

mgr Zuzanna Nowakowska  
Zakład Mikrobiologii  
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii  
Uniwersytet Jagielloński

### Rola fosforylacji w sekrecji gingipain i wirulencji *Porphyromonas gingivalis*

Wśród wielu chorób cywilizacyjnych jedną z najbardziej rozpowszechnionych jest paradontoza – choroba przyzębia, prowadząca często do utraty uzębienia. Klinicznie, epidemiologicznie i serologicznie paradontoza jest powiązana z takimi chorobami jak miażdżyca, reumatoidalne zapalenie stawów oraz choroba Alzheimerera. Głównym czynnikiem etiologicznym jest beztlenowa bakteria *Porphyromonas gingivalis*. Patogen ten posiada szereg przystosowań znacząco wpływających na odpowiedź odpornościową gospodarza, między innymi poprzez deregulację białek układu dopełniacza i inaktywację peptydów przeciwbakteryjnych. Głównymi czynnikami wirulencji *P. gingivalis* są gingipainy – proteazy cysteinowe. Bakteria produkuje dwie gingipainy arginino-specyficzne RgpA i RgpB oraz jedną lizyno-specyficzną, Kgp. Budowa i funkcje tych enzymów zostały już bardzo dobrze poznane, jednak wciąż niewiele wiadomo o mechanizmie regulującym ich sekrecję i potranslacyjną obróbkę do dojrzałych form enzymów. Ponieważ białka te ulegają w cytoplazmie fosforylacji, w pracy przedstawiono wyniki badań nad mechanizmem fosforylacji i wpływem tej modyfikacji na sekrecję, dojrzewanie, subkomórkową lokalizację i aktywność gingipain.

W przypadku bakterii w proces fosforylacji białek zaangażowane są głównie kinazy systemów dwuskładnikowych (ang. *two-component systems*, TCS). Przewidziano, że u *P. gingivalis* za fosforylację białek wydzielanych z udziałem systemu sekrecji typu IX (T9SS) odpowiadać mogą komponenty systemu PorXY, regulator odpowiedzi – białko PorX i błonowa komponenta receptorowa z cytoplazmatyczną domeną kinazową – białko PorY. Poprzez ich izogenowe usunięcie potwierdzono kluczowe znaczenie białka PorX dla właściwej obróbki i aktywności gingipain. W odróżnieniu od innych TCS, PorX zamiast domeny wiążącej DNA zawiera domenę podobną do fosfataz. Na podstawie porównania sekwencji zidentyfikowano potencjalną resztę Asp58 ulegającą fosforylacji oraz prawdopodobną katalityczną resztę Thr272 w domenie fosfatazowej. Mutacje Asp58Ala oraz Thr272Ala potwierdziły udział tych reszt w szlaku przekazu sygnału i potranslacyjnej obróbce progingipain. Znaczenie fosforylacji w potranslacyjnej obróbce gingipain udowodniono poprzez mutacje punktowe reszt Tyr, które zostały wykryte jako fosforylowane w fosfoproteomie *P. gingivalis*. Z kolei bezpośredni udział systemu PorXY w fosforylacji gingipain udowodniono poprzez przeniesienie znakowanej radioaktywnie reszty fosforanowej z ATP na PorY, z PorY na PorX i PorX na RgpB. W osobnej serii doświadczeń zbadano wpływ delekcji genu *porX* na zdolność bakterii do infekcji komórek eukariotycznych i przeżywania w tych komórkach, natomiast znaczenie PorX w wirulencji *P. gingivalis* zweryfikowano stosując myszy model infekcji. Uzyskane wyniki pokazały, że szczep pozbawiony genu *porX*, w porównaniu do szczepu dzikiego, miał znacznie osłabioną zdolność infekcji badanych komórek, a u myszy wywołał tylko niewielkie zmiany patologiczne, ale również nieznaczną odpowiedź odpornościową. Świadczy to o znaczącym wpływie PorX na gingipainy, jak również prawdopodobnie na inne białka zaangażowane w procesy fizjologiczne i patogenezę tej bakterii.

Podsumowując, w niniejszej pracy udowodniono znaczący wpływ fosforylacji zależnej od białka PorX na obróbkę, sekrecję i aktywność gingipain. Znaczenie fosforylacji w tych procesach potwierdzono jednoznacznie poprzez mutagenezę aktywnych reszt w PorX, jak również fosforylowanych tyrozyn w gingipainach. Wskazuje to, że *P. gingivalis* wykorzystuje fosforylację gingipain jako dodatkowy, jeszcze nie opisany mechanizm kontroli aktywacji głównych czynników wirulencji jakimi są gingipainy. Ograniczona infekcyjność i wirulencja mutantu z delecją *porX* sugeruje, że białko PorX odpowiedzialne za fosforylację gingipain może być kolejnym celem opracowania nowej terapii w zwalczaniu *P. gingivalis* i leczeniu paradontozy.

03 GRU. 2017

Zuzanna Nowakowska