

Streszczenie

Porphyromonas gingivalis, gram ujemna asacharolityczna i beztlenowa pałeczka jest głównym patogenem odpowiedzialnym za wywoływanie chorób przyzębia, a jej czynniki wirulencji są szeroko opisane w etiologii paradontozy. Jak się okazuje w ostatnich latach jej obecność została powiązana także z występowaniem innych chorób jak reumatoidalne zapalenie stawów czy zachłystowe zapalenie płuc. Szczegółowe podłoże tej korelacji nie zostało jednak dobrze scharakteryzowane, w szczególności w rozwoju chorób układu oddechowego. Celem niniejszej pracy doktorskiej była więc identyfikacja mechanizmów wirulencji bakterii na poziomie biochemicznym, w kontekście wywoływanego zachłystowego zapalenia płuc, a tym samym poszerzenie stanu wiedzy na temat działania patogenu.

Intensywny stan zapalny i wzmożona degradacja tkanki łącznej, obserwowane w mysim modelu zachłystowego zapalenia płuc, sugerują podwyższoną aktywność enzymów proteolitycznych w miejscu choroby. Ze względu na fakt, że stężenie proteaz bakteryjnych w miejscu infekcji nie jest dostatecznie wysokie, aby samodzielnie doprowadzić do tak drastycznych zmian, a w stanie homeostazy działanie proteaz gospodarza jest ściśle kontrolowane zarówno poprzez ich sekrecję jako nieaktywne zymogeny jak i produkcję specyficznych inhibitorów, głównym celem badań było sprawdzenie, czy enzymy produkowane przez bakterię mogą doprowadzić do ich niekontrolowanej aktywności, poprzez zaburzenie mechanizmów regulacyjnych działania proteaz, doprowadzając tym samym do występowania objawów choroby i postępującej destrukcji tkanki. Ponieważ za obróbkę białek tkanki łącznej i macierzy zewnątrzkomórkowej odpowiedzialne są przede wszystkim proteazy należące do rodzin metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP) czy kallikrein (KLK), pierwszy etap badań skupiał się na zbadaniu zdolności gingipain, enzymów odpowiedzialnych za ponad 80% aktywności proteolitycznej patogenu, do ich aktywacji. W tym celu stworzono unikatowy system do badania specyficzności substratowej enzymów proteolitycznych. Opracowana strategia bazuje na produkcji niewielkich białek fuzyjnych złożonych z badanej sekwencji, odpowiedzialnej za aktywację poszczególnych rodzin proteaz, przyłączonej do odpornego na proteolizę, rozpuszczalnego białka nośnikowego, które umożliwia wydajną ekspresję i łatwe oczyszczanie. Proponowana strategia pozwoliła na szybką i efektywną analizę dotychczas nieopisywanej aktywacji proform metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej oraz kallikrein występujących w płucach. Wyniki zostały potwierdzone przy użyciu dostępnych natywnych białek oraz z wykorzystaniem hodowli

in vitro komórek płucnego epitelium. W kolejnym etapie przeprowadzono weryfikację zdolności gingipain do degradacji inhibitorów badanych proteaz. W tym celu wyprodukowano i oczyszczono rekombinantowe białka: inhibitory z rodziny SPINK dla kallikrein oraz TIMP1 i TIMP2 dla metaloproteinaz. W każdym przypadku zaobserwowano degradację powyższych inhibitorów przez gingipainy, powiązaną z utratą ich aktywności, co sugeruje, że także na tym poziomie obserwowane jest zaburzenie mechanizmów regulujących aktywność proteolityczną gospodarza. Ostatni etap pracy został poświęcony zbadaniu wpływu gingipain na mechanizmy odporności wrodzonej układu oddechowego, stanowiące pierwszą linię obrony przed patogenem. Okazuje się, że zarówno białko płucnego surfaktantu A, odpowiedzialne m.in. za opsonizację bakterii i tym samym ułatwiające usuwanie patogenów z ustroju oraz kalgranuliny S100A8 i S100A9 działające prozapalnie i antybakteryjnie są degradowane przez gingipainy.

Podsumowując, niniejsza praca doktorska skupia się na zbadaniu mechanizmów wirulencji *P. gingivalis* w wywoływanym zachłystowym zapaleniu płuc. Na podstawie przeprowadzonych badań udało się wykazać, że gingipainy produkowane przez patogen zarówno poprzez zaburzenie mechanizmów regulujących aktywność proteaz, jak i degradację białek odpowiedzialnych za mechanizmy obronne organizmu, mogą prowadzić do patologicznych stanów obserwowanych w zachłystowym zapaleniu płuc, prezentując w ten sposób nowe, dotychczas nieopisane mechanizmy wirulencji *P. gingivalis* w chorobach układu oddechowego.