

Streszczenie

Drożdżaki gatunku *Candida albicans* stanowią element normalnej mikroflory błon śluzowych człowieka, jednak w stanach osłabionej funkcjonalności układu immunologicznego gospodarza mogą nasilać swoją wirulencję przyczyniając się do rozwoju kandydozy. Ze względu na powszechne bytowanie w różnych miejscach organizmu człowieka, mają zdolność nawiązywania interakcji z innymi mikroorganizmami, w tym patogenami. Jednym z takich drobnoustrojów jest beztlenowa bakteria *Porphyromonas gingivalis*, ściśle związana z występowaniem chorób przyzębia. Dotychczas przeprowadzone i prezentowane w literaturze badania skupiają się głównie na wzajemnych interakcjach obu mikroorganizmów w kontekście chorób jamy ustnej, niniejsza rozprawa rozpatruje je jednak w kontekście aspiracji do dróg oddechowych w przebiegu zachłystowego zapalenia płuc.

Biorąc pod uwagę warunki panujące w drogach oddechowych człowieka wszystkie eksperymenty prowadzone były w warunkach tlenowych. Obecność *P. gingivalis* w takim środowisku możliwa jest dzięki wielowarstwowej architekturze grzybiczego biofilmu, która powoduje pojawianie się gradientu tlenu, a jego niskie stężenie w głębi struktury umożliwia przeżycie beztlenowych bakterii, skutkując rozwojem infekcji.

Wiedząc, że jednym z głównych czynników wirulencji opisywanych bakterii jest aktywność enzymów proteolitycznych – gingipain RgpA, RgpB oraz Kgp, powyższe badania realizowano z wykorzystaniem wirulentnego szczepu dzikiego *P. gingivalis* W83 oraz ze szczepem zawierającym delecje genów kodujących gingipainy – szczepu *P. gingivalis* ΔKΔRAB. Ze względu na pewne różnice we właściwościach (w tym nieco odmiennych profilach białek powierzchniowych) różnych szczepów *C. albicans*, sprawdzono modyfikacje zachodzące w biofilmach mieszanych tworzonych przez dwa szczepy *C. albicans* 3147 oraz SC5314.

Celem rozważań zawartych w niniejszej rozprawie było zbadanie modyfikacji grzybiczego transkryptomu, uwzględniającego geny kodujące białka należące do grupy tzw. „master regulatorów”, oraz inne - zaangażowane w adhezję, przebudowę grzybiczej ściany komórkowej, odpowiedź na stres oraz kontrolujące ważne procesy w komórce *C. albicans*, przez bakterie *P. gingivalis* w kontakcie z surowicą ssaczą (FBS) oraz neutrofilami. Ponadto sprawdzono znaczenie wybranych białek regulatorowych dla formowania biofilmów mieszanych w kontekście aktywności i przeżywalności beztlenowych bakterii oraz zmiany

grzybiczego proteomu macierzy formowanych w tych warunkach biofilmów. Badania uzupełniono o weryfikację roli cukrowych składników ściany komórkowej drożdżaków w interakcji z komórkami *P. gingivalis*.

Analizy proteomiczne wykonane z użyciem wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas wskazały na istotne zmiany zachodzące w składzie białkowym macierzy biofilmu (rozpatrując białka grzybicze) w kontakcie drożdżaków zarówno z bakteriami, FBS, jak i neutrofilami. Zgodnie z oczekiwaniami duże zmiany obserwuje się w grupach protein związanych z wirulencją, odpowiedzią na stres, przetwarzaniem informacji genetycznej, ale przede wszystkim w grupie związanej z metabolizmem podstawowych związków budulcowych organizmu. *P. gingivalis* oraz czynniki gospodarza wpływają na produkcję i wydzielanie do macierzy enzymów zaangażowanych w metabolizm węglowodanów, w tym białek z grupy „moonlighting”, które wykazują aktywność w procesach syntezy i degradacji składników ściany komórkowej, ważnych w reorganizacji jej struktury. Ponadto badania proteomiczne pozwoliły na zidentyfikowanie dużej liczby białek ssaczych pochodzenia surowiczego oraz białek neutrofilowych wbudowywanych w macierz biofilmów homo- i heterotypowych. Są to proteiny o istotnym znaczeniu w generowaniu efektywnej odpowiedzi immunologicznej gospodarza: elementy kaskady układu dopełniacza, enzymy antydrobnoustrojowe zawarte w ziarnistościach neutrofilii, składniki neutrofilowych sieci zewnątrzkomórkowych (np. histony), białka tworzące macierz pozakomórkową (m. in.: kolagen, fibronektyna), a także białka układu krzepnięcia. Ich obecność wskazuje na wysoki poziom oddziaływań między wymienionymi składnikami a białkami pochodzenia grzybiczego, a także na zdolność modulowania wzajemnych relacji pomiędzy mikroorganizmami proteomem surowiczym i neutrofilowym.

Znając szczególne znaczenie grupy głównych drożdżowych genów regulujących formowanie biofilmów i kontrolę ekspresji wielu innych genów, zbadano wpływ surowicy oraz bakterii na poziom ich ekspresji w biofilmach mieszanych, tworzonych w modelu zachłystowego zapalenia płuc. Otrzymane metodą qPCR wyniki wskazują na znaczącą indukcję genów drożdżowych przez oba szczepy bakterii, gdzie najwyższy poziom mRNA zaobserwowano dla ekspresji genu *BCR1*, który podlegał także regulacji w kontakcie z FBS. Dodatkowo zbadano wpływ bakterii i surowicy na ekspresję innych genów, kodujących czynniki transkrypcyjne (*CPH1*, *FLO8*, *RLM1*, *TUP1* oraz *UME6*) oraz adhezyny (*ALS3*, *EAP1*, *HWPI*, *HYR1*, *MP65* oraz *PRA1*) istotne na różnych etapach formowania biofilmów: wstępnej adhezji, dojrzewania oraz dyspersji. W ich przypadku również odnotowano wysoki poziom zmian, świadczący o dużej modyfikacji grzybiczego transkryptomu przez te bakterie.

Szczególną uwagę zwrócono na wpływ *P. gingivalis* na reorganizację drożdżowej ściany komórkowej i macierzy biofilmu heterotypowego, Zweryfikowano zmiany poziomów mRNA dla genów kodujących różnorodne enzymy zaangażowane w syntezę i degradację: glukanów (*BGL2*, *FKS2*, *KRE5*, *SKN1*, *SMI1*, *ZAP1*), mannanów (*MNN1*, *MNN9*, *PMT4*), chityny (*CHT2*, *CHT3*) i frakcji lipidowej (*CHO1*, *ERG11*), które okazały się być wrażliwymi na obecność czynników bakteryjnych i surowicznych, z wyjątkiem genów *CHO1* i *ERG11*, których ekspresja w biofilmach mieszanych pozostawała na podobnym poziomie niezależnie do warunków. Zarówno *P. gingivalis*, jak i FBS silnie indukowały geny związane z odpowiedzią na stres (*CTA1*, *HSP90*, *SOD5*), co jest związane z naturalną reakcją organizmów na obecność innych komórek i czynników przez nie wydzielanych. Uzupełnieniem badań genetycznych był test przeżywalności bakterii w biofilmach formowanych z drożdżakami o zaburzonej ścianie komórkowej, wynikającym z inhibicji lub degradacji wybranych jej składników, który wykazał istotne znaczenie mannanów we wzajemnej interakcji i protekcji beztlenowców przed niekorzystnymi warunkami środowiska.

Kolejny etap badań dotyczył określenia znaczenia poszczególnych białek regulatorowych, ważnych w procesie strzępkowania i formowania biofilmów w kontekście tworzenia wspólnych hodowli z bakteriami *P. gingivalis* w obecności surowicy. Już w czasie pierwszych analiz mikroskopowych zauważono, że delecja genów regulatorowych powoduje nierównocenne modyfikacje morfologii komórek, dzięki czemu można było wyróżnić dwie grupy zmodyfikowanych szczepów *C. albicans*: grupę podobną do szczepu dzikiego – o niezaburzonym strzępkowaniu oraz drugą, o wyraźnie zahamowanej filamentacji. Dalsza ilościowa charakterystyka potwierdziła obserwacje jakościowe, wskazując na duże znaczenie białek Efg1, Brg1 oraz Rob1 we wzajemnych interakcjach w biofilmie heterotypowym. Białka te regulują szereg innych genów, w tym główne grzybicze adhezyny, których oddziaływanie z białkami bakteryjnymi wykazano już wcześniej. Główna konkluzja tej części eksperymentów wskazuje na brak konieczności przyjmowania formy strzępkowej przez *C. albicans* dla przeżywalności *P. gingivalis* w warunkach tlenowych oraz szczególne znaczenie białka Efg1 dla wzajemnej interakcji, ze względu m.in.: na aż 10-krotnie wyższą aktywność gingipain w nadsączach biofilmów formowanych z udziałem szczepu *efg1Δ/Δ*.

Druga część badań miała na celu charakterystykę interakcji grzybiczej mannoproteiny Mp65 występującej na powierzchni komórek i jej roli w procesach adhezji drożdżaków w obrębie biofilmu oraz w kontakcie z komórkami nabłonka oskrzeli BEAS-2B. Dane literaturowe wskazują na możliwość wiązania się Mp65 z gingipainą RgpA, stąd sprawdzono także wpływ dodatku białka na formowanie biofilmów heterotypowych, i ich stabilność

w obecności leków: antymikotycznej amfoterycyny B oraz antybakteryjnej – lewofloksacyny. Testy z użyciem białka Mp65 znakowanego biotyną oraz znacznikami fluorescencyjnymi pozwoliły na obserwacje mikroskopowe, które potwierdziły możliwość wiązania tego białka przez komórki nabłonkowe, ale także strzępki *C. albicans*, wskazując na możliwość udziału tego białka w regulacji zasiedlania epitelium przez drożdżaki, gdzie w warunkach hodowli dochodzi do uwalniania Mp65 do środowiska w miejscu infekcji. Podjęto także próby charakterystyki interakcji Mp65 z wybranymi białkami ściany komórkowej (CWP) drożdżaków oraz białek komórek ludzkich ulokowanych w ich błonie komórkowej, stosując metodę sieciowania chemicznego. Na tej podstawie wyłoniono kilka protein drożdżowych (m. in.: Als3, Als5, Cht3, Pra1) oraz ludzkich (m. in.: desmoplakinę, podjednostkę syntazy ATP, oraz białko S100-A7) potencjalnie mogących oddziaływać z Mp65. Ponadto metodą sieciowania chemicznego wskazano również białka osoczowe wchodzące w interakcję z Mp65, dla których następnie przeprowadzono szczegółową analizę kinetyki reakcji z użyciem interferometrii biowarstwowej (BLI).

Podsumowując, przeprowadzone badania pozwoliły na szeroką i wieloaspektową charakterystykę wzajemnych interakcji występujących w biofilmach komórek *C. albicans* i *P. gingivalis* w modelu zachłystowego zapalenia płuc, ze szczególnym uwzględnieniem zmian zachodzących w transkryptomie drożdżaków i proteomie macierzy tworzonych biofilmów. Wykazano, że beztlenowe bakterie mogą przeżywać w biofilmie formowanym w warunkach tlenowych, niezależnie od filamentacji drożdży, a także wskazano na szczególne znaczenie białka Efg1, nadrzędnego regulatora wielu procesów w komórce *C. albicans*, dla tworzenia hodowli heterotypowych. Ponadto zweryfikowano znaczenie struktury ściany komórkowej drożdżaka dla interakcji z *P. gingivalis*, potwierdzone wysokim poziomem indukcji wielu genów drożdżowych zaangażowanych w tworzenie biofilmu i przebudowę ściany komórkowej. Mimo wykonania wielu różnorodnych metodycznie eksperymentów, nie udało się jednoznacznie określić mechanizmu działania Mp65 w procesie interakcji w obrębie formowanego biofilmu drożdżowego i oddziaływaniu z komórkami BEAS-2B, niemniej jednak wskazano jego możliwe zaangażowanie w procesy zintensyfikowanego zasiedlania i kolonizacji komórek epitelialnych przez strzępkujące komórki *C. albicans*.