

Nowy mechanizm manipulowania odpowiedzią immunologiczną gospodarza przez *Porphyromonas gingivalis*: Rola PPAD i fimbrii w TLR2-zależnym przekazie sygnału.

Streszczenie

Kluczowy patogen jamy ustnej: *Porphyromonas gingivalis* jest gram-ujemną, beztlenową bakterią przyczyniającą się do rozwoju i postępu paradontozy, przewlekłego zapalenia tkanek przyzębia. Warto podkreślić, że zapalenie przyzębia jest najczęściej występującą chorobą zapalną u ludzi wywoływaną przez bakterie. Co więcej, wiele chorób ogólnoustrojowych, takich jak zapalenie stawów, miażdżyca czy choroba Alzheimera, jest również powiązanych z zapaleniem przyzębia i obecnością *P. gingivalis*. *P. gingivalis* wytwarza szeroką gamę czynników wirulencji, takich jak: lipopolisacharyd (LPS), gingipainy, pęcherzyki błony zewnątrzkomórkowej (OMVs), fimbrie, kapsułę oraz deiminazę peptydyloargininową (PPAD). Umożliwia to tej bakterii manipulowanie odpowiedzią immunologiczną gospodarza w taki sposób by modyfikować środowisko oraz sygnały odbierane przez gospodarza, oraz stworzyć idealne warunki do swojego wzrostu w kieszonkach przyzębnych. Bakteria ta osiąga to poprzez promowanie warunków zapalnych, które zapewniają składniki odżywcze dla tej asacharolitycznej bakterii, przy jednoczesnej neutralizacji antybakteryjnego działania układu odpornościowego gospodarza.

PPAD jest unikalnym czynnikiem wirulencji w królestwie Procaryota, ponieważ jest kodowany i wytwarzany tylko przez *P. gingivalis*. Enzym ten przekształca C-końcowe reszty Arg w cytrulinę w białkach i peptydach pochodzących od bakterii, a także gospodarza. Poprzednie wyniki z naszego laboratorium wykazały, że mutanty PPAD nie są w stanie stymulować odpowiedzi prozapalnej i aktywować szlaku syntezy prostaglandyny E2 (PGE2), czynnika prozapalnego powodującego resorpcję kości w zapaleniu przyzębia, w ludzkich pierwotnych fibroblastach dziąsłowych (PHGFs). Pomimo, że za oddziaływania *P. gingivalis* z komórkami gospodarza odpowiadają różne receptory rozpoznające wzorce patogenności (PRR), dominującą rolę w tym procesie pełni receptor Toll-podobny 2 (ang. *Toll-like receptor*, TLR2). Dlatego też, głównymi celami mojej pracy było: zbadanie roli cytrulinacji w przekazie sygnału zależnego od TLR2; analiza jego mechanizmu oraz identyfikacja cytrulinowanych białek *P. gingivalis* kluczowych w tym procesie.

W trakcie tych badań ustaliliśmy, że aktywacja TLR2 jest zależna od cytrulinacji oraz obecności fimbrii w badanych szczepach *P. gingivalis*. Fimbrie, polimeryczne, nitkowate struktury na powierzchni komórek bakteryjnych, są jednym z ważniejszych czynników

wirulencji *P. gingivalis*, ponieważ umożliwiają adhezję bakterii do różnych powierzchni, komórek gospodarza oraz innych gatunków bakterii, ułatwiając tworzenie biofilmu. W naszej niedawno opublikowanej pracy wykazaliśmy, że fimbrie są potencjalnie modyfikowane przez PPAD, oraz że cytrulinowane fimbrie wzmacniają aktywację TLR2. Stwierdziliśmy również, że brak PPAD osłabia odpowiedź prozapalną indukowaną przez fimbrie *P. gingivalis* w PHGFs. Wśród szczepów laboratoryjnych *P. gingivalis* oraz izolatów klinicznych wyróżnia się 6 typów fimbrii (I, Ib, II, III, IV, V) w zależności od sekwencji genu *fimA* kodującego główną podjednostkę fimbrii. W niniejszym projekcie przebadano 10 szczepów klinicznych uzyskanych od pacjentów z zapaleniem przyzębia pod kątem ich zdolności do stymulowania odpowiedzi prozapalnej w komórkach gospodarza jak również ich właściwości biochemicznych takich jak aktywność PPAD, ekspresja fimbrii oraz genotyp *fimA*. Większość z tych szczepów była słabymi agonistami TLR2, prawdopodobnie z powodu ekspresji głównie FimA typu II w przeciwieństwie do szczepu laboratoryjnego: ATCC33277, który koduje typ I FimA i jest silnym induktorem stanu zapalnego.

Kolejnym etapem badania mechanizmu aktywacji TLR2 przez fimbrie *P. gingivalis* była próba identyfikacji miejsca modyfikacji PPAD w strukturze fimbrii. Aby potwierdzić obecność modyfikacji katalizowanej przez PPAD podjęto próbę odtworzenia odpowiedzi na fimbrie poprzez dodanie oczyszczonego PPAD. Próba ta zakończyła się niepowodzeniem, ponieważ inkubacja fimbrii izolowanych z mutanta pozbawionego PPAD z oczyszczonym enzymem nie przywróciła fimbriom zdolności do aktywacji TLR2. Na podstawie znanej struktury fimbrii *P. gingivalis* założyliśmy, że cytrulinacja zachodzi tylko podczas etapu formowania się fimbrii. Formowanie się fimbrii wymaga hydrolizy wiązania peptydowego Arg46-Ser w lipoproteinie FimA wydzielonej na powierzchnię bakterii przez Arg-specyficzne gingipainy (RgpA lub RgpB). Umożliwia to polimeryzację białka FimA. W naszych badaniach założyliśmy, że C-końcowa arginina pozostałego z FimA peptydu zakotwiczonego w błonie zewnętrznej jest substratem dla PPAD i w formie cytrulinowej jest rozpoznawana przez TLR2. Aby zweryfikować to założenie przebadaliśmy mutanty *P. gingivalis* produkujące FimA z Arg46 podstawioną innym aminokwasem. Szczepy te niezależnie od mutacji i zdolności do tworzenia polimerycznych struktur zbudowanych z FimA wykazały podobny potencjał do aktywowania TLR2 jak szczep typu dzikiego. Wyniki te wskazały, że to nie FimA zmodyfikowany przez PPAD jest ligandem przez TLR2 i zwróciły naszą uwagę na FimCDE, akcesorowe białka fimbrii *P. gingivalis* jako potencjalne ligandy TLR2. To założenie zostało potwierdzone wynikami uzyskanymi z reporterowej linii komórkowej, które wykazały, że mutanty podjednostek akcesorowych fimbrii są znacznie słabszymi agonistami TLR2 niż szczep typu

dzikiego. Aktywacja TLR2 przez te szczepy była zależna od aktywności PPAD i obecności FimCDE, co w pełni zostało potwierdzone w doświadczeniach z wyizolowanymi fimbriami z tych szczepów. Zebrane razem wyniki jednoznacznie wskazują, że to akcesorowe białka fimbrii modyfikowane PPAD, a nie FimA, są agonistami TLR2, co w przypadku PHGFs prowadzi do prozapalnej aktywacji tych komórek.

Ostatnia część pracy dotyczyła weryfikacji, czy odpowiedź komórek immunologicznych jest zależna od cytrulinacji. Makrofagi są ważnymi komórkami immunologicznymi podczas infekcji *P. gingivalis*, szybko reagują na obecność bakterii, fagocytują je, wytwarzają cytokiny, prezentują antygeny limfocytom T i odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy tkanek. Dlatego też jako model wykorzystano ludzkie makrofagi pochodzące od monocytów. Uzyskane wyniki wskazują, że cytrulinowane fimbrie nasilają odpowiedź prozapalną makrofagów, manifestującą się ekspresją genów szlaku syntezy PGE2 i cytokin, jak również wzrostem wydzielania cytokin do środowiska. W tych niepublikowanych jeszcze wynikach wykazaliśmy, że zmodyfikowane działaniem PPAD akcesorowe białka fimbrii są istotne w przeżywaniu *P. gingivalis* w makrofagach, co może być spowodowane zahamowaniem aktywacji Akt i osłabieniem produkcji reaktywnych form tlenu (ROS) przez te fagocyty.

Podsumowując, niniejsza praca stanowi ważne badanie pokazujące po raz pierwszy złożony wpływ cytrulinomu *P. gingivalis* na komórki gospodarza. Nasze badania podkreślają znaczenie cytrulinacji białek bakteryjnych w kontekście wirulencji *P. gingivalis* oraz wskazują na nowy mechanizm, dzięki któremu *P. gingivalis* jest w stanie manipulować odpowiedzią immunologiczną gospodarza. Badania te w przyszłości mogą przyczynić się do opracowania nowych metod leczenia lub zapobiegania zapaleniu przyzębia oraz innym chorobom, które są powiązane z tą bakterią.