Tytuł rozprawy doktorskiej: Charakterystyka proteazy i serpiny *Tannerella forsythia*.

Promotor: prof. dr hab. Jan Potempa

Streszczenie

Analiza genomu *Tannerella forsythia*, bakterii uważanej za czynnnik etiologiczny parodontozy u ludzi, ujawniła obencość genów kodujących domniemaną proteazę z rodziny subtylaz oraz domniemany inhibitor z superrodziny serpin, nazwanych, odpowiednio, mirolazą i miropiną. Wobec tego zdecydowaliśmy otrzymać oba białka w formie rekombinowanej, a następnie je scharakteryzować.

Mirolaza jest syntetyzowana jako nieaktywny, wielodomenowy zymogen (85 kDa), który aktywuje się poprzez kolejne cięcia autoproteolityczne do dojrzałej formy (40 kDa), składającej się tylko z domeny katalitycznej. Za latencję mirolazy odpowiedzialny jest N-terminalny profragment (NTP). W przeciwieństwie do niemal wszystkich znanych bakteryjnych subtylaz, odcięty NTP nadal był niekowalencyjnie związany z mirolazą, hamując jej proteolityczną, ale nie amidolityczną aktywność. Następnie NTP był stopniowo degradowany, co prawadziło do pełnej aktywacji enzymu. Zarówno proces aktywacji jak i sama aktywność mirolazy była hamowana przez EDTA, ale w sposób odwracalny przez nadmiar Ca^{2+}. Mirolaza jest specyficznym enzymem, który poprzez degradację fibrynogenu, hemoglobiny i peptydu antybakteryjnego LL-37 może przyczyniać się do patogenności *T. forsythia*.

Miropina jest wydzielniczą lipoproteiną. Miropina wydajnie hamowała mirolazę, subtylizynę Carlsberg, ludzką katepsynę G i elastazę neutrofilową, świńską elastazę trzustkową oraz trypsynę wołową ze stechiometrią inhibicji równą około 3 i stałą asocjacji wynoszącą od 2.7×10^4 (katepsyna G) do 7.1×10^5 $M^{-1}s^{-1}$ (subtylizyna). Hamowanie proteaz zachodziło z wytworzeniem trwałych, kowalencyjnych kompleksów. Co ciekawe, hamowane proteazy rozpoznawały różne miejsca aktywne w obrębie pętli reaktywnej (RCL) miropiny, z dala od miejsca P1-P1' przewidzianego na podstawie porównania sekwencji miropiny z innymi serpinami. Miropina jest więc wyjątkowa wśród hamujących serpin i prawdopodobnie uzyskała zdolność hamowania wielu proteaz kosztem wysokiej stechiometrii oraz niskiej wartości stałej asocjacji. W związku z powyższym miropina może być odpowiedzialna za przeżycie *T. forsythia* w środowisku o wysokiej aktywności proteolitycznej jakim jest płytka nazębna, gdzie *T. forsythia* jest narażona na działanie proteaz serynowych, a w szczególności elastazy i katepsyny G wydzielanych przez ludzkie neutrofile.

Wykonane badania doprowadziły do opisania dwóch nowych, a zarazem wyjątkowych białek *T. forsythia*: proteazy serynowej, mirolazy i inhibitora należącego do superrodziny serpin, miropiny, które mogą przyczyniać się do patogenności *T. forsythia*.