

Izabela Ciastoń

## Streszczenie pracy doktorskiej

### Niezależna od aktywności proteolitycznej rola biologiczna gingipain *Porphyromonas gingivalis* w regulacji układu odpornościowego

Zapalenie przyzębia (paradontoza) jest schorzeniem o pierwotnej etiologii bakteryjnej, w którym następuje zaburzenie działania mechanizmów obrony immunologicznej. W konsekwencji prowadzi ono do rozwoju chronicznego stanu zapalnego powodującego poważne uszkodzenia tkanek okołożębowych. Uważa się, że to *Porphyromonas gingivalis* jest dominującym drobnoustrojem odpowiedzialnym za rozwój chronicznej postaci tej choroby, a jego głównymi czynnikami wirulencji są zewnątrzwydzielnicze enzymy proteolityczne zwane gingipainami. Proteazy te wykazują bardzo silny wpływ na funkcjonowanie układu immunologicznego gospodarza. Dotychczasowe badania nad mechanizmem działania gingipain koncentrowały się na aktywności proteolitycznej tych enzymów. Udowodniono ich rolę m.in. w degradacji peptydów antybakteryjnych gospodarza, białek układu dopełniacza, czy składowych układu krzepnięcia. Gingipainy są eksportowane na zewnątrz komórki bakteryjnej poprzez pęcherzyki wydzielnicze uwalniane z błony komórkowej patogenu. W tej formie mogą ulegać dystrybucji poza obręb biofilmu bakteryjnego, a także mogą zostać zinternalizowane przez komórki nabłonkowe. Aktywność tych enzymów jest hamowana obecnością tlenu oraz inhibitorami proteaz znajdujących się w osoczu (antytrambina III oraz alfa-2-makroglobulina), które jest dominującym składnikiem płynu wypełniającego kieszonki dziąsłowe pacjentów cierpiących na paradontozę. W związku z powyższym, nie można wykluczyć obecności nieaktywnych proteolitycznych form gingipain w tkankach objętych stanem chorobowym. Stąd, celem rozprawy doktorskiej była kompleksowa ocena mechanizmu prozapalnego działania nieaktywnych proteolitycznych gingipain w kontekście zapalenia przyzębia.

W toku badań, stosując modele *in vitro* w postaci linii nieśmiertelnych keratynocytów dziąsłowych TIGKs (ang. *telomerase immortalized gingival keratinocytes*) i komórek dendrytycznych zróżnicowanych z monocytów (moDC, ang. *monocyte derived dendritic cells*) udowodniono, że nieaktywne katalityczne formy gingipain indukują znamienne wyższą ekspresję mediatorów stanu zapalnego, zarówno na poziomie mRNA, jak i białka w stosunku do aktywnych proteolitycznych enzymów. Ponadto, indukcja tego procesu jest specyficzna dla gingipain argininowych, a najsilniejszy efekt obserwowany jest w przypadku proteazy RgpA. Zaobserwowany fenomen potwierdzono również w badaniach z wykorzystaniem izogenicznych

mutantów podjednostki katalitycznej gingipain oraz szczepu dzikiego poddanego inaktywacji enzymatycznej poprzez zastosowanie wysoce specyficznych inhibitorów gingipain - KYT.

Ze względu na brak aktywności proteolitycznej, nieaktywne gingipainy nie mogą wykorzystywać receptorów PAR do inicjacji przekazu sygnału, dlatego też postawiono hipotezę, że nieaktywna proteaza wzmacnia rozwój stanu zapalnego na innej drodze niż aktywna forma enzymu, będąc rozpoznawana przez nieznaną receptor powierzchniowy na komórkach gospodarza. W kolejnej części badań podjęto więc próbę bezpośredniej identyfikacji tego receptora. Poprzez metody obrazowania przy użyciu mikroskopii konfokalnej określono lokalizację nieaktywnych gingipain na powierzchni komórki gospodarza. Typowanie białek ekspozowanych na powierzchni błony komórkowej komórek TIGKs zdolnych do oddziaływania z nieaktywną i aktywną gingipainą RgpA wykonano, przy zastosowaniu metody sieciowania chemicznego oraz immunoprecypitacji ze specyficznymi dla gingipain przeciwciałami. Analiza kompleksów ligand-gingipaina, przeprowadzona przy użyciu spektroskopii masowej, wykazała potencjalne białka błonowe mogące wchodzić w interakcje z badanymi enzymami. Kolejnym krokiem była analiza szlaku sygnałowego indukowanego nieaktywnymi proteazami *P. gingivalis* w oparciu o model indukcji ekspresji IL-6, cytokiny kluczowej ze względu na jej rolę w procesie degradacji tkanki kostnej. Zastosowane blokowanie szlaku PI3K inhibitorem LY294002 spowodowało znamienne zahamowanie indukcji badanej cytokiny w przypadku nieaktywnej RgpA, co wskazuje na jego zaangażowanie w indukcję odpowiedzi prozapalnej indukowanej nieaktywnym enzymem. Metodą Western Blot wykazano również aktywację białka AKT, jednej z głównych kinaz szlaku PI3K, po stymulacji komórek nieaktywnymi proteolitycznymi formami enzymu oraz aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B, co końcowo prowadzi do zwiększonej ekspresji genu kodującego IL-6.

W kolejnej części pracy skupiono się na określeniu, jak wykazany mechanizm regulacji ekspresji IL-6 przez bakterie gatunku *P. gingivalis* oraz ich czynniki wirulencji wpływa na różnicowanie limfocytów w subpopulację Th17. Przeprowadzone badania wykazały, że stymulacja komórek prezentujących antygen bakteriami o zahamowanej aktywności gingipain wpływa na zwiększenie produkcji cytokin prozapalnych niezbędnych do różnicowania w kierunku Th17 (IL-6, IL-21, IL-23, IL-1 $\beta$ ). Konsekwencją tego jest proliferacja i różnicowanie naiwnych limfocytów CD4+ w kierunku populacji Th17. Zauważalna jest również aktywacja pozytywnych regulatorów szlaku indukcji IL-17, takich jak: IRF4, STAT3, RORc, ROR $\alpha$ . W celu zahamowania powstawania populacji Th17, zaproponowano blokadę szlaku sygnałowego IL-6, stosując przeciwciała przeciwko receptorowi dla IL-6, jak również inhibitora kinaz JAK1/2 (Ruxolitinib), co znacząco obniżyło liczebność populacji Th17. Podsumowując, poznanie mechanizmów patogenności bakterii determinujących rozwój chorób cywilizacyjnych, jaką staje się paradontoza, jest kluczowe w procesie projektowania terapii.

Uzyskane wyniki sugerują więc, że IL-6 i jej szlak sygnałowy powinna być uwzględniana jako cel w terapiach skierowanym przeciwko działaniu czynników wirulencji bakterii *P. gingivalis*. Przedstawione dane weryfikują również dotychczasową wiedzę na temat funkcji gingipain w procesie modulacji odpowiedzi immunologicznej i po raz pierwszy przedstawiają rolę nieaktywnych enzymatycznie proteaz w indukcji stanu zapalnego. Dodatkowo otwierają również dyskusję nad zakwalifikowaniem gingipain do grupy tzw. „moonlighting proteins”- białek wielofunkcyjnych, co może skłonić do poszukiwania kolejnych białek bakteryjnych wykazujących podobne właściwości.

11-06-2019

Deabela Ciator

