowania biofilmów pomiędzy drożdżakami *C. albicans* a bakteriami *P. gingivalis*. Do badań wykorzystano dziki szczep W83 oraz szczep pozbawiony zdolności ekspresjonowania genu kodującego PPAD (w tle szczepu W83). Badania w tym zakresie wykazały, że eliminacja funkcjonalnego enzymu nie wywiera znacznego wpływu na właściwości adhezyjne bakterii w sytuacji, gdy ich komórki tworzą dojrzały biofilm eksponowany na kontakt z drożdżakami *C. albicans*. Zaobserwowano natomiast, że przedłużony kontakt mikroorganizmów prowadził do spadku żywotności bakterii pozbawionych produkcji PPAD w warunkach beztlenowych, podczas gdy w warunkach tlenowych komórki *C. albicans* wpływały stymulująco zarówno na przeżywalność tych bakterii, jak i na ich właściwości adhezyjne. Natomiast w modelu, w którym dojrzały biofilm drożdżowy zasiedlany był przez bakterie zauważono, że drożdże wpływają stymulująco na przeżywalność bakterii pozbawionych PPAD. W modelu równoczesnego zasiedlania powierzchni przez oba typy mikroorganizmów, w warunkach beztlenowych stwierdzono, że bakterie pozbawione PPAD są wrażliwsze na kontakt z komórkami drożdżaków, podczas gdy w warunkach fizjologicznych dla drożdży zaobserwowano nieznaczny efekt stymulujący przeżywalność bakterii szczepu delecyjnego. Wyniki analizy własności adhezyjnych bakterii wykazały, że niezależnie od obecności tlenu, dochodzi do ich obniżenia w wyniku kontaktu z drożdżami. Wydłużony kontakt mikroorganizmów natomiast spowodował wzrost zarówno właściwości adhezyjnych, jak i przeżywalności bakterii Δ PPAD. Z kolei analizy przeprowadzone dla komórek *C. albicans* wskazały, że podczas krótkiego kontaktu z mutantem delecyjnym obserwowano spadek żywotności drożdży, podczas gdy wydłużony kontakt wykazał działanie stymulujące na komórki *C. albicans*.

Kolejnym, istotnym czynnikiem wirulencji bakterii *P. gingivalis* jest białko HmuY, które nie tylko jest zaangażowane w proces pobierania hemu przez bakterie, ale także upatrywane jest jego zaangażowanie w formowanie biofilmów. Weryfikacji udziału tego białka w tworzeniu mieszanego biofilmu pomiędzy *P. gingivalis* a *C. albicans* poddano dwa szczepy *P. gingivalis* z delecją genu kodującego białko HmuY: TO4 (w tle szczepu A7436) i TO15 (w tle szczepu ATCC 33277). Uzyskane wyniki wskazują, że ekspozycja biofilmu utworzonego przez szczep TO4 na kontakt z komórkami *C. albicans* w warunkach faworyzujących wzrost drożdży,

proceeding to the observed earlier for the wild-type strain of protease survival of bacterial mutants in contrast to anaerobic conditions, in which a decrease in the viability of these bacteria in the presence of yeasts was observed. This dependence was observed only for a 3-hour contact, whereas a prolonged contact led to a reduction in the viability of mutants, regardless of the oxygen conditions. Analyzing this situation from the yeast side, it was observed that contact with a biofilm formed by the TO4 strain acted as a stimulant for *C. albicans* cells regardless of the conditions. For the TO15 strain (ATCC 33277) the results were similar to those obtained for the TO4 strain, but only after a longer contact with yeasts in aerobic conditions. Considering the model of co-colonization of the surface, regardless of the time of biofilm formation analysis, a clear protection of wild-type and HmuY-deficient bacteria in contact with *C. albicans* in aerobic conditions was observed.

Microorganisms that form mixed biofilms very often change the level of expression of virulence factors or even their type. Therefore, a comparison was made among the selected virulence factors of *C. albicans* involved in biofilm formation with bacteria *P. gingivalis*. In this part of the study, attention was paid to the comparison of the level of expression of genes encoding selected factors. Additionally, it was checked whether gingipains of *P. gingivalis* have an effect on the expression profile of the yeast. For these analyses, a model of co-biofilm formation by yeasts and bacteria (W83 and Δ KARAB) in aerobic and anaerobic conditions, both for 3 and 24 hours, was used. The analysis of the obtained results allows to state that the response of the yeast is most clearly expressed in aerobic conditions, in contact with bacteria lacking gingipains. A strong increase in the expression of genes encoding adhesins Als3 and Hwp1 was observed. In the case of genes encoding selected serine proteases Sap (Sap3, Sap6, Sap9), they were more active in anaerobic conditions and the effect was more noticeable in the case of contact with a deletion strain.

In the final stage of the study, the response of human cells to the mixed biofilm formed by *P. gingivalis* and *C. albicans* was evaluated. In the analysis, three types of human cells that come into contact with the mixed biofilm were taken into account. The response of keratinocytes and fibroblasts of the oral cavity as well as macrophages to the level of mRNA expression, analyzing the changes in the production of genes encoding selected mediators of the inflammatory response, was studied. It was confirmed that the yeast has a protective role towards bacterial cells during

tworzenia mieszanego biofilmu, w szczególności w kontekście kontaktu z komórkami makrofagów.

Podsumowując, w niniejszej pracy podjęto próbę szerokiego spojrzenia na zagadnienie formowania mieszanego biofilmu tworzonego przez drożdżaki *C. albicans* i beztlenowe bakterie *P. gingivalis*, mikroorganizmy mogące kooperować w zasiedlaniu kieszonek dziąsłowych prowadząc do wzmożonego rozwoju chorób przyzębia. Wykazano, że biofilm drożdżowy może spełniać protekcyjną rolę w stosunku do bakterii, szczególnie gdy te ostatnie znajdują się w środowisku niekorzystnym dla ich rozwoju – w warunkach tlenowych. Przeprowadzono analizę udziału wybranych czynników wirulencji obu mikroorganizmów w formowanie mieszanego biofilmu, wskazując bakteryjne proteazy – gingipainy i drożdżowe adhezyny – Als3 i Hwp1 jako białka odpowiadające za kontakt obu mikroorganizmów. Ponadto, wykazano, że modyfikacja enzymatyczna białek drożdżowych przeprowadzona przez bakteryjny enzym – deiminazę peptydyloargininową odpowiada za regulację zdolności formowania mieszanych biofilmów drożdżowo-bakteryjnych. Nie potwierdzono znaczenia bakteryjnego białka HmuY wiążącego hem w formowaniu tego typu biofilmów. Przeprowadzono także wstępną analizę odpowiedzi wybranych komórek gospodarza na biofilm mieszany.

Meia Repeto-Kalish

Dominika Bartnicka