



*Molecular Characterization of Candida in the Oral Cavity and Factors Involved
in Biofilm Formation and Virulence*

E.A. Kraneveld

Samenvatting

Dit proefschrift beschrijft onderzoek gerelateerd aan orale schimmelinfecties die veroorzaakt worden door *Candida*. Interacties tussen *Candida* en de residente 'huis' bacteriën in speeksel van Nederlandse ouderen zijn in kaart gebracht. Nieuwe adhesins zijn ontdekt; eiwitten die betrokken zijn bij aanhechting aan humane weefsels en/of medische hulpmiddelen en een rol kunnen spelen in de vorming van een *Candida* biofilm. Deze eiwitten lijken belangrijke factoren te zijn in het infectieproces en kunnen daardoor mogelijk als nieuwe aanknopingspunten fungeren in de zoektocht naar nieuwe anti-schimmel medicijnen.

De microflora die in de mondholte wordt aangetroffen bestaat uit een grote verscheidenheid aan residente micro-organismen, ook wel het orale microbioom genoemd. Deze micro-organismen zijn veelal niet ziekteverwekkend en leven in harmonie met het menselijk lichaam. De meeste micro-organismen die zich in de mondholte bevinden hechten zich aan een oppervlak. Ze vormen een biofilm om 'weg' spoelen door middel van het doorslikken van speeksel te voorkomen. Over het algemeen bestaat er een dynamisch evenwicht tussen micro-organismen en hun leefomgeving (ecosysteem), zo ook in de mondholte van de mens. Dat evenwicht kan verstoord raken door veranderingen in de mondholte, veroorzaakt door bijvoorbeeld het verouderingsproces, ziekte, gebruik van medicijnen zoals antibiotica en/of corticosteroiden, radio-, chemo- en/of immunosuppressie therapieën, ondervoeding, het hebben van een droge mond (of verminderd speeksel) of de aanwezigheid van een (volledige of gedeeltelijke) prothese (Bodineau et al., 2009; Pfaller and Diekema, 2010). Verstoring van het evenwicht tussen de residente micro-organismen en de humane gastheer kan een mogelijkheid creëren voor bijvoorbeeld schimmels, met name *Candida* soorten, om weefsels te koloniseren en dus infecties te veroorzaken (De Resende et al., 2006; Kleinegger et al., 1996; Percival et al., 1991). Gezien de snel groeiende vergrijzing van de Westerse samenleving is er een toenemende vraag naar wetenschappelijke kennis en nieuwe methodes om schimmelinfecties te voorkomen, vroegtijdig te diagnosticeren, en (preventief) te behandelen.

In hoofdstuk 2 staat dat we speeksel van 82 Nederlandse ouderen, tussen 58 en 80 jaar, hebben geanalyseerd met een next-generation sequencing methode. Daarnaast is de hoeveelheid *Candida* en het totaal aantal bacteriën bepaald met een kwantitatieve polymerase ketting reactie (pcr) methode. In bijna alle ouderen werd een hoeveelheid aan *Candida* (*C.*) gedetecteerd. Met een specifieke pcr voor *C. albicans* en *C. glabrata* bleek *C. albicans* het meest voor te komen (70%). Maar in bijna de helft (46%) van deze populatie kwam *C. glabrata* voor en, in 40% kwamen beide *C. albicans* en *C. glabrata* voor (data nog niet gepubliceerd). De aanwezigheid van *C. glabrata* in de residente flora van een populatie ouderen is mogelijk verontrustend. Kleine veranderingen in het leven, zoals het verouderingsproces, kunnen blijkbaar mogelijkheden creëren waardoor *Candida* virulent wordt. Bovendien laten resultaten uit hoofdstuk 2 zien dat wanneer er een hoge concentratie *Candida* aanwezig is, de samenstelling van micro-organismen in het microbiom veranderd; het microbiom is dan minder divers en er zijn meer zuurvormende streptokokken bacteriën.

Vervolgens hebben we een *in vitro* biofilm model gebruikt om interacties tussen *C. albicans*, *C. glabrata* en *Streptococcus mutans* te bestuderen (hoofdstuk 3). Beide soorten *Candida* of *Candida-S.mutans* biofilms zijn gegroeid op verschillende materialen, al dan niet vooraf bestreken met speeksel, in een medium met glucose of sacharose. Biofilms werden gevormd op hydroxyapatiet (HA) (materiaal dat tanden simuleert), polymethylmetacrylate (PMMA) (prothese materiaal) en een zachte protheseliner (SL) waarin een anti-schimmel is verwerkt (dit materiaal wordt gebruikt om een prothese passend te maken). Met behulp van confocale laser scanning microscopie zijn biofilm structuren bekeken en de hoeveelheid schimmeldraden bepaald. De hoeveelheid levende *C. albicans* en *C. glabrata* werd bepaald en nam af in de volgorde HA>PMMA>SL. De aanwezigheid van *Candida* bevattende biofilms op SL, dat een anti-schimmel bevat, geeft aan dat dit antischimmel niet een 100% groei-remming geeft. Voor de meeste parameters die zijn getest in deze studie zijn hogere levende *C. glabrata* biofilm cellen bij *C. glabrata* biofilms gevonden dan bij *C. albicans* biofilms of bij de mix van de twee *Candida* soorten. Dit is waarschijnlijk te verklaren door de kleinere celgrootte en snellere groeisnelheid van *C. glabrata*.

In de aanwezigheid van glucose en *S. mutans* werden minder schimmeldraden van *C. albicans* gevonden dan wanneer er sacharose in het

medium aanwezig was. Dit is ook door anderen aangetoond en is wellicht het gevolg van quorum sensing moleculen, zoals competence-stimulating peptide, geproduceerd door *S. mutans* (Jarosz et al., 2009).

Steeds meer onderzoeken laten zien dat *C. glabrata* zich manifesteert als een opportunistisch pathogeen micro-organisme. *C. glabrata* kan hardnekkige biofilms vormen die resistent zijn tegen de meest gebruikte anti-schimmel middelen hetgeen de behandelingen tegen *C. glabrata* infecties bemoeilijkt (Rodrigues et al., 2013; Silva et al., 2012). Het is nog steeds uitdaging te lokaliseren waar *C. glabrata* precies in de mens voorkomt. Omdat deze gist zich snel kan aanpassen aan veranderingen in het ecosysteem zoals een immuunrespons, biofilm vorming of antischimmel medicijnen, wordt deze adaptatie gezien als één van de belangrijkste virulentiefactoren van *C. glabrata*.

De celwand van *Candida* is een belangrijk deel van de cel dat betrokken is bij hechting aan een oppervlak, biofilm vorming en infectie. In tegelstelling tot *C. glabrata* kan *C. albicans* zijn vorm veranderen van een gist cel in een invasieve schimmeldraad. Fylogenetisch en qua vorm lijkt *C. glabrata* veel meer op de niet ziekmakende biergist (*Saccharomyces cerevisiae*) dan op *C. albicans*. Maar hoe maakt *C. glabrata* dan ziek? Om deze virulentie beter te leren begrijpen hebben we de celwand bestudeerd. In hoofdstuk 4 laten we zien dat de celwand van *C. glabrata* eigenlijk dezelfde basis componenten bezit als *S. cerevisiae* en *C. albicans*. Massaspectrometrie analyses van *C. glabrata* celwanden resulteerde in de identificatie van 18 glycosylphosphatidylinositol (GPI)-gemodificeerde celwandeiwitten; het koolhydraat splitsende enzym Scw4, en vier Pir eiwitten. Onder de GPI celwandeiwitten, ontdekten we Epa6, een adhesine dat betrokken is bij de aanhechting van humane epitheel cellen en biofilm vorming, en vier nieuwe adhesine-achtige eiwitten, die we Awp1, Awp2, Awp3 en Awp4 (adhesin-like wall proteins) hebben genoemd. Eerder bioinformatica onderzoek heeft laten zien dat het genoom van *C. glabrata*, mogelijk 106 GPI eiwitten bevat waarvan de helft kenmerken van adhesine-achtige eiwitten zou hebben (Weig et al., 2004). Wij hebben systematisch door het genoom van *C. glabrata* gezocht en vonden 66 potentiële adhesines, die verdeeld konden worden in 7 verschillende groepen. De grootste is de epithelial adhesion protein (Epa) familie met 17 leden in *C. glabrata* stam ATCC2001 en 23 leden in stam BG2. Hieruit blijkt dat er genetische variatie bestaat in adhesine genen tussen stammen.

Omdat aanhechting een essentiële stap is in de vorming van een biofilm, hebben we vervolgens getest of het aantal adhesines ook verhoogd is in celwanden van *C. glabrata* na vorming van een biofilm (hoofdstuk 5). Hiervoor hebben we een kwantitatieve real-time polymerase ketting reactie (qPCR) ontwikkeld om de genexpressie van nieuwe en bestaande adhesines te vergelijken tussen biofilm en planktonische (niet aangehechte) condities. De resultaten laten zien dat de expressie van de meeste adhesine genen significant verhoogd was in biofilms. Analyse van massaspectrometrie data leverde identificatie van Epa3 en de nieuwe adhesine-achtige eiwitten Awp5 en Awp6 op. De laatste werden alleen gevonden in geïsoleerde celwanden van biofilm cellen. Het expressiepatroon van adhesine genen en welke eiwitten worden ingebouwd in de celwand blijkt afhankelijk te zijn van de stam en van de groei omstandigheden. Dit steunt de hypothese dat een groot repertoire aan adhesines in *C. glabrata*, kan zorgen voor flexibiliteit, het snelle aanpassingsvermogen, en het vermogen aan de gastheer te hechten onder verschillende gastheer-specifieke omstandigheden (de Groot et al., 2013; Kraneveld et al., 2011).

In het laatste hoofdstuk (hoofdstuk 6) hebben we gekeken naar de fenotypische veranderingen die zijn ontstaan in afstammelingen van de *C. glabrata* referentie stam CBS138/ATCC2001 verzameld uit onafhankelijke laboratoria in de wereld. Resultaten van verschillende celwand gerelateerde experimenten zoals gevoeligheid voor het celwand lysis enzym zymolase en andere membraan-verstorende middelen correleerden met een specifiek chromosomen profiel. De capaciteit van stammen om aan plastic te hechten bleek te correleren met adhesine genexpressie en niet te worden veroorzaakt door deleties van de geteste adhesine genen. Deze resultaten benadrukken de genomische plasticiteit van *C. glabrata* en impliceren dat chromosomale afwijkingen en functionele aanpassingen niet alleen kunnen ontstaan tijdens of gedurende een infectie of een anti-schimmel therapie maar ook onder laboratorium omstandigheden. Toekomstig onderzoek zal rekening moeten houden met de plasticiteit in *C. glabrata* stammen; bij het analyseren, het vergelijken van fenotypische data, en het delen van stammen tussen laboratoria.

Samengevat wordt in dit proefschrift nieuwe wetenschappelijke kennis beschreven die nodig is om *Candida* infecties beter te kunnen begrijpen. Inzichten in *Candida* interacties met het orale microbiom zijn in kaart gebracht.

Veel *Candida* cellen in speeksel gaat gepaard met een verzuring van de mondholte, en dit is waarschijnlijk de ecologische factor die het residente microbioom doet verschuiven naar een microbioom dat een verhoogd aantal zuurvormende bacteriën bevat, met als consequentie een lagere diversiteit. De vraag blijft of de hoge *Candida* hoeveelheid een resultaat is van de verzuring in de mondholte, bijvoorbeeld door hoge koolhydraat inname, of dat het afkomstig is van factoren als een droge mond, antibiotica- of immunosuppressie therapieën in een ouder wordende of immunogecompromitteerde populatie. Het volgen van interacties in gezonde en zieke populaties, en in een populatie die ouder wordt gedurende longitudinale klinische studies, zal beter inzicht kunnen geven in het verloop van natuurlijke interacties tussen micro-organismen in het orale microbioom en daardoor nieuwe mogelijkheden voor interventies kunnen opleveren.

Verder draagt het vernieuwende onderzoek beschreven in dit proefschrift bij aan een stap voorwaarts in de kennis omtrent celwand adhesines in de opportunistische pathogeen *C. glabrata*. Het belicht de belangrijke bijdrage van deze eiwitten in het vormen, het aanhouden en de plasticiteit van *Candida* biofilms en infecties. Toekomstige studies kunnen zich richten op functionele karakterisatie van de nieuwe mogelijke adhesines. Bijvoorbeeld, het tot expressie brengen van adhesine-achtige eiwitten (of specifieke delen ervan) in de celwand van een niet-hechtende *S. cerevisiae* en kijken of hij dan wel gaat hechten (de Groot et al., 2013; Nobbs et al., 2010; Zupancic et al., 2008). Zo hebben onderzoekers al kunnen laten zien dat het aanhechten van *C. glabrata* aan epitheel en endotheel cellen wordt veroorzaakt door tenminste een aantal eiwitten die coderen voor EPA genen (Cormack et al., 1999; Domergue et al., 2005; Frieman et al., 2002; Zupancic et al., 2008). Het ontrafelen van structuur, functie en ligand-bindings specificiteit van andere relevante adhesine-achtige eiwitten in *C. glabrata* zal informatie opleveren over gastheer-substraat, de locatie waar de gist gedijt, waar het biofilms vormt en de rol van adhesines in virulentie van de gist. Deze gedetailleerdere informatie over adhesine-achtige eiwitten in *C. glabrata* kan van belang zijn bij het ontwikkelen van nieuwe anti-hechting en/of anti-schimmel medicijnen om infectie met *C. glabrata* te bestrijden.