

Biochemiczna i strukturalna charakterystyka peptydazy cysteinowej Tpr

Porphyromonas gingivalis W83

Dominika Staniec

Promotor: Prof. dr hab. Jan Potempa

Paradontoza jest jedną z najbardziej rozpowszechnionych, przewlekłych chorób zapalnych, powodowanych przez dysbiotyczny biofilm bakteryjny gromadzący się na powierzchni zębów. Choroba prowadzi do uszkodzenia struktur wspierających zęby i ostatecznie do ich utraty. Ponadto paradontoza jest klinicznie i epidemiologicznie powiązana z rozwojem cukrzycy, powikłaniami w ciąży, reumatoidalnym zapaleniem stawów i chorobami układu krążenia.

Porphyromonas gingivalis, Gram-ujemna, beztlenowa i asacharolityczna bakteria jest kluczowym patogenem biorącym udział w powstawaniu i rozwoju paradontozy. Najlepiej poznanymi czynnikami wirulencji tego patogenu są proteazy cysteinowe, odpowiedzialne za degradację kolagenu i fibronektyny, hamowanie oddziaływań komórek gospodarza z macierzą zewnątrzkomórkową oraz za ograniczoną proteolizę lub degradację różnorodnych cytokin, receptorów powierzchniowych komórek, składników komplementu, peptydów antybakteryjnych i receptorów limfocytów T.

W niniejszej pracy przedstawiono szczegółową charakterystykę biochemiczną i strukturalną aktywnej peptydazy cysteinowej Tpr, uczestniczącej w wirulencji *P. gingivalis* poprzez generowanie substancji odżywczych oraz unikanie systemu obronnego gospodarza. Jest to pierwszy do tej pory scharakteryzowany enzym kalpajno-podobny, znaleziony w organizmie prokariotycznym.

Prezentowane wyniki opisują mechanizm autokatalitycznej aktywacji peptydazy i jej specyficzność substratową. Potwierdzają rolę enzymu Tpr w wirulencji *P. gingivalis*, polegającą na trawieniu białek gospodarza, takich jak fibrynogen i fibronektyna, oraz kluczowych elementów wrodzonego systemu immunologicznego, jak np. składniki komplementu oraz peptyd antybakteryjny LL-37. Ponadto, w niniejszej rozprawie przedstawiono strukturę przestrzenną Tpr, która jest bakteryjnym homologiem kalpain. Poprzez krystalizację selenometioninowej pochodnej Tpr^{C229S} i dyfraktometrię rentgenowską kryształów białka rozwiązano strukturę natywnego enzymu, metodą podstawienia molekularnego. Pozwoliło to na scharakteryzowanie mechanizmu aktywacji proteazy, zmian konformacyjnych zachodzących podczas odcięcia propeptydu oraz wpływu jonów wapnia na te procesy. Dzięki porównaniu otrzymanej struktury do znanych struktur kalpain zweryfikowano faktyczną przynależność peptydazy Tpr do rodziny proteaz C2 (kalpain), przypisaną wcześniej na podstawie podobieństwa sekwencji aminokwasowej.

Opisano także specyficzność substratową peptydazy Tpr, wykorzystując metodę PS-SCL (ang. *Positional Scanning of Synthetic Combinatorial Libraries*) korzystając z bibliotek substratów zawierających zarówno naturalne aminokwasy występujące w białkach, jak i aminokwasy niebiałkowe.

Niniejsza rozprawa przyczynia się do pełniejszego i szczegółowego zrozumienia mechanizmów patogenności *P. gingivalis*, a tym samym opracowania nowych form leczenia i zapobiegania paradontozie.

11-01-2018 