

Received: 11.09.2019  
Accepted: 28.02.2020  
Published: 08.07.2020

## Mechanizmy wirulencji wykorzystywane w patogenezie chorób przyzębia przez bakterie *Porphyromonas gingivalis*\*

Virulence mechanisms used in the pathogenesis of  
periodontal diseases caused by *Porphyromonas gingivalis*

Michał Śmiga, Paulina Ślęzak, Klaudia Siemińska, Teresa Olczak

Pracownia Biologii Medycznej, Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski

### Streszczenie

Choroby przyzębia to postępujące stany zapalne, które niszczą tkanki podporowe zębów. W zaawansowanym stadium choroby mogą spowodować krwawienie dziąseł oraz utratę zębów. Za jeden z czynników etiologicznych odpowiedzialnych za inicjację i progresję chorób przyzębia uważa się bakterie *Porphyromonas gingivalis*. Są to Gram-ujemne, beztlenowe bakterie wchodzące w skład wielogatunkowego biofilmu jamy ustnej. Bakterie *P. gingivalis* nie mają pełnego szlaku syntezy protoporfiryny IX, a także nie wytwarzają sideroforów, dlatego do przeżycia i proliferacji wymagają hemu jako źródła żelaza i protoporfiryny IX. W celu pozyskania hemu, wykorzystują wiele mechanizmów wpływających na ich zdolność do zapoczątkowania stanu patologicznego. W artykule przedstawiono wiadomości na temat najlepiej poznanych i scharakteryzowanych systemów biorących udział w pozyskiwaniu hemu przez bakterie *P. gingivalis*. Skoncentrowano się na procesach zachodzących w początkowych stanach choroby, w których główną rolę odgrywają: gingipainy, hemaglutyniny oraz hemolizyny. Szczegółowo opisano mechanizmy kodowane przez operony *hmu*, *ihf* oraz *hus*, kodujące białka o właściwościach hemoferowych, a także zależne od TonB receptory błony zewnętrznej. Przedstawiono ich funkcje i udział w rozwoju choroby; uwzględniono rolę mechanizmów wykorzystywanych przez bakterie *P. gingivalis* oraz inne periodontopatogeny w synergistycznych procesach promujących rozwój, wzrost i wirulencję *P. gingivalis*. Omówiono także regulację homeostazy żelaza i hemu z uwzględnieniem homologa białka Fur, dwuskładnikowego systemu regulatorowego HaeSR oraz białka OxyR, SigH i PgDps.

### Słowa kluczowe:

gingipainy • hem • HmuY • mikrobiom • PgFur • *Porphyromonas gingivalis* • wirulencja • zapalenie przyzębia

### Summary

Periodontal diseases are characterized by progressive inflammation that destroys the tooth-supporting tissues, leading to gum bleeding and tooth loss. *Porphyromonas gingivalis* is considered one of the main etiological agents responsible for the initiation and progression of chronic periodontitis. This gram-negative, anaerobic bacterium is a part of a multi-species oral biofilm. *P. gingivalis* does not have the full pathway of protoporphyrin IX synthesis, nor does it produce siderophores. Therefore, for survival and proliferation, it requires heme as

\*Praca została przygotowana w ramach projektów OPUS o numerach 2014/15/B/NZ6/01723, 2015/17/B/NZ6/01969 oraz 2016/23/B/NZ6/00080 finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki.

a source of iron and protoporphyrin IX. In order to obtain heme, *P. gingivalis* uses a number of mechanisms that affect the ability of this bacterium to initiate a pathological condition. This review presents the current knowledge regarding the best-known and characterized systems involved in heme acquisition by *P. gingivalis*. We focused on processes occurring in the initial states of infection, where gingipain, hemagglutinins, and hemolysins play a crucial role. The mechanisms encoded by *hmu*, *iht* and *hus* operons, including proteins with hemophore-like properties, as well as TonB-dependent outer membrane receptors are described. We present their function and participation in the progression of the infection. In addition, we describe mechanisms produced by *P. gingivalis* and other periodontopathogens in synergistic processes promoting the growth and virulence of *P. gingivalis*. We also describe processes regulating iron and heme homeostasis, including the homolog of the Fur protein, the two-component system HaeSR, as well as the OxyR, SigH, and PgDps proteins.

**Keywords:** gingipains • heme • HmuY • microbiome • periodontitis • PgFur • *Porphyromonas gingivalis* • virulence

**GICID** 01.3001.0014.3053  
**DOI:** 10.5604/01.3001.0014.3053  
**Word count:** 6820  
**Tables:** 1  
**Figures:** 3  
**References:** 103

**Adres autora:** dr Michał Śmiga, Pracownia Biologii Medycznej, Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski, ul. F. Joliot-Curie 14a, 50-383 Wrocław; e-mail: michal.smiga@uwr.edu.pl

## WPROWADZENIE

Organizm człowieka jest zasiedlany przez tysiące gatunków bakterii. Najnowsze badania wskazują, iż stosunek komórek bakteryjnych do komórek człowieka wynosi prawie 1,3:1 [76]. Bakterie te kolonizują różne części ciała i żyją zazwyczaj w symbiozie z człowiekiem. Jednym z bardziej złożonych mikrobiomów człowieka jest ten występujący w jamie ustnej. Szacuje się, iż jama ustna jest zasiedlana przez prawie tysiąc gatunków bakterii [87], a po raz pierwszy sklasyfikowali je Socransky i wsp. w 1998 r. Ze względu na wspólną częstotliwość występowania gatunków bakterii wyodrębniono pięć głównych kompleksów [85]. Kompleksy żółty, fioletowy oraz zielony składają się głównie z tlenowych bakterii Gram-dodatnich. Zła higiena jamy ustnej, uwarunkowania genetyczne, czy też zmiany hormonalne są jednymi z wielu czynników przyczyniających się do zachwiania równowagi w jamie ustnej i powstania warunków o obniżonej zawartości tlenu w obrębie kieszonek dziąsłowych. Wraz z akumulacją płytki nazębnej przyczynia się to do rozwoju beztlenowych bakterii Gram-ujemnych. Bakterie te zazwyczaj są zaliczane do kompleksów pomarańczowego i czerwonego, gdzie ten drugi jest głównie związany ze stanami patologicznymi jamy ustnej i rozwojem chorób przyzębia o charakterze chronicznym [14, 41, 87].

Choroby przyzębia charakteryzują się stanem zapalnym dziąseł, który powoduje degradację tkanek podporowych zębów i nadmierną resorpcję kości wyrostka okołozębowego. Powoduje to obniżenie linii dziąseł, pogłębienie

kieszonek dziąsłowych, a w późnym stadium choroby krwawienia z dziąseł, a nawet wypadanie zębów [41, 52]. Szacuje się, iż częstotliwość ich występowania wynosi 20-50% w zależności od regionu świata oraz grupy wiekowej, a 10-15% populacji jest dotknięte najcięższym rodzajem tych chorób [24, 28, 57, 67].

Choroby przyzębia od lat są łączone z innymi chorobami układowymi, takimi jak: cukrzyca, reumatoidalne zapalenie stawów, osteoporoza oraz chorobami układu krążenia i układu oddechowego [3, 6, 14, 22, 42, 47, 54, 77, 96]. W ostatnim czasie pojawiły się również doniesienia o powiązaniu chorób przyzębia z chorobą Alzheimera [23].

## BAKTERIE PORPHYROMONAS GINGIVALIS JAKO GŁÓWNY PATOGEN W ROZWOJU CHRONICZNEGO ZAPALENIA PRZYŻĘBIA

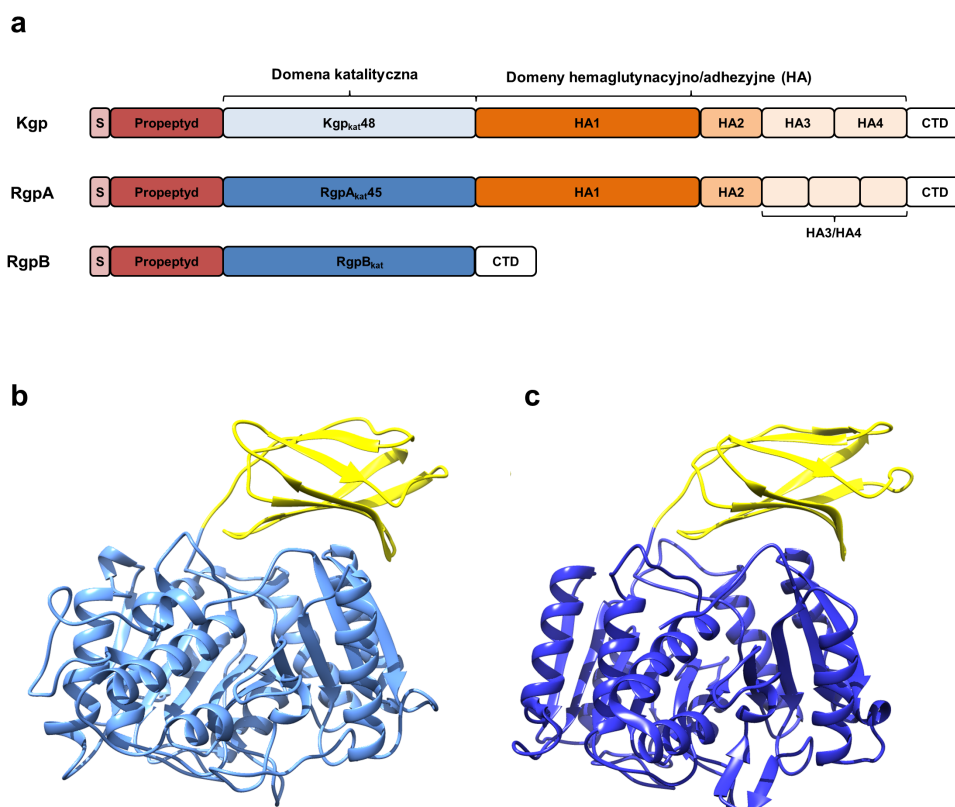
Za jeden z czynników etiologicznych chorób przyzębia o charakterze chronicznym uważa się bakterie *Porphyromonas gingivalis* [7, 18, 36, 65]. Wraz z bakteriami *Tannerella forsythia* oraz *Treponema denticola* są klasyfikowane do kompleksu czerwonego [85]. *P. gingivalis* to Gram-ujemne, beztlenowe, asacharolityczne bakterie zasiedlające kieszonkę dziąsłową, należące do auktotrofów, niemogące syntetyzować pierścienia protoporfiryny IX (PPIX). Bakterie *P. gingivalis* nie wytwarzają również sideroforów, dlatego też jako źródło PPIX i żelaza pobierają hem ze środowiska zewnętrznego [20, 61]. Mogą wnikać do komórek nabłonkowych oraz komórek układu immunologicznego gospodarza, a także replikować się w ich wnętrzu i rozprzestrzeniać się między nimi [15, 46, 62, 91, 96].

W tym celu bakterie *P. gingivalis* wykształciły liczne systemy umożliwiające im zasiedlenie jamy ustnej i pobieranie substancji odżywczych, w tym także hemu.

Bakterie *P. gingivalis* wytwarzają wiele czynników wirulencji; są to głównie składowe błony zewnętrznej pełniące funkcje strukturalne. Należą do nich fimbrie, zaangażowane w oddziaływanie z innymi bakteriami oraz komórkami gospodarza. Bakterie te produkują dwa główne rodzaje fimbrii, tzw. fimbrie długie oraz krótkie, których głównymi składnikami są odpowiednio białka FimA i Mfa1 [26]. Fimbrie wraz z innymi komponentami bakterii *P. gingivalis*, takimi jak lipopolisacharyd (LPS), stymulują układ odpornościowy gospodarza, przyczyniając się do wydzielania cytokin i wywołania stanu zapalnego w obrębie tkanek przyzębia. Niektóre szczepy bakterii *P. gingivalis* wytwarzają otoczkę cukrową, która pozwala im na maskowanie się przed układem immunologicznym gospodarza, a to korzystnie wpływa na ich rozwój i przeżycie [80].

Inną grupą czynników wirulencji bakterii *P. gingivalis* są białka o właściwościach hemaglutynin. Białka te mogą oddziaływać z komórkami gospodarza, w tym z erytro-

cytami. Wraz z hemolizynami biorą udział w lizie erytrocytów i uwalnianiu hemoglobiny, która jest głównym źródłem hemu dla bakterii *P. gingivalis* w późnym stadium choroby [61]. W procesach pozyskiwania hemu przez *P. gingivalis* ważną rolę odgrywają proteazy. Biorą udział w degradacji tkanek i białek gospodarza, nasilając stan zapalny. Główną aktywność proteolityczną wytwarzaną przez *P. gingivalis* przypisuje się gingipainom (tabela 1; ryc. 1). Są to cysteinowe proteazy arginino- (RgpA i RgpB) oraz lizyno-specyficzne (Kgp) [70, 71]. Gingipainy biorą udział w degradacji białek układu immunologicznego gospodarza, w tym przeciwciał oraz białek układu dopełniacza, uniemożliwiając jego aktywację [36, 65]. Degradują m.in. cytokiny IL-4, -6, -8, -12, a także interferon- $\gamma$  oraz TNF- $\alpha$ , co wpływa na zmniejszenie odpowiedzi układu odpornościowego gospodarza wobec bakterii i promowania autoimmunologicznej odpowiedzi wobec własnych komórek. Przyczynia się to do ich degradacji i uwolnienia substancji odżywczych dla bakterii [13, 35, 56, 65, 69, 102]. Gingipainy Kgp oraz RgpA poza częścią katalityczną zawierają również domeny hemaglutyninowe, które są zdolne do wiązania erytrocytów oraz hemoglobiny (ryc. 1a) [51].



**Ryc. 1. a** – Schemat budowy gingipain; białka te są zbudowane z domeny katalitycznej zawierającej domenę immunoglobulinopodobną oraz domeny adhezyjnej (poza RgpB). N-końcowy fragment zawiera peptyd sygnałowy (S) oraz fragment propeptydu, który w wyniku dojrzewania białka zostaje odcięty. C-końcowy fragment (CTD) zawiera motyw rozpoznawany przez system sekrecji T9SS, który bierze udział w wydzielaniu gingipain [48]. Fragmenty wykazujące duże podobieństwo sekwencji aminokwasowej zaznaczono tym samym kolorem; **b** – struktura domeny katalitycznej gingipainy lizyno-specyficznej Kgp (PDB: 4RBM) oraz **c** – gingipainy arginino-specyficznej RgpB (PDB: 1CVR). Kolorem niebieskim zaznaczono domenę katalityczną, a na żółto domenę immunoglobulinopodobną. Modele 3D białek wykonano z użyciem oprogramowania Chimera UCFS [68]

Wspomniane procesy prowadzą do dysbiozy i rozwoju bakterii *P. gingivalis*. Powoduje to ich rozprzestrzenienie się w organizmie i inicjuje proces zapalny również w innych tkankach.

### UDZIAŁ GINGIPAIN W PRZYSWAJANIU HEMU PRZEZ BAKTERIE *P. GINGIVALIS*

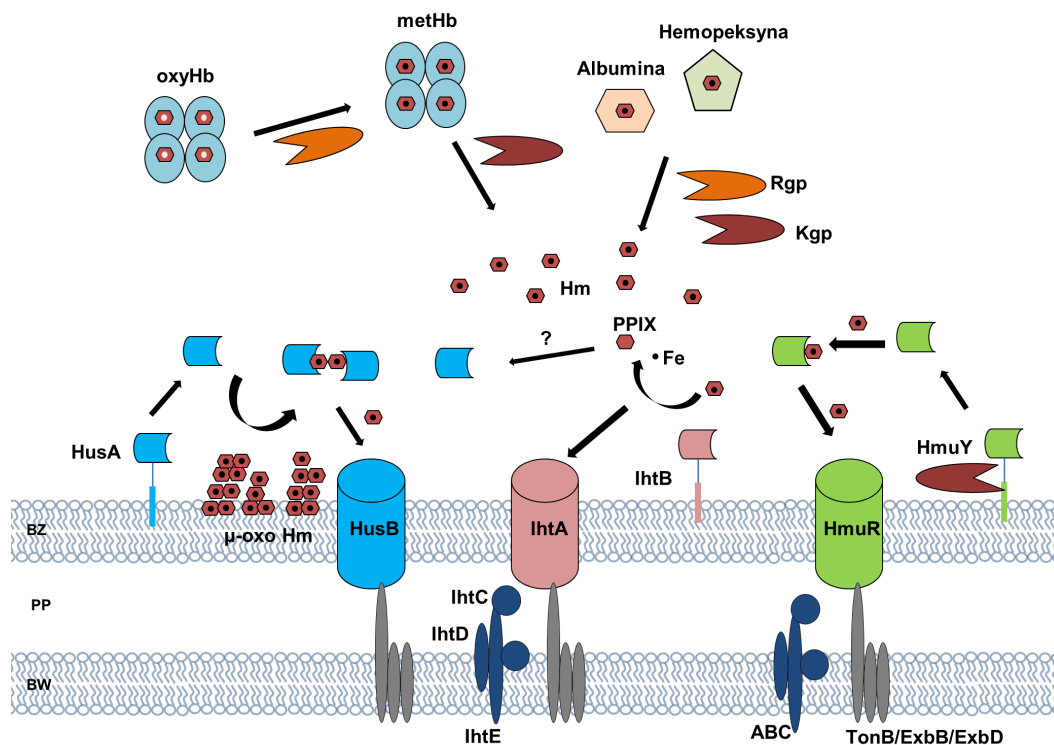
Wiele czynników wirulencji wytwarzanych przez bakterie *P. gingivalis* jest zaangażowanych w przyswajanie związków odżywczych, w tym hemu. Związek ten jest czynnikiem limitującym wzrost bakterii i ich rozwój [53]. W początkowej fazie choroby jako źródło hemu bakterie *P. gingivalis* wykorzystują hemoproteiny występujące w ślinie i płynie dziąsłowym, wywodzącym się z surowicy. W późnej fazie choroby dochodzi do degradacji tkanek podporowych zębów, a to przyczynia się do krwawienia i dostępu do głównego źródła hemu dla patogenów, jakim jest hemoglobina [17, 37]. Organizm człowieka może się bronić przed zbyt wysokimi stężeniami wolnego hemu we krwi, którego nadmiar jest toksyczny. W czasie krwawienia oraz lizy erytrocytów nadmiar hemu jest wiązany przez albuminę. Stała dysocjacji kompleksu albuminy z hemem jest stosunkowo wysoka ( $K_d \approx 10^{-7}-10^{-8}$  M) [1], jednak stężenie albuminy w surowicy zdrowego człowieka szacuje się na 0,52–0,74 mM, co pozwala na szybkie związanie wolnego hemu [95]. Innym przykładem białka, które jest źródłem hemu dla patogenów jamy ustnej, jest hemopeksyna. Jest to białko wytwarzane w stanach zapalnych, które jest jednym z najsilniej wiążących hem białek w organizmie człowieka ( $K_d < 1$  pM) [92].

Główną rolę w uwalnianiu hemu z białek gospodarza pełnią gingipainy, zaangażowane w degradację hemoprotein gospodarza, przyczyniając się w znacznym stopniu do pozyskiwania hemu przez *P. gingivalis* z kompleksów albumina-hem oraz hemopeksyna-hem (ryc. 2). Proces pozyskiwania hemu z hemoglobiny przez *P. gingivalis* jest bardziej skomplikowany. Około 95% hemoglobiny występuje w postaci utlenowanej (oxyHb) ze związanym hemem (Fe(II)PPIX), a kompleks ten charakteryzuje się niską stałą dysocjacji ( $K_d \approx 10^{-12}-10^{-15}$  M). OxyHb jest również odporna na działanie proteaz. Gingipainy arginino-specyficzne wykazują aktywność utleniającą w stosunku do oxyHb. W wyniku ich aktywności powstaje hemoglobina utleniona (metHb) w kompleksie z Fe(III)PPIX, czyli heminą (w dalszej części pracy nazywana hemem) [81]. Kompleks ten ma mniejszą siłę wiązania hemu, a rozluźnienie struktury zwiększa podatność na proteolizę. Hemoglobina jest bogata w reszty lizyny, sprzyjając procesowi jej trawienia przez Kgp [86].

Nadmiar hemu może zostać zakumulowany na powierzchni bakterii *P. gingivalis* w postaci  $\mu$ -oxo bishemu, który nadaje im ciemny pigment [83]. Proces ten jest bezpośrednio skorelowany z aktywnością gingipain. Szczepy bakterii *P. gingivalis* pozbawione funkcjonalnych genów kodujących Kgp lub RgpA i RgpB charakteryzują się zmniejszoną pigmentacją lub jej brakiem [84].

### BIAŁKA WIĄŻĄCE HEM BAKTERII *P. GINGIVALIS*

Ze względu na mechanizmy chroniące organizm człowieka przed szkodliwym działaniem wolnego żelaza oraz hemu, patogenne mikroorganizmy musiały wyspecjalizować systemy pozwalające im dostarczyć do wnętrza komórki ten niezbędny do przeżycia związek. Najważniejsze mechanizmy bakterii *P. gingivalis* biorące udział w tym procesie przedstawiono w tabeli 1. Jednym z nich jest operon *hmu*, kodujący główny system odpowiedzialny za przyswajanie hemu przez *P. gingivalis*. Operon ten koduje sześć białek, z czego najlepiej poznane są białka HmuY oraz HmuR [50, 63]. Pozostałe cztery białka nie zostały scharakteryzowane, a ich potencjalną funkcję przedstawiono w tabeli 1. Białko HmuR jest receptorem błony zewnętrznej zależnym od TonB o strukturze  $\beta$ -baryłki. Uczestniczy w przekazywaniu hemu do przestrzeni peryplazmatycznej. HmuR wiąże hem ( $K_d \approx 10^{-5}-10^{-6}$  M) [60] z wykorzystaniem dwóch reszt histydyny w pozycji 95 oraz 434, a także z wykorzystaniem motywu NPDL [59]. Hem może być związany przez białko HmuR bezpośrednio ze środowiska zewnętrznego lub jest dostarczany przez białko HmuY (ryc. 2). HmuY jest lipoproteiną błony zewnętrznej, występującą w postaci związanej z błoną bakterii, pęcherzykami błony zewnętrznej (OMV) lub w postaci rozpuszczalnej po zwolnieniu z błony bakteryjnej przez ograniczoną proteolizę z udziałem Kgp [63, 64, 94, 97] (ryc. 2). Białko HmuY wykazuje właściwości hemoforowe, ale różni się od klasycznych bakteryjnych hemoforów [45]. Wykazuje wysokie powinowactwo do hemu ( $K_d < 10^{-9}$  M) [5], a hem koordynuje za pomocą dwóch reszt histydyny w pozycji 134 oraz 166 (ryc. 3a) [98]. Kompleks białka HmuY z hemem w postaci utlenionej i zredukowanej charakteryzuje się typowym maksimum w paśmie Soretta oraz pasmach Q, co świadczy o niskospinowym, sześciokoordynowanym żelazie w pierścieniu PPIX [5, 97, 98]. Badania naszego zespołu umożliwiły poznanie struktury białka HmuY zarówno w kompleksie z hemem, jak i bez związanego hemu [5, 97]. Struktura białka HmuY składa się głównie z pasm  $\beta$  i jest nietypowa w porównaniu z dotychczas poznanymi hemoforami. Apo-HmuY charakteryzuje się otwartą kieszenią wiążącą, która w kontakcie z hemem zamyka się (ryc. 3b) [5]. Ze względu na niską stałą dysocjacji jak i odporność białka HmuY na proteolizę [4, 5, 11, 97] uważa się, że białko to jest jednym z ważniejszych elementów zaangażowanych w przyswajanie hemu przez bakterie *P. gingivalis*. HmuY jest zdolne do wiązania nie tylko wolnego hemu, ale również hemu z kompleksu albumina-hem, hemopeksyna-hem. Białko HmuY może również odbierać hem z methemoglobiny, co dowodzi o współdziałaniu białka HmuY oraz gingipain w pozyskiwaniu hemu [5, 11, 82]. Białko HmuY jest silnie immunogenne. Bierze udział w przekazywaniu sygnału w makrofagach z wykorzystaniem szlaku zależnego od TLR7, a przeciwciała skierowane przeciwko temu białku wykryto u osób cierpiących na choroby przyzębia [12, 33, 93]. Zarówno nasze badania [3, 11, 33, 34, 82], jak i dane opublikowane przez innych [21, 88] jednoznacznie wskazują na istotną rolę białka HmuY w patogenezie chronicznych chorób przyzębia.

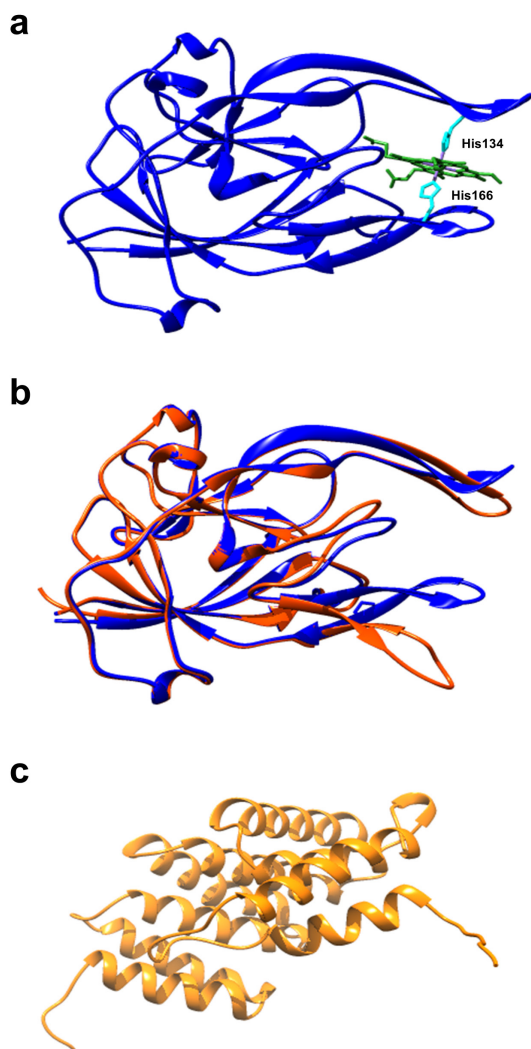


**Ryc. 2.** Schemat głównych systemów wykorzystywanych w przyswajaniu hemu i żelaza z hemoprotein gospodarza przez bakterie *P. gingivalis* oraz mechanizm ich działania. Główne źródło hemu (Hm) – hemoglobina w postaci utlenowanej (oxyHb) jest utleniana do methHb przez gingipainy arginino-specyficzne (RgpA i RgpB). Hem zostaje zwolniony przez degradację proteolityczną methHb oraz kompleksów albuminy i hemopeksyny z hemem. Białko HmuY zostaje zwolnione z kotwicy lipidowej przez ograniczoną proteolizę z wykorzystaniem Kgp. HmuY wiąże hem i dostarcza go na receptor HmuR, który następnie bierze udział w transporcie hemu do przestrzeni peryplazmatycznej. Pozostałe białka systemu Hmu najprawdopodobniej uczestniczą w przekazaniu hemu do cytoplazmy. Białko IhtB najprawdopodobniej ma odwrotną właściwość ferrocchelatazy i usuwa żelazo (Fe) z hemu, a następnie przekazuje je na receptor IhtA, który transportuje jony żelaza do peryplazmy. Białka IhtC, IhtD i IhtE uczestniczą w przekazaniu żelaza do cytoplazmy. Białko HusA wiąże hem w postaci dimerycznej ( $\mu$ -oxo Hm) z powierzchni bakterii, a następnie dostarcza go na receptor HusB, który transportuje hem do przestrzeni peryplazmatycznej. HusA może również wiązać protoporfirynę IX (PPIX), która powstaje w wyniku działania odwrotnej aktywności ferrocchelatazy. BZ – błona zewnętrzna, BW – błona wewnętrzna, PP – przestrzeń peryplazmatyczna

Poza operonem *hmu* bakterie *P. gingivalis* kodują inne systemy, które są zaangażowane w pozyskiwanie żelaza i hemu. Operon *hus* koduje cztery białka HusA, HusB, HusC i HusD (tabela 1). HusA, podobnie jak białko HmuY, jest białkiem o właściwościach hemoforowych. Jest zbudowane wyłącznie z  $\alpha$ -helis, które tworzą hydrofobową kieszeń wiążącą (ryc. 3c). Białko to może wiązać hem dimeryczny, akumulowany na powierzchni bakterii *P. gingivalis*, dlatego uważa się, że właśnie białko HusA jest zaangażowane w transport hemu z powierzchni bakterii do jej wnętrza (ryc. 2) [32]. Nie stwierdzono jednak, jakie reszty aminokwasowe w tym białku mogą być odpowiedzialne za wiązanie hemu, co może sugerować, że pierścień PPIX jest wiązany wyłącznie za pomocą oddziaływań hydrofobowych. Potwierdza to również, że białko HusA preferuje wiązanie PPIX aniżeli hemu, co jest nietypowe dla białek o właściwościach hemoforowych [30]. Białko HusA może występować w postaci związanej z błoną oraz w postaci rozpuszczalnej. Jego ekspresja wzrasta w czasie hodowli w warunkach ubogich w żelazo jak i wewnątrz komórek nabłonkowych. Wykazano również jego wpływ na wzrost bakterii i roz-

wój choroby [30]. Białko HusB jest receptorem błony zewnętrznej zależnym od TonB. Najprawdopodobniej bierze udział w transporcie hemu/PPIX przez błonę zewnętrzną [32]. Białko HusC wykazuje homologię do czynników regulatorowych z rodziny MarR/ErmF, co może wskazywać na jego rolę w regulacji ekspresji genów operonu *hus* [32]. Jednak dokładna rola białek HusB, HusC oraz HusD wymaga dalszych badań.

Innym systemem biorącym udział w przyswajaniu hemu przez *P. gingivalis* jest kompleks genów kodowany przez operon *iht*. Operon ten koduje pięć białek: IhtA, IhtB, IhtC, IhtD oraz IhtE (tabela 1). Pierwszym z nich jest białko IhtA, które jest receptorem błony zewnętrznej zależnym od TonB i najprawdopodobniej bierze udział w transporcie żelaza do przestrzeni peryplazmatycznej. Białko IhtB również jest umiejscowione na błonie zewnętrznej. Ze względu na homologię przypisuje mu się aktywność ferrocchelatazy. Białko to najprawdopodobniej usuwa jony żelaza z hemu i przekazuje je na receptor IhtA. Pozostałe białka kodowane przez operon *iht* wykazują homo-



**Ryc. 3.** Struktura białka HmuY ze związanym hemem (PDB: 3H8T); **a** – reszty aminokwasowe zaangażowane w koordynację hemu (His134 oraz His166); **b** – zmiana struktury białka HmuY pod wpływem wiązania hemu. Kolorem pomarańczowym zaznaczono postać bez związanego hemu (PDB: 6EWM), na niebiesko wiążącą hem; **c** – struktura białka HusA (PDB: 6BQS). Struktury białek zobrazowano za pomocą oprogramowania Chimera UCFS [68]

logię do białek systemu ABC, co mogłoby świadczyć o ich udziale w transporcie żelaza z przestrzeni peryplazmatycznej do cytoplazmy (ryc. 2) [19].

Białkiem błony zewnętrznej, które wykazuje aktywność wiązania hemu i jest niezbędne w warunkach ubogich w hem, jest białko HBP35 [79]. Jest zaliczane do czynników promujących koagregację, jednocześnie nie będąc białkiem związanym z fimbriami. Pośrednio wpływa ono także na ekspresję innych czynników koagregacji [39].

Wydaje się, iż opisane wyżej systemy współdziałają w przyswajaniu żelaza/hemu przez bakterie *P. gingivalis*, jednak z danych uzyskanych dotychczas wynika, iż systemy te mogą uczestniczyć w przyswajaniu różnych

postaci tych substancji. Wykazano, iż białko HmuY jest wytwarzane przez bakterie *P. gingivalis* wewnątrz komórek gospodarza [38, 62]. Także w czasie wzrostu bakterii w postaci biofilmu oraz w kontakcie z substancjami wydzielanymi przez komórki nabłonkowe można zauważyć wzrost jego wydzielania [44, 63, 73, 101]. W przypadku białka IhtB wykazano jego wydzielanie w kontakcie z komórkami nabłonkowymi [101], lecz jego ilość spada podczas wspólnej hodowli z innymi periodontopatogenami, a także wewnątrz komórek nabłonkowych [38, 44]. Wykazano również, że ekspresja genu *husA* wzrasta wewnątrz komórek nabłonkowych [30]. W warunkach laboratoryjnych środowisko jamy ustnej zdrowego człowieka jest imitowane przez hodowlę bakterii w pożywce pozbawionej hemu i żelaza. Jamę ustną chorego, u którego występuje krwawienie, imituje hodowla z dodatkiem żelaza i hemu. Wykazano, iż białka HmuY oraz HusA są wydzielane w większych ilościach w środowisku ubogim w żelazo i hem [5, 30, 89, 91]. Wskazuje to na istotny udział tych białek w pozyskiwaniu hemu w środowiskach ubogich w tę cząsteczkę, czyli w czasie inicjacji procesu patogenezy.

Wytwarzanie kilku systemów zaangażowanych w pobieranie hemu wydaje się dobrą strategią w walce o ten związek. Analizy proteomu oraz transkryptomu bakterii *P. gingivalis* wskazują, iż produkowane przez nią systemy przyswajania hemu mogą pełnić zamiennie główną rolę w zależności od zajmowanej przez nią niszy.

### SYNERGISTYCZNE MECHANIZMY PRZYSWAJANIA HEMU WYKORZYSTYWANE PRZEZ PERIODONTOPATOGENY

Bakterie *P. gingivalis* są składową wielogatunkowego biofilmu obejmującego tkanki nabłonkowe dziąseł oraz przestrzenie międzyzębowe. Jako kolonizator wtórny bakterie te wykazują zarówno zdolność do oddziaływania z innymi bakteriami zasiedlającymi tkanki jamy ustnej, jak i do oddziaływania z komórkami gospodarza. Dotąd wykazano zdolność *P. gingivalis* do bezpośredniego oddziaływania z wieloma gatunkami bakterii. Należą do nich członkowie m.in. kompleksu czerwonego (*T. denticola*, *T. forsythia*), pomarańczowego (*Prevotella intermedia*), zielonego (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*), a także żółtego (*Streptococcus gordonii*) [40, 43, 66, 74, 78, 103]. Odbyna się to głównie za pomocą fimbrii, ale wykazano także wpływ białek wiążących hem na te oddziaływania, m.in. HmuY, HmuR oraz HBP35 [39, 44, 64]. Szczep pozbawiony genu *hmuY* wykazywał zmniejszenie zdolności formowania biofilmu w trakcie hodowli tego szczepu w monokulturze [64]. Można zatem przypuszczać, iż białko to może brać udział w tworzeniu struktur biofilmu wewnątrz jamy ustnej oraz infekcji komórek gospodarza. Wiadomo też, że wzrost bakterii *P. gingivalis* w hodowli mieszanej z bakteriami *S. gordonii* i *Fusobacterium nucleatum* ułatwia formowanie biofilmu, a także wpływa na zwiększenie ekspresji *mfa1*, co promuje inwazję komórek dendrytycznych przez *P. gingivalis* [25].

**Tabela 1.** Główne mechanizmy zaangażowane w pozyskiwanie i regulację przyswajania hemu przez bakterie *Porphyromonas gingivalis*

	Nazwa białka/numer dostępu	Główna funkcja	Referencje
Gingipainy	RgpA/AAQ66991	Proteaza cysteinowa z rodziny C25, arginino-specyficzna, bierze udział w degradacji białek gospodarza, utlenianiu oxyHb do methHb	36, 49, 51, 58, 63, 65, 70, 71, 81, 97
	RgpB/AAQ65700	Proteaza cysteinowa z rodziny C25, arginino-specyficzna, bierze udział w degradacji białek gospodarza, utlenianiu oxyHb do methHb	
	Kgp/AAQ26523	Proteaza cysteinowa z rodziny C25, lizyno-specyficzna, bierze udział w degradacji białek gospodarza w tym methHb i jest zaangażowana w zwolnienie białka HmuY z kotwicy lipidowej	
Operon <i>hmu</i>	HmuY/AAQ66587	Białko o właściwościach hemoforowych, wiązanie hemu w formie Fe(II)PPIX oraz Fe(III)PPIX, zdolność odbierania hemu z kompleksów albumina-hem, hemopeksyna-hem oraz methHb	5, 50, 58, 59, 60, 63, 82, 97, 98
	HmuR/AAQ66588	Receptor błony zewnętrznej zależny od TonB, transport hemu do przestrzeni peryplazmatycznej	
	AAQ66589	Białko o domniemanej funkcji, homologia do chelatazy CobN/Mg	
	AAQ66590	Białko o domniemanej funkcji, homologia do białek MotA/TolQ/ExbB	
	AAQ66591	Białko o domniemanej funkcji permeazy	
	AAQ66592	Białko o nieznannej funkcji	
Operon <i>hus</i>	HusA/AAQ67167	Białko o właściwościach hemoforowych, wiązanie hemu w postaci $\mu$ -oxo bishemu oraz wiązanie PPIX	30, 32, 58
	HusB/AAQ67166	Receptor błony zewnętrznej zależny od TonB, transport hemu, żelaza lub PPIX do przestrzeni peryplazmatycznej	
	HusC/AAQ67165	Białko o nieznannej funkcji, homologia do czynników transkrypcyjnych z rodziny MarR/ErmR	
	HusD/AAQ67164	Białko błonowe o nieznannej funkcji	
Operon <i>iht</i>	IhtA/AAQ65844	Receptor błony zewnętrznej zależny od TonB, transport hemu lub żelaza do przestrzeni peryplazmatycznej	19, 58
	IhtB/AAQ65845	Białko wiążące hem, homologiczne do chelatazy kobaltu CBIK	
	IhtC/AAQ65846	Lipoproteina o nieznannej funkcji	
	IhtD/AAQ65847	Permeaza, składowa transportera ABC	
	IhtE/AAQ65848	Białko wiążące ATP, składowa transportera ABC	
Inne	HagA/AAQ66831	Białka biorące udział w hemaglutynacji erytrocytów	39, 58, 61, 79
	HagB/AAQ66947		
	HagC/AAQ66949		
	Hemolizyna/AAQ66861	Białko biorące udział w lizie erytrocytów	
	HBP35/AAQ65800	Błonowe białko wiążące hem, bierze udział w adhezji i formowaniu biofilmu	
Homeostaza żelaza/hemu	PgDps/AAQ65337	Białko wiążące hem i żelazo, funkcja magazynująca, bierze udział w homeostazie hemu i ochronie przed uszkodzeniem DNA	31, 58
	PgFur/QDE53638	Białko należące do rodziny Fur, udział w regulacji produkcji czynników wirulencji, regulacja ekspresji operonu <i>hmu</i>	2, 9, 15, 89, 91
	HaeSR/AAQ65889 i AAQ65890	Dwuskładnikowy system regulatorowy HaeSR, regulacja ekspresji czynników wirulencji, w tym gingipain, operonu <i>hmu</i> oraz <i>iht</i>	58, 75
	SigH/AAQ66824	Czynnik sigma, bierze udział w regulacji ekspresji operonu <i>hmu</i> oraz adaptacji do warunków oksydacyjnych	29, 58, 100
	OxyR/AAQ65490	Białko odpowiedzialne za adaptację do warunków oksydacyjnych	55, 58, 99

Poza oddziaływaniem bezpośrednim kluczową rolę w mikrobiomach odgrywa dostępność substancji odżywczych. Doprowadziło to do wytworzenia mechanizmów umożliwiających konkurencję bakterii o niezbędne do przeżycia substancje. Udokumentowano również symbiotyczne relacje między gatunkami bakterii zasiedlającymi jamę ustną. Bakterie *P. gingivalis* wytwarzają wiele białek umożliwiających im pozyskiwanie hemu i innych substancji odżywczych z białek gospodarza. Także inne bakterie, np. *P. intermedia*, wytwarzają interpainę A (InpA), cysteinową proteazę o funkcji zbliżonej do gingipain. InpA utlenia hemoglobinę i degradowuje ją, a także inne białka, takie jak albumina [10, 11]. Pokazano również, iż utleniająca aktywność InpA może zostać wykorzystana przez *P. gingivalis* w procesie odbierania hemu z metHb [11]. Inny mechanizm ułatwiający pobieranie hemu przez *P. gingivalis* również jest związany z utlenianiem oxyHb do metHb. Główną rolę w tym procesie odgrywają bakterie *S. gordonii*. Wykazano, iż pośredniczą one w utlenianiu hemoglobiny, co sprzyja pozyskiwaniu hemu przez bakterie *P. gingivalis* z udziałem białka HmuY [9]. Innym źródłem hemu dla bakterii *P. gingivalis*, zwłaszcza w początkowej fazie choroby, mogą być nietypowe białka wiążące hem wydzielane przez inne bakterie, bardzo często niepatogenne. Jednym z takich białek jest dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego bakterii *S. gordonii* (SgGAPDH). Wykazaliśmy, że SgGAPDH wiąże hem, który jest następnie odbierany przez białko HmuY bakterii *P. gingivalis* (dane nieopublikowane).

U innych przedstawicieli gromady *Bacteroidetes* zidentyfikowano homologi białka HmuY, w tym u bakterii *P. intermedia* (białko PinO oraz PinA) oraz *T. forsythia* (białko Tfo) [90]. Badania naszego zespołu doprowadziły do poznania struktury części z tych białek [4, 5]. Szczegółowe analizy wykazały, iż wiążą one hem w sposób odmienny od białka HmuY, a w tym celu wykorzystują reszty metioniny. Opisanie przez nas homologi białka HmuY wiążą hem preferując postać zredukowaną Fe(II)PPIX, podczas gdy białko HmuY z większym powinowactwem wiąże postać utlenioną Fe(III)PPIX. Wykazaliśmy ponadto, iż białka PinO, PinA oraz Tfo są degradowane przez gingipainy wydzielane przez *P. gingivalis* [4, 5 oraz dane nieopublikowane]. Może to sugerować, iż białka te konkurują o hem, jednak przewaga białka HmuY, związana głównie z jego odpornością na proteolizę zarówno w odniesieniu do gingipain, jak i proteaz wydzielanych przez inne periodontopatogeny oraz organizm człowieka, może mieć istotne znaczenie w roli patogenicznej bakterii *P. gingivalis* [3, 4, 5, 11, 97]. Wyniki te dowodzą, iż bakterie *P. gingivalis* jako kolonizator wtórny, mogą wykorzystywać zasoby hemu innych bakterii w początkowych fazach infekcji.

## HOMEOSTAZA ŻELAZA I HEMU BAKTERII *P. GINGIVALIS*

Ekspresja czynników wirulencji bakterii *P. gingivalis* jest zależna od obecności hemu w środowisku zewnętrznym [2, 15]. Nadmiar hemu jest toksyczny, dlatego też istotne są skuteczne systemy regulujące homeostazę żelaza i hemu, która jest ściśle powiązana z regulacją stanu redoks (tabela 1). Wykazano, iż homolog białka

OxyR bakterii *P. gingivalis*, jeden z głównych bakteryjnych czynników odpowiedzialnych za odpowiedź na stres oksydacyjny, wpływa na ekspresję czynników wirulencji biorących udział w przyswajaniu hemu, w tym *rgpA* [55]. OxyR jest czynnikiem aktywowanym również w warunkach ubogich w żelazo i hem [99], czyli w warunkach, jakie występują w jamie ustnej zdrowego człowieka, a także wewnątrz komórek gospodarza. W początkowych etapach infekcji, bakterie *P. gingivalis* są narażone na wysokie stężenie tlenu. Infekowanie komórek gospodarza, głównie komórek układu immunologicznego, również wiąże się z narażeniem bakterii na stres oksydacyjny w postaci m.in. wolnych rodników wytwarzanych przez te komórki. Może to świadczyć o udziale białka OxyR w procesie dostosowania się bakterii do stresu oksydacyjnego występującego w czasie infekcji bakterii *P. gingivalis*. Innym czynnikiem regulującym odpowiedź na stres oksydacyjny, a także przyswajanie hemu przez *P. gingivalis* jest czynnik sigma SigH. Mutant pozbawiony tego białka jest bardziej wrażliwy na stres wywołany tlenem. Ponadto SigH wpływa na ekspresję operonu *hmu*, a także reguluje aktywność Kgp [29, 100].

Główną rolę w homeostazie żelaza u bakterii Gram-ujemnych i części bakterii Gram-dodatnich pełnią białka z rodziny Fur. Białka te należą do bakteryjnych czynników transkrypcyjnych. Klasyczny mechanizm działania tych białek polega na wiązaniu jonów żelaza (Fe<sup>2+</sup>) w środowisku bogatym w Fe<sup>2+</sup>, co powoduje zmiany konformacyjne białka, zwiększając jego powinowactwo do sekwencji DNA zwanych „Fur-box”. Sekwencje promotora są blokowane dla podjednostek polimerazy RNA, co zatrzymuje transkrypcję i zmniejsza ekspresję genów regulowanych przez to białko [27]. Bakterie *P. gingivalis* wytwarzają homolog białka Fur (PgFur), który został niedawno scharakteryzowany przez nasz zespół [15, 89, 91]. PgFur należy do nowej podgrupy białek Fur, które nie pełnią klasycznej funkcji [89]. Białko to nie wpływa na ekspresję typowych genów regulowanych przez klasyczne białka Fur (np. FeoB) [9, 15, 91]. Działa również niezależnie od wiązania jonów żelaza [89]. Białko PgFur bierze natomiast udział w regulacji ekspresji wielu czynników wirulencji wytwarzanych przez *P. gingivalis*. Wykazaliśmy, iż jest ono zaangażowane w regulację aktywności hemolitycznej oraz proteolitycznej gingipain, a przede wszystkim bierze bezpośrednio udział w regulacji ekspresji operonu *hmu* [89] i jest istotne w procesie infekowania oraz przeżycia bakterii *P. gingivalis* wewnątrz komórek człowieka [15, 91].

Innym ważnym elementem odpowiedzialnym za homeostazę żelaza i hemu bakterii *P. gingivalis* jest dwuskładnikowy system HaeSR. Składa się z kinazy HaeS oraz białka regulatorowego HaeR. System jest aktywowany w warunkach ubogich w żelazo i hem. Bierze udział w regulacji ekspresji operonu *hmu* oraz *ihf*, a także genów *kgp* oraz *rgpA*. Niektóre szczepy, takie jak ATCC 33277, wykorzystywane rutynowo w badaniach laboratoryjnych, mają delecję w obrębie genu kodującego HaeS, upośledzając wzrost tego szczepu [75]. Wydaje się,



że system HaeSR jest jednym z bardziej istotnych elementów w regulacji pozyskiwania hemu oraz wirulencji u bardziej wirulentnych szczepów bakterii *P. gingivalis*.

U wielu bakterii nadmiar hemu w ich wnętrzu jest neutralizowany przez jego degradację z wykorzystaniem oksygenaz hemowych IsdG, HmuO czy też ChuZ [16, 72]. Nie zidentyfikowano jeszcze homologów tych białek u bakterii *P. gingivalis*, a sam los hemu po transporcie do wnętrza tej bakterii jest słabo poznany. Uważa się, iż istotną rolę może tu odgrywać białko PgDps, które wykazuje duży stopień homologii do białek Dps. Białko to jest zdolne do wiązania żelaza oraz hemu, tworząc mechanizm ochronny bakterii *P. gingivalis* przed stresem oksydacyjnym wywołanym nadmiarem tych substancji [31]. W procesie homeostazy hemu istotny udział mają również gingipainy. Aktywność tych proteaz pozwala na akumulację hemu na powierzchni bakterii, co stanowi swego rodzaju magazyn, jak również pełni funkcję ochronną przed stresem oksydacyjnym [61].

## PODSUMOWANIE

Patogeneza chorób przyzębia jest procesem bardzo skomplikowanym i wielopoziomowym. Periodontopatogeny człowieka wykorzystują wiele mechanizmów

wirulencji, które pozwalają im na zasiedlenie jamy ustnej, zdobycie niezbędnych do przeżycia substancji odżywczych oraz replikację w niekorzystnych warunkach jamy ustnej i wnętrza komórek gospodarza. Procesy te są pod ścisłą kontrolą białek regulatorowych odbierających sygnały ze środowiska zewnętrznego. Ze względu na ważną rolę bakterii *P. gingivalis* w zapoczątkowaniu i rozwoju chorób przyzębia, są one istotnym przedmiotem badań pozwalających na poszerzenie wiedzy na temat patogenyzy chorób przyzębia i chorób z nimi związanych, a także zrozumienie roli bakterii *P. gingivalis* w tym procesie. Zarówno gingipainy, jak i białka biorące udział w przyswajaniu hemu przez bakterie *P. gingivalis* dają im przewagę nawet w początkowych fazach infekcji, gdzie występują w bardzo małej liczbie. Funkcja tych białek nie ogranicza się tylko do przyswajania substancji odżywczych, ale biorą one również udział w innych procesach, zwiększając zdolności patogenne bakterii. Poznanie dokładnej funkcji białek przyczyniających się do wirulencji *P. gingivalis* oraz czynników je regulujących może pomóc zrozumieć proces patogenyzy chorób przyzębia. Wiedza ta może się przyczynić do rozwoju nowych strategii terapeutycznych, których celem będzie zahamowanie głównych etapów niezbędnych w procesie wirulencji bakterii *P. gingivalis*.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] Adams P.A., Berman M.C.: Kinetics and mechanism of the interaction between human serum albumin and monomeric haemin. *Biochem. J.*, 1980; 191: 95–102
- [2] Anaya-Bergman C., Rosato A., Lewis J.P.: Iron- and hemin-dependent gene expression of *Porphyromonas gingivalis*. *Mol. Oral Microbiol.*, 2015; 30: 39–61
- [3] Benedyk M., Byrne D.P., Glowczyk I., Potempa J., Olczak M., Olczak T., Smalley J.W.: Pyocyanin, a contributory factor in haem acquisition and virulence enhancement of *Porphyromonas gingivalis* in the lung. *PLoS One*, 2015; 11: e0148008
- [4] Bielecki M., Antonyuk S., Strange R.W., Siemińska K., Smalley J.W., Mackiewicz P., Śmiga M., Cowan M., Capper M.J., Ślęzak P., Olczak M., Olczak T.: *Prevotella intermedia* produces two proteins homologous to *Porphyromonas gingivalis* HmuY but with different heme coordination mode. *Biochem J.*, 2020; 477: 381–405
- [5] Bielecki M., Antonyuk S., Strange R.W., Smalley J.W., Mackiewicz P., Śmiga M., Stępień P., Olczak M., Olczak T.: *Tannerella forsythia* Tfo belongs to *Porphyromonas gingivalis* HmuY-like family of proteins but differs in heme-binding properties. *Biosci. Rep.*, 2018; 38: BSR20181325
- [6] Blasco-Baque V., Garidou L., Pomié C., Escoula Q., Loubieres P., Le Gall-David S., Lemaitre M., Nicolas S., Klopp P., Waget A., Azalbert V., Colom A., Bonnaure-Mallet M., Kemoun P., Serino M., Burcelin R.: Periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis* drives periodontal microbiota dysbiosis and insulin resistance via an impaired adaptive immune response. *Gut*, 2017; 66: 872–885
- [7] Bostanci N., Belibasakis G.N.: *Porphyromonas gingivalis*: An invasive and evasive opportunistic oral pathogen. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2012; 333: 1–9
- [8] Brown J.L., Yates E.A., Bielecki M., Olczak T., Smalley J.W.: Potential role for *Streptococcus gordonii*-derived hydrogen peroxide in heme acquisition by *Porphyromonas gingivalis*. *Mol. Oral Microbiol.*, 2018; 33: 322–335
- [9] Butler C., Mitchell H., Dashper S., Reynolds E.: The *Porphyromonas gingivalis* ferric uptake regulator orthologue does not regulate iron homeostasis. *Genom Data*, 2015; 5: 167–168
- [10] Byrne D.P., Manandhar S.P., Potempa J., Smalley J.W.: Break down of albumin and haemalbumin by the cysteine protease interpain A, an albuminase of *Prevotella intermedia*. *BMC Microbiol.*, 2015; 15: 185
- [11] Byrne D.P., Potempa J., Olczak T., Smalley J.W.: Evidence of mutualism between two periodontal pathogens: Co-operative haem acquisition by the HmuY haemophore of *Porphyromonas gingivalis* and the cysteine protease interpain A (InpA) of *Prevotella intermedia*. *Mol. Oral Microbiol.*, 2013; 28: 219–229
- [12] Carvalho-Filho P.C., Gomes-Filho I.S., Meyer R., Olczak T., Xavier M.T., Trindade S.C.: Role of *Porphyromonas gingivalis* HmuY in immunopathogenesis of chronic periodontitis. *Mediators Inflamm.*, 2016; 2016: 7465852
- [13] Castro S.A., Collighan R., Lambert P.A., Dias I.H., Chauhan P., Bland C.E., Milic I., Milward M.R., Cooper P.R., Devitt A.: *Porphyromonas gingivalis* gingipains cause defective macrophage migration towards apoptotic cells and inhibit phagocytosis of primary apoptotic neutrophils. *Cell Death Dis.*, 2017; 8: e2644
- [14] Chistiakov D.A., Orekhov A.N., Bobryshev Y.V.: Links between atherosclerotic and periodontal disease. *Exp. Mol. Pathol.*, 2016; 100: 220–235
- [15] Ciuraszkiewicz J., Śmiga M., Mackiewicz P., Gmiterek A., Bielecki M., Olczak M., Olczak T.: Fur homolog regulates *Porphyromonas gingivalis* virulence under low-iron/heme conditions through a complex regulatory network. *Mol. Oral Microbiol.*, 2014; 29: 333–353
- [16] Contreras H., Chim N., Credali A., Goulding C.W.: Heme uptake in bacterial pathogens. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2014; 19: 34–41
- [17] Curtis M.A., Sterne J.A., Price S.J., Griffiths G.S., Coulthurst S.K., Wilton J.M., Johnson N.W.: The protein composition of gingival crevicular fluid sampled from male adolescents with no destructive periodontitis: Baseline data of a longitudinal study. *J. Periodontol. Res.*, 1990; 25: 6–16

- [18] Darveau R.P., Hajishengallis G., Curtis M.A.: *Porphyromonas gingivalis* as a potential community activist for disease. *J. Dent. Res.*, 2012; 91: 816–820
- [19] Dashper S.G., Hendtlass A., Slakeski N., Jackson C., Cross K.J., Brownfield L., Hamilton R., Barr I., Reynolds E.C.: Characterization of a novel outer membrane hemin-binding protein of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Bacteriol.*, 2000; 182: 6456–6462
- [20] Dashper S.G., O'Brien-Simpson N.M., Bhogal P.S., Franzmann A.D., Reynolds E.C.: Purification and characterization of a putative fimbrial protein/receptor of *Porphyromonas gingivalis*. *Aust. Dent. J.*, 1998; 43: 99–104
- [21] Deng Z.L., Sztajer H., Jarek M., Bhuju S., Wagner-Döbler I.: Worlds apart- transcriptome profiles of key oral microbes in the periodontal pocket compared to single laboratory culture reflect synergistic interactions. *Front. Microbiol.*, 2018; 9: 124
- [22] de Pablo P., Chapple I.L., Buckley C.D., Dietrich T.: Periodontitis in systemic rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2009; 5: 218–224
- [23] Dominy S.S., Lynch C., Ermini F., Benedyk M., Marczyk A., Konradi A., Nguyen M., Haditsch U., Raha D., Griffin C., Holsinger L.J., Arastu-Kapur S., Kaba S., Lee A., Ryder M.I. i wsp.: *Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Sci. Adv.*, 2019; 5: eaau3333
- [24] Eke P.I., Thornton-Evans G.O., Wei L., Borgnakke W.S., Dye B.A., Genco R.J.: Periodontitis in US adults: National health and nutrition examination survey 2009–2014. *J. Am. Dent. Assoc.*, 2018; 149: 576–588.e6
- [25] El-Awady A., de Sousa Rabelo M., Meghil M.M., Rajendran M., Elashiry M., Stadler A.F., Foz A.M., Susin C., Romito G.A., Arce R.M., Cutler C.W.: Polymicrobial synergy within oral biofilm promotes invasion of dendritic cells and survival of consortia members. *NPJ Biofilms Microbiomes*, 2019; 5: 11
- [26] Enersen M., Nakano K., Amano A.: *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *J. Oral Microbiol.*, 2013; 5: 10.3402/jom.v5i0.20265
- [27] Fillat M.F.: The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: Diversity and versatility of key transcriptional regulators. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2014; 546: 41–52
- [28] Frencken J.E., Sharma P., Stenhouse L., Green D., Laverty D., Dietrich T.: Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis – a comprehensive review. *J. Clin. Periodontol.*, 2017; 44: S94–S105
- [29] Fujise K., Kikuchi Y., Kokubu E., Okamoto-Shibayama K., Ishihara K.: Effect of extracytoplasmic function sigma factors on autoaggregation, hemagglutination, and cell surface properties of *Porphyromonas gingivalis*. *PLoS One*, 2017; 12: e0185027
- [30] Gao J.L., Kwan A.H., Yammine A., Zhou X., Trehwella J., Hugrass B.M., Collins D.A.T., Horne J., Ye P., Harty D., Nguyen K.A., Gell D.A., Hunter N.: Structural properties of a haemophore facilitate targeted elimination of the pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Nat. Commun.*, 2018; 9: 4097
- [31] Gao J.L., Lu Y., Browne G., Yap B.C., Trehwella J., Hunter N., Nguyen K.A.: The role of heme binding by DNA-protective protein from starved cells (Dps) in the tolerance of *Porphyromonas gingivalis* to heme toxicity. *J. Biol. Chem.*, 2012; 287: 42243–42258
- [32] Gao J.L., Nguyen K.A., Hunter N.: Characterization of a hemophore-like protein from *Porphyromonas gingivalis*. *J. Biol. Chem.*, 2010; 285: 40028–40038
- [33] Gmiterek A., Kłopot A., Wójtowicz H., Trindade S.C., Olczak M., Olczak T.: Immune response of macrophages induced by *Porphyromonas gingivalis* requires HmuY protein. *Immunobiology*, 2016; 221: 1382–1394
- [34] Gmiterek A., Wójtowicz H., Mackiewicz P., Radwan-Oczko M., Kantorowicz M., Chomyszyn-Gajewska M., Frąszczak M., Bielecki M., Olczak M., Olczak T.: The unique hmuY gene sequence as a specific marker of *Porphyromonas gingivalis*. *PLoS One*, 2013; 8: e67719
- [35] Guo Y., Nguyen K.A., Potempa J.: Dichotomy of gingipains action as virulence factors: From cleaving substrates with the precision of a surgeon's knife to a meat chopper-like brutal degradation of proteins. *Periodontol.* 2000, 2010; 54: 15–44
- [36] Hajishengallis G., Darveau R.P., Curtis M.A.: The keystone-pathogen hypothesis. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2012; 10: 717–725
- [37] Hanioka T., Matsuse R., Shigemoto Y., Ojima M., Shizukuishi S.: Relationship between periodontal disease status and combination of biochemical assays of gingival crevicular fluid. *J. Periodontol. Res.*, 2005; 40: 331–338
- [38] Hendrickson E.L., Xia Q., Wang T., Lamont R.J., Hackett M.: Pathway analysis for intracellular *Porphyromonas gingivalis* using a strain ATCC 33277 specific database. *BMC Microbiol.*, 2009; 9: 185
- [39] Hiratsuka K., Hayakawa M., Kiyama-Kishikawa M., Sasaki Y., Hirai T., Abiko Y.: Role of the hemin-binding protein 35 (HBP35) of *Porphyromonas gingivalis* in coaggregation. *Microb. Pathog.*, 2008; 44: 320–328
- [40] Holt S.C., Ebersole J.L.: *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: The “red complex”, a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol.* 2000, 2005; 38: 72–122
- [41] How K.Y., Song K.P., Chan K.G.: *Porphyromonas gingivalis*: An over-view of periodontopathic pathogen below the gum line. *Front. Microbiol.*, 2016; 7: 53
- [42] Jung H., Jung S.M., Rim Y.A., Park N., Nam Y., Lee J., Park S.H., Ju J.H.: Arthritic role of *Porphyromonas gingivalis* in collagen-induced arthritis mice. *PLoS One*, 2017; 12: e0188698
- [43] Kamaguch A., Nakayama K., Ohyama T., Watanabe T., Okamoto M., Baba H.: Coaggregation of *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia*. *Microbiol. Immunol.*, 2001; 45: 649–656
- [44] Kuboniwa M., Hendrickson E.L., Xia Q., Wang T., Xie H., Hackett M., Lamont R.J.: Proteomics of *Porphyromonas gingivalis* within a model oral microbial community. *BMC Microbiol.*, 2009; 9: 98
- [45] Kumar R., Lovell S., Matsumura H., Battaile K.P., Moënné-Loccoz P., Rivera M.: The hemophore HasA from *Yersinia pestis* (HasAyp) coordinates hemin with a single residue, Tyr75, and with minimal conformational change. *Biochemistry*, 2013; 52: 2705–2707
- [46] Lam R.S., O'Brien-Simpson N.M., Holden J.A., Lenzo J.C., Fong S.B., Reynolds E.C.: Unprimed, M1 and M2 macrophages differentially interact with *Porphyromonas gingivalis*. *PLoS One*, 2016; 11: e0158629
- [47] Lappin D.F., Apatzidou D., Quirke A.M., Oliver-Bell J., Butcher J.P., Kinane D.F., Riggio M.P., Venables P., McInnes I.B., Culshaw S.: Influence of periodontal disease, *Porphyromonas gingivalis* and cigarette smoking on systemic anti-citrullinated peptide antibody titres. *J. Clin. Periodontol.*, 2013; 40: 907–915
- [48] Lasica A.M., Ksiazek M., Madej M., Potempa J.: The type IX secretion system (T9SS): Highlights and recent insights into its structure and function. *Front. Cell Infect. Microbiol.*, 2017; 7: 215
- [49] Lewis J.P., Macrina F.L.: IS195, an insertion sequence-like element associated with protease genes in *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immun.*, 1998; 66: 3035–3042
- [50] Lewis J.P., Plata K., Yu F., Rosato A., Anaya C.: Transcriptional organization, regulation and role of the *Porphyromonas gingivalis* W83 hmu haemin-uptake locus. *Microbiology*, 2006; 152: 3367–3382
- [51] Li N., Collyer C.A.: Gingipains from *Porphyromonas gingivalis* – Complex domain structures confer diverse functions. *Eur. J. Microbiol. Immunol.*, 2011; 1: 41–58
- [52] Lira-Junior R., Åkerman S., Klinge B., Boström E.A., Gustafsson A.: Salivary microbial profiles in relation to age, periodontal, and systemic diseases. *PLoS One*, 2018; 13: e0189374
- [53] Marsh P.D., McDermid A.S., McKee A.S., Baskerville A.: The effect of growth rate and haemin on the virulence and proteolytic activity of *Porphyromonas gingivalis* W50. *Microbiology*, 1994; 140: 861–865

- [54] Mesia R., Gholami F., Huang H., Clare-Salzler M., Aukhil I., Wallet S.M., Shaddox L. M.: Systemic inflammatory responses in patients with type 2 diabetes with chronic periodontitis. *BMJ Open Diabetes Res. Care*, 2016; 4: e000260
- [55] Meuric V., Gracieux P., Tamanai-Shacoori Z., Perez-Chaparro J., Bonnaure-Mallet M.: Expression patterns of genes induced by oxidative stress in *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol. Immunol.*, 2008; 23: 308–314
- [56] Moutsopoulos N.M., Kling H.M., Angelov N., Jin W., Palmer R.J., Nares S., Osorio M., Wahl S.M.: *Porphyromonas gingivalis* promotes Th17 inducing pathways in chronic periodontitis. *J. Autoimmun.*, 2012; 39: 294–303
- [57] Nazir M.A.: Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *Int. J. Health Sci.*, 2017; 11: 72–80
- [58] Nelson K.E., Fleischmann R.D., DeBoy R.T., Paulsen I.T., Fouts D.E., Eisen J.A., Daugherty S.C., Dodson R.J., Durkin A.S., Gwinn M., Haft D.H., Kolonay J.F., Nelson W.C., Mason T., Tallon L. i wsp.: Complete genome sequence of the oral pathogenic bacterium *Porphyromonas gingivalis* strain W83. *J. Bacteriol.*, 2003; 185: 5591–5601
- [59] Olczak T.: Analysis of conserved glutamate residues in *Porphyromonas gingivalis* outer membrane receptor HmuR: Toward a further understanding of heme uptake. *Arch. Microbiol.*, 2006; 186: 393–402
- [60] Olczak T., Dixon, D.W., Genco C.A.: Binding specificity of the *Porphyromonas gingivalis* heme and hemoglobin receptor HmuR, gingipain K, and gingipain R1 for heme, porphyrins, and metalloporphyrins. *J. Bacteriol.*, 2001; 183: 5599–5608
- [61] Olczak T., Simpson W., Liu X., Genco C.A.: Iron and heme utilization in *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2005; 29: 119–144
- [62] Olczak T., Sosicka P., Olczak M.: HmuY is an important virulence factor for *Porphyromonas gingivalis* growth in the heme-limited host environment and infection of macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2015; 467: 748–753
- [63] Olczak T., Sroka A., Potempa J., Olczak M.: *Porphyromonas gingivalis* HmuY and HmuR: Further characterization of a novel mechanism of heme utilization. *Arch. Microbiol.*, 2008; 189: 197–210
- [64] Olczak T., Wójtowicz H., Ciuraszkiwicz J., Olczak M.: Species specificity, surface exposure, protein expression, immunogenicity, and participation in biofilm formation of *Porphyromonas gingivalis* HmuY. *BMC Microbiol.*, 2010; 10: 134
- [65] Olsen I., Lambris J.D., Hajishengallis G.: *Porphyromonas gingivalis* disturbs host-commensal homeostasis by changing complement function. *J. Oral Microbiol.*, 2017; 9: 1340085
- [66] Park Y., Simionato M.R., Sekiya K., Murakami Y., James D., Chen W., Hackett M., Yoshimura F., Demuth D.R., Lamont R.J.: Short fimbriae of *Porphyromonas gingivalis* and their role in coadhesion with *Streptococcus gordonii*. *Infect. Immun.*, 2005; 73: 3983–3989
- [67] Petersen P.E., Ogawa H.: The global burden of periodontal disease: Towards integration with chronic disease prevention and control. *Periodontol.* 2000, 2012; 60: 15–39
- [68] Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E.: UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.*, 2004; 25: 1605–1612
- [69] Popadiak K., Potempa J., Riesbeck K., Blom A.M.: Biphasic effect of gingipains from *Porphyromonas gingivalis* on the human complement system. *J. Immunol.*, 2007; 178: 7242–7250
- [70] Potempa J., Banbula A., Travis J.: Role of bacterial proteinases in matrix destruction and modulation of host responses. *Periodontol.* 2000, 2000; 24: 153–192
- [71] Potempa J., Sroka A., Imamura T., Travis J.: Gingipains, the major cysteine proteinases and virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*: Structure, function and assembly of multidomain protein complexes. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 2003; 4: 397–407
- [72] Richard K.L., Kelley B.R., Johnson J.G.: Heme uptake and utilization by Gram-negative bacterial pathogens. *Front. Cell Infect. Microbiol.*, 2019; 9: 81
- [73] Romero-Lastra P., Sánchez M.C., Llama-Palacios A., Figuero E., Herrera D., Sanz M.: Gene expression of *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 when growing in an *in vitro* multispecies biofilm. *PLoS One*, 2019; 14: e0221234
- [74] Rudney J.D., Chen R., Sedgewick G.J.: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Tannerella forsythensis* are components of a polymicrobial intracellular flora within human buccal cells. *J. Dent. Res.*, 2005; 84: 59–63
- [75] Scott J.C., Klein B.A., Duran-Pinedo A., Hu L., Duncan M.J.: A two-component system regulates heme acquisition in *Porphyromonas gingivalis*. *PLoS One*, 2013; 8: e73351
- [76] Sender R., Fuchs S., Milo R.: Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS Biol.*, 2016; 14: e1002533
- [77] Seymour G.J., Ford P.J., Cullinan M.P., Leishman S., Yamazaki K.: Relationship between periodontal infections and systemic disease. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2007; 13: 3–10
- [78] Shimotahira N., Oogai Y., Kawada-Matsuo M., Yamada S., Fukutsuji K., Nagano K., Yoshimura F., Noguchi K., Komatsuzawa H.: The surface layer of *Tannerella forsythia* contributes to serum resistance and oral bacterial coaggregation. *Infect. Immun.*, 2013; 81: 1198–1206
- [79] Shoji M., Shibata Y., Shiroza T., Yukitake H., Peng B., Chen Y.Y., Sato K., Naito M., Abiko Y., Reynolds E.C., Nakayama K.: Characterization of heme-binding protein 35 (HBP35) in *Porphyromonas gingivalis*: Its cellular distribution, thioredoxin activity and role in heme utilization. *BMC Microbiol.*, 2010; 10: 152
- [80] Singh A., Wyant T., Anaya-Bergman C., Aduse-Opoku J., Brunner J., Laine M.L., Curtis M.A., Lewis J.P.: The capsule of *Porphyromonas gingivalis* leads to a reduction in the host inflammatory response, evasion of phagocytosis, and increase in virulence. *Infect. Immun.*, 2011; 79: 4533–4542
- [81] Smalley J.W., Birss A.J., Szmigielski B., Potempa J.: Sequential action of R- and K-specific gingipains of *Porphyromonas gingivalis* in the generation of the haem-containing pigment from oxyhaemoglobin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2007; 465: 44–49
- [82] Smalley J.W., Byrne D.P., Birss A.J., Wojtowicz H., Sroka A., Potempa J., Olczak T.: HmuY haemophore and gingipain proteases constitute a unique syntrophic system of haem acquisition by *Porphyromonas gingivalis*. *PLoS One*, 2011; 6: e17182
- [83] Smalley J.W., Silver J., Marsh P.J., Birss A.J.: The periodontopathogen *Porphyromonas gingivalis* binds iron protoporphyrin IX in the mu-oxo dimeric form: An oxidative buffer and possible pathogenic mechanism. *Biochem. J.*, 1998; 331: 681–685
- [84] Smalley J.W., Thomas M.F., Birss A.J., Withnall R., Silver J.: A combination of both arginine- and lysine-specific gingipain activity of *Porphyromonas gingivalis* is necessary for the generation of the mu-oxo bishaem-containing pigment from haemoglobin. *Biochem. J.*, 2004; 379: 833–840
- [85] Socransky S.S., Haffajee A.D., Cugini M.A., Smith C., Kent R.L.Jr.: Microbial complexes in subgingival plaque. *J. Clin. Periodontol.*, 1998; 25: 134–144
- [86] Sroka A., Sztukowska M., Potempa J., Travis J., Genco C.A.: Degradation of host heme proteins by lysine- and arginine-specific cysteine proteinases (gingipains) of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Bacteriol.*, 2001; 183: 5609–5616
- [87] Suzuki N., Yoneda M., Hirofuji T.: Mixed red-complex bacterial infection in periodontitis. *Int. J. Dent.*, 2013; 2013: 587279
- [88] Szafranski S.P., Deng Z.L., Tomasch J., Jarek M., Bhuju S., Meisinger C., Kühnisch J., Sztajer H., Wagner-Döbler I.: Functional biomarkers for chronic periodontitis and insights into the roles of *Prevotella nigrescens* and *Fusobacterium nucleatum*; A metatranscriptome analysis. *NPJ Biofilms Microbiomes*, 2015; 1: 15017

- [89] Śmiga M., Bielecki M., Olczak M., Olczak T.: *Porphyromonas gingivalis* PgFur is a member of a novel Fur subfamily with non-canonical function. *Front. Cell Infect. Microbiol.*, 2019; 9: 233
- [90] Śmiga M., Bielecki M., Olczak M., Smalley J.W., Olczak T.: Anti-HmuY antibodies specifically recognize *Porphyromonas gingivalis* HmuY protein but not homologous proteins in other periodontopathogens. *PLoS One*, 2015; 10: e0117508
- [91] Śmiga M., Stępień P., Olczak M., Olczak T.: PgFur participates differentially in expression of virulence factors in more virulent A7436 and less virulent ATCC 33277 *Porphyromonas gingivalis* strains. *BMC Microbiol.*, 2019; 19: 127
- [92] Tolosano E., Altruda F.: Hemopexin: Structure, function, and regulation. *DNA Cell Biol.*, 2002; 21: 297–306
- [93] Trindade S.C., Olczak T., Gomes-Filho I.S., Moura-Costa L.F., Cerqueira E.M., Galdino-Neto M., Alves H., Carvalho-Filho P.C., Xavier M.T., Meyer R.: Induction of interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-10, IL-8 and immunoglobulin G by *Porphyromonas gingivalis* HmuY in humans. *J. Periodontal. Res.*, 2012; 47: 27–32
- [94] Veith P.D., Chen Y.Y., Gorasia D.G., Chen D., Glew M.D., O'Brien-Simpson N.M., Cecil J.D., Holden J.A., Reynolds E.C.: *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles exclusively contain outer membrane and periplasmic proteins and carry a cargo enriched with virulence factors. *J. Proteome Res.*, 2014; 13: 2420–2432
- [95] Wang R.E., Tian L., Chang Y.H.: A homogeneous fluorescent sensor for human serum albumin. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2012; 63: 165–169
- [96] Widziolek M., Prajsnar T.K., Tazzyman S., Stafford G.P., Potempa J., Murdoch C.: Zebrafish as a new model to study effects of periodontal pathogens on cardiovascular diseases. *Sci. Rep.*, 2016; 6: 36023
- [97] Wójtowicz H., Guevara T., Tallant C., Olczak M., Sroka A., Potempa J., Solà M., Olczak T., Gomis-Rüth F.X.: Unique structure and stability of HmuY, a novel heme-binding protein of *Porphyromonas gingivalis*. *PLoS Pathog.*, 2009; 5: e1000419
- [98] Wójtowicz H., Wojaczyński J., Olczak M., Króliczewski J., Latos-Grazyński L., Olczak T.: Heme environment in HmuY, the heme-binding protein of *Porphyromonas gingivalis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2009; 383: 178–182
- [99] Xie H., Zheng C.: OxyR activation in *Porphyromonas gingivalis* in response to a heme-limited environment. *Infect. Immun.*, 2012; 80: 3471–3480
- [100] Yanamandra S.S., Sarrafee S.S., Anaya-Bergman C., Jones K., Lewis J.P.: Role of the *Porphyromonas gingivalis* extracytoplasmic function sigma factor, SigH. *Mol. Oral Microbiol.*, 2012; 27: 202–219
- [101] Zhang Y., Wang T., Chen W., Yilmaz O., Park Y., Jung I.Y., Hackett M., Lamont R.J.: Differential protein expression by *Porphyromonas gingivalis* in response to secreted epithelial cell components. *Proteomics*, 2005; 5: 198–211
- [102] Zhou L.N., Bi C.S., Gao L.N., An Y., Chen F., Chen F.M.: Macrophage polarization in human gingival tissue in response to periodontal disease. *Oral Dis.*, 2019; 25: 265–273
- [103] Zhu W., Lee S.W.: Surface interactions between two of the main periodontal pathogens: *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia*. *J. Periodontal. Implant. Sci.*, 2016; 46: 2–9

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.