

## Streszczenie pracy doktorskiej Danuty Bryzek

pt. „Indukcja nieaktywnych bakteriobójczo zewnątrzkomórkowych pułapek neutrofilowych (NETs) przez gingipainy, jako nowy mechanizm wirulencji *Porphyromonas gingivalis*”

Zewnątrzkomórkowe pułapki neutrofilowe (NETs) stanowią sieć zbudowaną z chromatyny oraz białek ziarnistości neutrofilii o wysokim potencjale bakteriobójczym, która umożliwia neutralizację drobnoustrojów chorobotwórczych oraz tworzy barierę hamującą rozprzestrzenianie się bakterii. Badania ostatnich lat wskazują, że generacja NETs jest odpowiedzią neutrofilii na obecność patogenów, jednakże rola poszczególnych czynników wirulencji w indukcji pułapek neutrofilowych nie została dotychczas poznana. Na szczególną uwagę zasługują czynniki sekrecjonowane przez patogen do środowiska zewnętrznego, które mogą działać lokalnie w środowisku infekcji, jak i systemowo, dyfundując do miejsc nieobjętych zakażeniem. *Porphyromonas gingivalis* jest periodontopatogenem, którego rola w indukcji NETs została udokumentowana, ale mechanizm tego procesu nie został scharakteryzowany.

Z tego względu celem niniejszej pracy doktorskiej była ocena roli gingipain, proteaz o dominującej roli w wirulencji tego patogenu, na indukcję NETs. Przeprowadzone badania wykazały, że indukcja NETs przez *P. gingivalis* jest zależna od poziomu produkowanych proteaz. Udowodniono to, wykorzystując szczepy bakteryjne ze zróżnicowaną aktywnością gingipain oraz izolowane pęcherzyki błony zewnętrznej, które stanowią dominujący nośnik tych enzymów. Aby zbadać mechanizm indukcji NETs przez *P. gingivalis* do badań wykorzystano oczyszczone gingipainy, wśród których wyróżnia się proteazy arginino- (HRgpA, RgpB) i lizyno-specyficzne (Kgp). Wykazano, że spośród gingipain tylko HRgpA i RgpB uczestniczą w tworzeniu NETs, a najistotniejsze znaczenie dla tego procesu ma gingipaina HRgpA. Zastosowanie specyficznych dla gingipain inhibitorów Kyt dowiodło, że proces indukcji NETs jest zależny od aktywności enzymatycznej tych proteaz. Analiza mechanizmu działania gingipain wykazała, że proces tworzenia NETs w odpowiedzi na obecność tych enzymów jest zależny od aktywacji oksydazy NADPH i indukcji wybuchu tlenowego. Wyniki badań sugerują ponadto zaangażowanie w badany proces receptorów aktywowanych proteolitycznie (PAR). O możliwym udziale PAR w tworzeniu NETs świadczy pośrednio również to, że proteazy bakteryjne innych gatunków drobnoustrojów, aktywne względem substratów zawierających sekwencje PAR-2 indukowały NETs.

Generacja NETs w odpowiedzi na patogen jest procesem mającym na celu eliminację intruza, stąd podjęto badania mające na celu weryfikację bakteriobójczych funkcji NETs względem *P. gingivalis*. Przeprowadzone badania wykazały, że ekspresja gingipain znacząco zmniejsza wiązanie bakterii w strukturach sieci neutrofilowych i przyczynia się do przetrwania patogenu podczas konfrontacji z neutrofilami. Wyjaśnieniem obserwowanych zjawisk może być zależna od gingipain proteolityczna modyfikacja białek i peptydów dekorujących sieci DNA, w tym czynników o potencjalnie bakteriobójczym. Przypuszczenie to potwierdzono porównując antybakteryjne właściwości NETs, generowanych pod wpływem gingipain oraz indukowanych przez octan mirystynianu forbolu, PMA. Te ostatnie wykazywały silny potencjał bakteriobójczy w przeciwieństwie do NETs tworzonych w odpowiedzi na obecność gingipain. Uzyskane wyniki wyjaśniają dlaczego, pomimo ogromnej akumulacji neutrofilów i obecności NETs w zapaleniu przyzębia, nie dochodzi do eliminacji *P. gingivalis*. Ponadto wskazują po raz pierwszy na rolę proteaz bakteryjnych w indukcji NETs, które dodatkowo charakteryzują się osłabioną aktywnością bakteriobójczą.

Podsumowując, intensywne generowanie NETs, nieskutkująca eliminacja patogenu w miejscu infekcji, wzmacnia reakcję zapalną, stanowiąc tym samym nowy mechanizm wirulencji *P. gingivalis*. Ponadto, ze względu na udział NETs w rozwoju chorób autoimmunologicznych, udowodnienie roli *P. gingivalis* w tworzeniu NETs stanowi kolejny krok do mechanistycznego wyjaśnienia molekularnych podstaw silnych powiązań paradontozy z różnymi schorzeniami systemowymi, które obserwuje się w badaniach klinicznych i epidemiologicznych.

Danuta Buzela