

Streszczenie

Tkanka nabłonkowa stanowi pierwszą linię obrony przed patogenami. Ze względu na pełnione funkcje jest wyposażona w wiele endogennych białek i peptydów, które odgrywają rolę w kontroli mikrobiomu i utrzymaniu homeostazy miejsc barierowych. Jednym z nich jest chemeryna, wielofunkcyjne białko związane ze stanem zapalnym, które działając jak czynnik antybakteryjny oraz chemotaktyczny może potencjalnie wspierać funkcję ochronną bariery nabłonkowej. Pochodzący z chemeryny, syntetyczny peptyd 4 (p4), który odpowiada wewnętrznej sekwencji chemeryny (Val⁶⁶-Pro⁸⁵) wykazuje szerokie spektrum działania przeciwdrobnoustrojowego. Głównym celem podjętych badań było określenie roli chemeryny i jej bioaktywnych pochodnych w ograniczaniu rozrostu bakterii zasiedlających tkanki nabłonkowe oraz scharakteryzowanie mechanizmów warunkujących wrażliwość/oporność bakterii na działanie peptydów chemerynowych.

W niniejszej pracy opisano znaczenie chemeryny i jej antybakteryjnych pochodnych w jamie ustnej. Peptyd p4 wykazywał właściwości antybakteryjne względem niektórych bakterii, o strategicznym znaczeniu w procesie tworzenia biofilmu jamy ustnej, takich jak *F. nucleatum*. Bakterie te mogą wpływać na kolonizację jamy ustnej przez typowe mikroorganizmy patogenne. Uzyskane wyniki sugerują, że poprzez hamowanie wzrostu *F. nucleatum*, chemeryna i p4 mogą wspierać utrzymanie równowagi mikrobiomu jamy ustnej. Co więcej, chemeryna występująca w płynach ze szczelin dziąsłowych, izolowanych od pacjentów z zapaleniem przyzębia była w stanie indukować zależną od swojego receptora migrację leukocytów, co sugeruje również jej pośredni wpływ na mikroflorę jamy ustnej poprzez sprzyjanie napływowi komórek układu odporności.

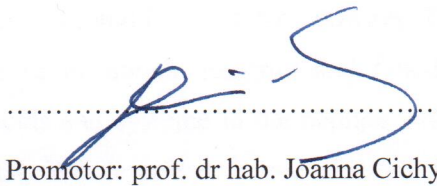
W pracy również wykazano, że dzięki różnicowej aktywności przeciwdrobnoustrojowej względem wybranych bakterii skórnych, chemeryna może wpływać na kształtowanie składu mikrobiomu skóry. Chemeryna i p4 charakteryzowały się podobnym „wzorem działania antybakteryjnego” wobec drobnoustrojów skóry, przy czym p4 wykazywał na ogół wyższy potencjał bakteriobójczy w porównaniu do chemeryny. Ponadto w badaniach nad cytotoksycznością p4 z wykorzystaniem keratynocytów i erytrocytów, udało się wykazać, że peptyd ten jest względnie bezpieczny dla komórek gospodarza. Dane te sugerują, iż p4 może być uznany za nowy czynnik przeciwdrobnoustrojowy w miejscach barierowych.

W następnej części pracy podjęto próbę opisu mechanizmu działania p4 w celu poznania przyczyny odmiennej wrażliwości różnych gatunków bakterii na działanie peptydu. Dzięki zastosowaniu technik mikroskopii elektronowej wykazano, że celem ataku peptydu p4 była błona

bakterii oraz inne komponenty wewnątrzkomórkowe. Główny mechanizm działania peptydu p4 wynikał z zaburzenia ciągłości i funkcji błony bakterii. W pracy określono rolę dodatnio naładowanych aminokwasów oraz cysteiny w sekwencji peptydu, w kształtowaniu przeciwdrobnoustrojowej aktywności p4. Zaprezentowano unikalny model interakcji między składnikiem łańcucha oddechowego cytochromem bc_1 , a p4, który stymuluje zależną od mostków dwusiarczkowych dimeryzację p4 i zwiększa skuteczność działania peptydu. Na tej podstawie stwierdzono, że potencjał przeciwdrobnoustrojowy p4 można modulować w określonych warunkach. Dla przykładu, środowisko utleniające zwiększało aktywność p4, podczas gdy fenotyp fazy stacjonarnej sprzyjał oporności bakterii na działanie p4.

Jak wiadomo, oprócz klasycznych strategii oporności na antybiotyki, do których zalicza się m.in. wytwarzanie enzymów inaktywujących lub pomp aktywnie usuwających antybiotyki z komórki (efflux), bakterie mogą generować tolerancję lub odporność na warunki stresowe poprzez przeprogramowanie metabolizmu komórkowego i spowolnienie wzrostu. W rezultacie wolno rosnące komórki są bardziej odporne na trudne warunki, w tym na obecność w środowisku p4. RpoS jest kluczowym czynnikiem transkrypcyjnym, który reguluje odpowiedź stresową u *E. coli*, ulegającym ekspresji głównie w fazie stacjonarnej. Na podstawie przytoczonych danych postawiono hipotezę, że mechanizm oporności na p4 może się opierać na zależnym od RpoS spowolnieniu wzrostu. Pozbawienie *E. coli* funkcjonalnego RpoS za pomocą modyfikacji genetycznych spowodowało spadek oporności na p4 tylko u bakterii występujących w fazie stacjonarnej. Co więcej, obecność RpoS ograniczała wiązanie p4 z powierzchnią bakterii. Wyniki te wskazują na istnienie zależnego od RpoS mechanizmu oporności bakterii na peptyd chemerynowy, który polega między innymi na blokowaniu interakcji pomiędzy p4 i komórką bakteryjną.

Podsumowując, badania przedstawione w tej rozprawie pozwalają na lepsze zrozumienie roli chemeryny i jej pochodnych w kontrolowaniu liczebności i składu drobnoustrojów w jamie ustnej oraz skórze. Przeprowadzone badania doprowadziły do opisanie modelu działania peptydu p4 oraz potencjalnego mechanizmu oporności bakteryjnej na p4. Biorąc pod uwagę fakt, że p4 może hamować wzrost szczepów opornych na antybiotyki, w tym metacyliinoopornych *S. aureus*, peptyd ten może w przyszłości stanowić alternatywę dla tradycyjnych leków o działaniu antybakteryjnym.



.....

Promotor: prof. dr hab. Joanna Cichy

Abstract

The epithelium provides an important, first line of defense against pathogens. Epithelial tissue is equipped with many endogenous proteins and peptides, that play a central role in controlling the microbiome and maintaining the homeostasis of the body's barrier sites. These include chemerin, a multifunctional protein associated with inflammation, that likely facilitates protective epithelial barrier function, through acting as an antimicrobial agent and a leukocyte chemoattractant. Chemerin-derived synthetic peptide 4 (p4), that corresponds to internal Val⁶⁶-Pro⁸⁵ chemerin sequence demonstrates a broad-spectrum antimicrobial activity. The main goal of this study was to examine the role of chemerin and its bioactive derivatives in limiting the growth of bacteria that inhabit the epithelial tissues, and to characterize the mechanisms underlying the sensitivity/resistance of bacteria to chemerin-derived peptides.

First, we set to determine a role of chemerin and a chemerin-derived antimicrobial peptide p4 in oral cavity. Peptide p4 was found to act as an antimicrobial agent against a defined spectrum of bacteria, strategically positioned in dental biofilm, like *F. nucleatum*. These bacteria enable the typical periodontal pathogens to colonize the oral cavity. Through inhibition of the growth of *F. nucleatum*, chemerin and p4 may help to maintain a healthy balance in the oral microbiota. Moreover, chemerin from gingival crevicular fluids of patients with gingivitis was capable of inducing receptor-dependent leukocyte migration, suggesting its indirect influence on shaping the oral microbiota through a recruitment of immune cells.

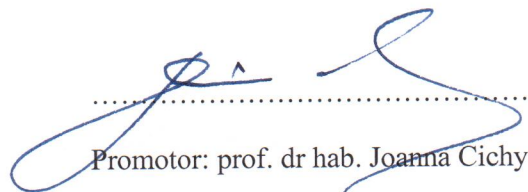
In this study we also demonstrated that chemerin can modulate the composition, diversity and abundance of skin microbiome due to its differential antimicrobial activity against selected cutaneous bacteria. Although chemerin and p4 shared a similar pattern of antimicrobial activity against skin microbes, p4 displayed higher bactericidal potential, comparing to chemerin. Furthermore, in cytotoxicity experiments performed on keratinocytes and erythrocytes, we showed that p4 is relatively safe to host cells. These data suggest that p4 may be a therapeutic antimicrobial agent in barrier sites.

To better understand strain-specific susceptibility to p4, we next focused on defining the mechanism by which the peptide controls microbial growth. Electron microscopy approaches revealed that p4 inhibits bacterial growth by targeting both the membrane and intracellular pathways. The main bactericidal mechanism of p4 action included the loss of membrane integrity and function. We demonstrated crucial role of positively charged amino acids and cysteine in the peptide amino acid sequence, in determining the antimicrobial activity of p4. We described unique crosstalk between cytochrome bc1 and p4, that promotes cysteine-dependent dimerization and enhances effectiveness of p4. These data suggested that the antimicrobial potential of p4 can be modulated under specific

condition. For example, oxidized environment can boost the p4 activity, whereas stationary phase phenotype can facilitate the development of bacterial resistance to p4.

It is known that, in addition to the classical antibiotic resistance strategies, such as production of inactivating enzymes or efflux pumps, bacteria can generate tolerance or resistance to stress conditions through reprogramming cellular metabolism from fast to slow growth. As a consequence, slow growing cells are resistant to harsh conditions, including the p4-treated bacteria. RpoS is a key, stationary phase transcription factor, that regulates the general stress response in *E. coli*. In this work we proposed the mechanism of resistance to p4, based on RpoS-dependent transition from fast to slow growing phase. When *E. coli* cells were deprived of functional RpoS by using genetic modifications, the resistance to p4 was decreased only in bacteria from the stationary but not of logarithmic phase of growth. Furthermore, the presence of RpoS limited binding of p4 to the bacterial surface. These results indicate the existence of the RpoS-dependent mechanism of bacterial resistance to the chemerin-derived peptide, that includes blocking the interaction between p4 and the bacterial cell.

In conclusion, the studies presented in this dissertation provide a better understanding of the role of chemerin and its derivatives in controlling the microbial composition in oral cavity and skin. We characterized the mode of bactericidal activity of p4, and described the potential mechanism of bacterial resistance to p4. Given that p4 can suppress the growth of antibiotic resistant strains, including methicillin-resistant *S. aureus*, this peptide seems to be a promising, therapeutic agent to combat resistant bacteria.



Promotor: prof. dr hab. Joanna Cichy