



UNIwersytet Jagielloński
w Krakowie

Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii

**Regulacja mechanizmów epigenetycznych w aktywacji
zapalnej komórek strukturalnych dżiąsła w przewlekłym
zapaleniu przyzębia**

Katarzyna Łagosz-Ćwik

Rozprawa doktorska
wykonana pod opieką
prof. dr hab. Jana Potempy
oraz dr Aleksandra Grabca
w Zakładzie Mikrobiologii

Kraków 2023

PODZIĘKOWANIA

Chciałabym przede wszystkim podziękować mojemu **promotorowi pomocniczemu, dr Aleksandrowi Grabcowi**, za lata dobrej współpracy, za wszystkie udzielone wskazówki, za motywowanie mnie do podejmowania działań naukowych, za pomoc we wszelkich przedsięwzięciach oraz za cierpliwość.

Swoje podziękowania kieruję również do **prof. dr hab. Jana Potempy**, za umożliwienie mi realizacji badań w Zakładzie Mikrobiologii oraz za wszelkie cenne rady.

Ogromne podziękowania kieruję również dla mojego **Męża** za nieocenione wsparcie oraz za to, że wierzył we mnie w chwilach zwątpienia. Dziękuję także mojej **najbliższej Rodzinie i Przyjaciółom** za każde słowo wsparcia.

Chciałabym także podziękować **Kolegom i Koleżankom z Zespołu** za dobrą współpracę, pomoc w doświadczeniach i miłą atmosferę w pracy.

Spis treści

1	Wykaz skrótów	6
2	Streszczenie	8
3	Abstract	11
4	Wstęp	14
4.1	Patofizjologia PZP.....	14
4.1.1	PZP – patofizjologia i czynnika ryzyka.....	14
4.1.2	<i>P. gingivalis</i>	15
4.1.3	Odpowiedź gospodarza w PZP.....	18
4.1.4	PZP a inne choroby zapalne	18
4.2	Rola GFs w patogenezie PZP	19
4.2.1	Aktywacja zapalna GFs.....	21
4.2.2	Rola GFs w procesie internalizacji bakterii.....	22
4.2.3	Rola GFs w innych procesach związanych z patofizjologią PZP.....	23
4.3	Mechanizmy epigenetyczne w PZP.....	25
4.3.1	Mechanizmy epigenetyczne.....	25
4.3.2	Mechanizmy epigenetyczne w patofizjologii PZP.....	30
5	Cele pracy	35
6	Materiały	36
6.1	Hodowle komórkowe	36
6.2	Wykaz użytych inhibitorów.....	36
6.3	Hodowle bateryjne.....	37
6.4	Analiza qPCR	37
6.5	ELISA.....	38
6.6	Western blot.....	38
6.7	Analiza cytometryczna	40
6.8	Ocena proliferacji i żywotności komórek.....	40
6.9	Pomiar globalnej metylacji.....	40
6.10	Wykaz używanych programów.....	40
6.11	Skład buforów	41
7	Metody	42
7.1	Metody ogólne.....	42
7.1.1	Hodowle komórkowe	42
7.1.2	Hodowle bakteryjne	43
7.1.3	Przygotowanie bakterii do infekcji.....	43
7.1.4	Analiza ekspresji genów.....	43

7.1.5	Analiza ilości wydzielonych mediatorów zapalnych za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA	45
7.1.6	Analiza ekspresji białek za pomocą metody western blot	46
7.1.7	Pomiar cytotoksyczności HDACi/DNMTi.....	47
7.1.8	Pomiar tempa proliferacji komórek.....	47
7.1.9	Pomiar globalnej metylacji DNA	48
7.1.10	Badanie internalizacji i przeżywalności wewnątrzkomórkowej bakterii metodą posiewową 48	
7.1.11	Analiza statystyczna.....	49
7.2	Badanie wpływu HDACi na aktywację zapalną GFs	49
7.2.1	Układ eksperymentalny	49
7.2.2	Ocena wpływu HDACi na żywotność GFs	49
7.2.3	Badanie pośrednich efektów działania HDACi.....	50
7.2.4	Internalizacja bakterii.....	50
7.2.5	Transfekcja	51
7.3	Badanie wpływu DNMTi na aktywację zapalną GFs i PDLFs.....	51
7.3.1	Układ eksperymentalny	51
7.3.2	Analiza transkryptomyczna (sekwencjonowanie RNA; RNA-seq)	52
7.3.3	Analiza ekspresji mRNA i produkcji mediatorów stanu zapalnego	52
7.3.4	Analiza wpływu rekombinowanej CCL20 (r-CCL20) na przeżywalność <i>P. gingivalis</i>	53
7.3.5	Pomiar degradacji r-CCL20 przez <i>P. gingivalis</i>	53
7.3.6	Pomiar cytotoksyczności DNMTi	53
7.4	Badanie długofalowych efektów infekcji <i>P. gingivalis</i> na aktywację zapalną GFs.....	54
7.4.1	Układ eksperymentalny – optymalizacja modelu.....	54
7.4.2	Układ eksperymentalny – główny model.....	55
7.4.3	Układ eksperymentalny – model z dodatkowym etapem przesiewania komórek	55
7.4.4	Pomiar wewnątrzkomórkowej produkcji IL-6	56
7.4.5	Analiza RRBS (ang. <i>reduced representation bisulfite sequencing</i> ; zredukowane reprezentacyjne sekwencjonowanie bisulfitowe).....	57
8	Wyniki	58
8.1	Badanie wpływu HDACi na aktywację zapalną GFs	58
8.1.1	HDACi powodują zwiększenie poziomu acetylacji białek	58
8.1.2	HDACi obniżają odpowiedź zapalną GFs indukowaną przez TNF	59
8.1.3	HDACi nie wykazują działania cytotoksycznego na GFs.....	60
8.1.4	HDACi nie mają wpływu na aktywację ścieżek sygnałowych ani nie indukują syntezy korepresorów transkrypcji.....	61
8.1.5	HDAC3 odgrywa istotną rolę w regulacji odpowiedzi zapalnej GFs na infekcję <i>P. gingivalis</i>	64

8.1.6	HDACi nie wpływają na procesy związane z internalizacją bakterii, ich przeżywaniami wewnątrz komórek gospodarza oraz ich eliminacją	67
8.1.7	HDACi redukują poziom ekspresji mediatorów stanu zapalnego w GFs wyizolowanych od pacjentów z PZP	68
8.1.8	siRNA skutecznie wycisza ekspresję HDAC3 na poziomie mRNA oraz białka.....	69
8.1.9	Efekty wyciszenia ekspresji HDAC3 częściowo pokrywają się z efektami działania HDACi	70
8.2	Określenie wpływu inhibicji DNMT1 na aktywację zapalną i inne funkcje biologiczne komórek strukturalnych dziąsła.....	72
8.2.1	Decytabina indukuje globalną hipometylację DNA.....	72
8.2.2	Decytabina indukuje globalne zmiany w transkryptomie GFs wpływając na szeroki zakres procesów komórkowych	72
8.2.3	Decytabina indukuje ekspresję CCL20 i MMPs	76
8.2.4	Działanie innych inhibitorów DNMT1 na odpowiedź zapalną GFs potwierdza specyficzność działania decytabiny.....	78
8.2.5	Decytabina produkowana przez GFs w obecności inhibitorów DNMT1 nie wykazuje działania antybakteryjnego	80
8.2.6	Decytabina ułatwia adhezję <i>P. gingivalis</i> do GFs.....	81
8.2.7	Decytabina osłabia proliferację GFs oraz wykazuje działanie cytotoksyczne	82
8.2.8	Efekty działania decytabiny są zależne od dawki	85
8.2.9	Produkty rozpadu decytabiny mają znikomy wpływ na efekty jej działania na funkcje GFs	86
8.2.10	Decytabina niekorzystnie wpływa na funkcje biologiczne PDLFs oraz na ich odpowiedź zapalną	88
8.3	Badanie długotrwałych skutków infekcji <i>P. gingivalis</i> na aktywację zapalną GFs.....	90
8.3.1	<i>P. gingivalis</i> wywołuje długotrwałe efekty na aktywację zapalną GFs.....	90
8.3.2	Długotrwałe efekty infekcji są niezależne od proliferacji GFs	91
8.3.3	Długofalowe efekty <i>P. gingivalis</i> nie są związane ze zmianami w poziomie globalnej metylacji DNA	94
8.3.4	Infekcja <i>P. gingivalis</i> nie powoduje lokalnych zmian poziomu metylacji DNA w genomie GFs	95
8.3.5	Za utrzymującą się silniejszą odpowiedź zapalną GFs po infekcji mogą odpowiadać zmiany w szlaku sygnałowym NFκB	97
9	Dyskusja.....	99
9.1	Badanie wpływu HDACi na aktywację zapalną GFs	100
9.2	Określenie wpływu inhibicji DNMT1 na aktywację zapalną i inne funkcje biologiczne komórek strukturalnych dziąsła.....	105
9.3	Badanie długotrwałych skutków infekcji <i>P. gingivalis</i> na aktywację zapalną GFs	110
10	Bibliografia	115

1 Wykaz skrótów

ACPA (ang. *anti-citrullinated protein antibodies*) – przeciwciała rozpoznające cytrulinowane białka

BHI (ang. *brain-heart infusion*) – wyciąg mózgowo-sercowy

BSA (ang. *bovine serum albumin*) – surowicza albumina wołowa

CAF (ang. *cancer associated fibroblasts*) – fibroblasty związane z nowotworem

CCL (ang. *chemokine (C-C motif) ligand*) – chemokina z motywem CC

COX2 (ang. *cyclooxygenase 2*) – cyklooksygenaza 2

CXCL (ang. *chemokine (C-X-C motif) ligand*) – chemokina z motywem CXC

CHX (ang. *cyclohexymide*) – cykloheksymid

DAMPs (ang. *damage-associated molecular patterns*) – wzroce molekularne związane z uszkodziami

DMEM (ang. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) – medium do hodowli komórek

DNMTs (ang. *DNA methyltransferases*) – metylotransferazy DNMT

FBS (ang. *fetal bovine serum*) – płodowa surowica bydlęca

FLS (ang. *fibroblast-like synoviocytes*) – fibroblasty błony maziowej

GECs (ang. *gingival epithelial cells*) – komórki nabłonkowe dziąsła

GCF (ang. *gingival crevicular fluid*) – dziąsłowy płyn kieszonkowy

GFs (ang. *gingival fibroblasts*) – fibroblasty dziąsła

HATs (ang. *histone acetyltransferases*) – acetylotransferazy histonów

HDAC (ang. *histone deacetylases*) – deacetylazy histonów

HDAC (ang. *histone deacetylase inhibitor*) – inhibitory deacetylaz histonów

ICAM1 (ang. *intracellular adhesion molecule 1*) – cząsteczka adhezji międzykomórkowej 1

IL (ang. *interleukin*) – interleukina

IFN (ang. *interferon*) - interferon

ITG (ang. *integrin*) – integryna

LPS (ang. *lipopolysaccharide*) - lipopolisacharyd

MAPK (ang. *mitogen activated protein kinase*) – aktywowana mitogenem kinaza białkowa

MMPs (ang. *matrix metalloproteinases*) – metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej

NFκB (ang. *nuclear factor κB*) – czynnik jądrowy κB

OPG (ang. *osteoprotegerin*) - osteoprotegeryna

PAD (ang. *peptidylarginine deiminase*) – deiminaza peptydylo-argininowa

PPAD (ang. *P. gingivalis* peptidylarginine deiminase) – deiminaza peptydylo-argininowa *P. gingivalis*

PAGE (ang. *polyacrylamide gel electrophoresis*) – elektroforeza w żelu poliakrylamidowym

PAMPs (ang. *pathogen-associated molecular patterns*) – wzorce mo

PBS (ang. *phosphate-buffered saline*) – zbuforowany roztwór soli fizjologicznej

PDGFs (ang. periodontal disease gingival fibroblasts) –fibroblasty dziąsła pochodzące od pacjentów z PZP

POChP (ang. *chronic obstructive pulmonary disease*) – przewlekła obturacyjna choroba płuc

PZP (ang. *chronic periodontal disease*) – przewlekłe zapalenie przyzębia

qPCR (ang. *quantitative polymerase chain reaction*) – ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy jądrowego κ B

RANK (ang. receptor activator of nuclear factor κB) – aktywator receptora czynnika jądrowego κB

RANKL (ang. receptor activator of nuclear factor κB ligand) – ligand aktywatora receptora czynnika jądrowego κB

RZS (ang. *reumathoid arthritis*) – reumatoidalne zapalenie stawów

SAHA (ang. *suberoylanilide hydroxamic acid*) – suberoilanilid hydroksamowy,

siRNA (ang. *short interfering RNA*) – krótki interferujący RNA

SLE (ang. *systemic lupus erythematosus*) – toczeń rumieniowaty układowy

TG2 (ang. *transglutaminase 2*) – transglutaminaza 2

TLR (ang. *Toll-like receptor*) – receptor Toll-podobny

TNF (ang. *tumor necrosis factor*) – czynnik nekrozy nowotworu

TSA (ang. *trichostatin A*) – trichostatyna A

2 Streszczenie

Przewlekłe zapalenie przyzębia (PZP), potocznie nazywane paradontozą, jest chorobą zapalną o podłożu mikrobiologicznym. Najnowsze dane WHO wskazują, że PZP w ciężkiej postaci dotyka 19% populacji na całym świecie. Nieleczona choroba prowadzi do nieodwracalnego uszkodzenia tkanek, utraty przyczepu łącznotkankowego i ostatecznie do utraty zębów. Mikrobiologiczne podłoże PZP związane jest z pojawieniem się tzw. dysbiotycznej mikroflory wywołanej przez obecność kluczowych periodontopatogenów, jak np. *Porphyromonas gingivalis*. Jest to beztlenowa bakteria, która ze względu na wysoki stopień patogenności oraz zdolność do unikania układu immunologicznego gospodarza, pełni istotną funkcję w wywoływaniu przewlekłego stanu zapalnego. Natomiast interakcje między komórkami strukturalnymi przyzębia a patogenami jamy ustnej odgrywają ważną rolę w rozwoju choroby. Jedną z najliczniejszych grup komórek dziąsła są fibroblasty dziąsła (ag. *gingival* fibroblasts; GFs), które pod wpływem aktywacji mogą wykazywać funkcje immunologiczne, np. poprzez indukcję infiltracji leukocytów. Ostatnie doniesienia literaturowe wskazują, że modulacja mechanizmów epigenetycznych może odwrócić patologiczne zmiany obserwowane w PZP. Jednakże dane opisujące epigenetyczne podłoże interakcji między *P. gingivalis* i/lub środowiskiem zapalnym a GFs są ograniczone.

Jednym z celów niniejszej pracy doktorskiej było zbadanie roli acetylacji histonów w aktywacji zapalnej GFs. Acetylacja histonów jest jednym z procesów epigenetycznych, który jest kontrolowany przez acetylotransferazy histonów (HATs) i deacetylasy histonów (HDACs). Acetylacja histonów prowadzi do aktywacji transkrypcji, natomiast deacetylacja histonów jest odpowiedzialna za wyciszenie ekspresji genów. Jednak ostatnie badania z wykorzystaniem inhibitorów HDAC (HDACi) wykazały, że regulacja ta jest bardziej złożona, a do zainicjowania transkrypcji nie wystarczy tylko acetylacja. W niniejszym badaniu HDACi wykorzystano do sprawdzenia, czy farmakologiczna modulacja systemu acetylacji może odwrócić patologiczne zmiany wywołane obecnością bakterii i mediatorów stanu zapalnego. Zastosowanie pan-HDACi (SAHA, ITF2357) i HDAC3/6i, ale nie inhibitorów HDAC1, HDAC6 ani HDAC8 zmniejszyło odpowiedź zapalną GFs na *P. gingivalis* i cytokiny prozapalne. Wynik ten sugeruje istotną rolę HDAC3 w aktywacji zapalnej GFs. Wyciszenie ekspresji *HDAC3* poprzez transfekcję komórek siRNA w większości pokrywało się z przeciwwzapalnymi efektami HDAC3/6i w GFs infekowanych *P. gingivalis*. Natomiast hamowanie aktywności HDAC nie miało wpływu na internalizację i przeżywalność wewnątrzkomórkową bakterii. Przeciwwzapalne działanie HDACi nie było również związane z indukcją szlaków sygnałowych MAPK (kinazy

białkowej aktywowanej mitogenami) lub NFκB (czynnika jądrowego κB), jak również nie wynikało z indukcji syntezy negatywnych regulatorów transkrypcji. Podsumowując, badania te pozwoliły na identyfikację HDAC3 jako ważnego regulatora ekspresji genów zapalnych i wskazują, że terapie blokujące aktywność HDACs, w szczególności HDAC3, mogą być korzystne w osłabianiu stanu zapalnego w PZP.

Metylacja DNA jest procesem prowadzącym do wyciszenia ekspresji genów, który katalizowany jest przez metylotransferazy DNA (DNMTs). Najnowsze badania wskazują, że hamowanie aktywności DNMTs może osłabiać stan zapalny i resorpcję kości w PZP, potencjalnie przyczyniając się do poprawy stanu pacjentów. Dlatego też kolejnym celem niniejszej pracy było określenie wpływu metylacji DNA na funkcje biologiczne i aktywację zapalną GFs. W tym celu komórki inkubowano przez 12 dni w obecności inhibitora DNMT1 – decytabiny (5-aza-2'-deoksycytydyną), który indukował hipometylację DNA. Analiza transkryptomyczna (sekwencjonowanie RNA; RNA-seq) ujawniła, że decytabina indukowała ekspresję genów związanych z odpowiedzią zapalną, natomiast ekspresja genów kontrolujących procesy związane z organizacją włókien kolagenowych i macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) była obniżona. Wyniki te wykazały zatem, że decytabina indukuje prozapalny fenotyp w GFs, a badania funkcjonalne potwierdziły wyniki analizy RNA-seq. Pokazano również, że decytabina może przyczyniać się do rozprzestrzeniania bakterii, ponieważ ułatwiała adhezję *P. gingivalis* do komórek. Ponadto decytabina wykazywała efekt antyproliferacyjny i cytotoksyczny, a jej niekorzystne działanie potwierdzono również w fibroblastach więzadła przyzębia (PDLFs). Ze względu na fakt, że decytabina jest wysoce niestabilna, przeprowadzono dalsze badania w celu weryfikacji, czy toksyczne produkty uwalniane podczas degradacji decytabiny mogą przyczyniać się do obserwowanych efektów. Wyniki wykazały jednak, że produkty degradacji inhibitora miały znikomy wpływ na aktywację zapalną i funkcje biologiczne GFs, co wskazuje, że obserwowane niekorzystne efekty działania decytabiny są konsekwencją wywołanej przez nią hipometylacji DNA. Podsumowując, ta część projektu doktorskiego wykazała ograniczony potencjał terapeutyczny decytabiny ze względu na jej niekorzystny wpływ na funkcje biologiczne GFs i PDLFs oraz na indukcję szlaków prozapalnych. Inhibitory DNMT stanowią jednak dobre narzędzie do badania roli hipometylacji DNA w komórkach strukturalnych dziąsła.

Trzecim celem niniejszej pracy była zbadanie długotrwałego wpływu infekcji *P. gingivalis* na aktywację zapalną GFs. W modelu tym GFs były pre-infekowane *P. gingivalis* przez 24 h, następnie bakterie odplukiwano, a komórki poddawano stymulacji TNF (czynnik martwicy

nowotworów) w 6 dniu eksperymentu. Wcześniejsza infekcja bakteryjna uwrażliwiła GFs na późniejszą stymulację zapalną i skutkowała podwyższoną produkcją cytokin (IL-6, IL-8), a efekt ten był niezależny od proliferacji komórek. Dodatkowo, analiza wewnątrzkomórkowego poziomu IL-6 za pomocą cytometrii przepływowej potwierdziła ten wynik, pokazując, że GFs wykazują zjawisko "pamięci immunologicznej" w odpowiedzi na ponowną stymulację zapalną. Ponieważ literatura wskazuje procesy epigenetyczne jako mechanizm leżący u podstaw "wrodzonej pamięci immunologicznej", zbadano zmiany w profilu metylacji DNA w GFs. Analiza RRBS (zredukowane reprezentacyjne sekwencjonowanie bisulfitowe) nie wykazała jednak istotnych zmian zarówno w globalnym, jak i w lokalnych poziomach metylacji DNA pomiędzy nieinfekowaną kontrolą a komórkami pre-infekowanymi *P. gingivalis*. Dalsze badania pokazały jednak wzrost poziomu fosforylacji podjednostki p65 czynnika transkrypcyjnego NFκB po stymulacji TNF w pre-infekowanych GFs. Wynik ten sugeruje możliwą rolę szlaku sygnałowego NFκB w regulacji obserwowanych zmian podczas aktywacji zapalnej GFs. Określenie pełnej skali i konsekwencji tego zjawiska, jak również potwierdzenie roli szlaku NFκB, wymaga jednak dalszych badań.

3 Abstract

Periodontitis is a chronic inflammatory disease of periodontium and most recent WHO data indicates periodontitis affects 19% of the population worldwide that in its severe form. If untreated, it leads to irreversible tissue damage and eventual tooth loss. Periodontitis is caused by microbial imbalance and the anaerobic bacterium *Porphyromonas gingivalis* plays a key role in driving chronic inflammation due to its virulence and ability to evade the host immune system. The interaction between the periodontium's structural cells and oral pathogens plays an important role in disease progression. Gingival fibroblasts (GFs) are the most abundant resident cells in gingiva and if activated, they can display immune functionalities e.g. by promoting neutrophil infiltration. Recent reports show that targeting epigenetic mechanisms can revert pathological changes observed in periodontitis. However, limited data exist describing the epigenetic background of interaction between *P. gingivalis* and/or inflammatory environment and GFs.

The first aim of this study was to investigate the role of histone acetylation in the inflammatory activation of GFs. Histone acetylation is one of epigenetic processes which is controlled by histone acetyltransferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs). Histone acetylation leads to active transcription, whereas histone deacetylation is responsible for silencing of gene expression. However, recent studies using HDAC inhibitors (HDACi) showed that this regulation is more complex and more histone post-translational modifications are necessary to initiate transcription. In the present study, HDACi were used to test whether pharmacological modulation of the acetylation system can revert pathological changes caused by the presence of bacteria and inflammatory mediators. Application of pan-HDACi (SAHA, ITF2357) and HDAC3/6i, but not HDAC1, HDAC6 nor HDAC8 inhibitors decreased inflammatory response of GFs to *P. gingivalis* and cytokines. This result suggested that HDAC3 might be responsible for GF inflammatory activation. Silencing of HDAC3 expression by transfecting cells with siRNA mostly mimicked the effects of HDAC3/6i on inflammatory gene expression in *P. gingivalis*-infected GFs. In contrast, HDAC inhibition has no effect on bacteria internalization and intracellular survival. Also, the anti-inflammatory effects of HDACi were not related to the induction of MAPK (mitogen activated protein kinase) or NF κ B (nuclear factor κ B) signaling pathways. Collectively, these studies allowed for the identification of HDAC3 as an important regulator of inflammatory gene expression and suggested that targeting HDAC activity may be clinically beneficial in suppressing inflammation in periodontitis.

The second part of the project was focused on studying the role of DNA methylation in GFs in the context of periodontal disease pathology. DNA methylation is another epigenetic mechanism which leads to silencing of gene expression. It is catalyzed by DNA methyltransferases (DNMTs) which are the enzymes responsible for adding methyl groups to cytosines. The latest studies indicate that inhibiting the activity of DNMTs may have a protective effect on inflammation and bone resorption in periodontitis. Therefore, to assess the impact of DNMT inhibitors (DNMTi) on GF biological functions and inflammatory response, cells were treated with the DNMT1-specific inhibitor decitabine (5-aza-2'-deoxycytidine) for 12 days to induce DNA hypomethylation. RNA sequencing (RNA-seq) data showed that decitabine upregulated genes associated with inflammatory response, whereas genes associated with ECM and collagen fibril organization pathways were downregulated. Thus, these results showed that decitabine induced an inflammatory, periodontitis-like phenotype of GFs. Functional studies of inflammatory mediator expression confirmed the RNA-seq results. Additionally, decitabine induced ICAM1 (intercellular adhesion molecule 1) expression and increased *P. gingivalis* adherence to GFs, which may facilitate bacteria dissemination. Further studies also showed that decitabine reduced GF proliferation and had a cytotoxic effect on cells. The detrimental effects of decitabine were also confirmed in another cell type of the periodontium, namely periodontal ligament fibroblasts (PDLFs). Because decitabine is highly unstable, more studies were conducted to assess if the toxic products released during decitabine degradation may contribute to the observed effects. The results demonstrated that the products of decitabine degradation had a negligible influence on GF biological functions and inflammatory activation, indicating that the observed effects are a consequence of the hypomethylating action of the inhibitor. To sum up, this part of the PhD project revealed the limited therapeutic potential of decitabine due to its detrimental effects on GF and PDLF biological functions and stimulation of pro-inflammatory pathways. However, it is an excellent tool to study the role of DNA hypomethylation in gingival cells.

The third goal of the study was to optimize the model of extended GF *P. gingivalis* infection which would mimic the physiologic conditions observed in periodontal disease. In this model GFs were pre-infected with *P. gingivalis* for 24 h, rested for a few days after removal of bacteria, and then subjected to stimulation with TNF (tumor necrosis factor) for up to 24 h at 6th day of the experiment. Bacterial challenge sensitized GFs to subsequent inflammatory stimulation and caused elevated secretion of cytokines (IL-6, IL-8), which was not proliferation-dependent. Additionally, analysis of the intracellular level of IL-6 by flow cytometry confirmed that result

showing that GFs display “immune memory” of a previous infection that lasts for several days. Since epigenetic changes have been indicated as underlying mechanisms of the “innate immune memory”, the alterations in DNA methylation status were assessed. However, *P. gingivalis* infection did not cause any significant lasting changes in global or local DNA methylation levels as confirmed by reduced representation bisulfite sequencing (RRBS). However, further investigations showed an increase in p65 phosphorylation level upon TNF stimulation in pre-infected GFs. This result suggests a possible role for NF κ B signaling in the observed long-term effects of infection on GF inflammatory activation. Determining the full scope and consequences of this phenomenon and confirming the exact role of the NF κ B pathway requires further research.

4 Wstęp

4.1 Patofizjologia PZP

4.1.1 PZP – patofizjologia i czynnika ryzyka

Przewlekłe zapalenia przyzębia (PZP), potocznie nazywane paradontozą, jest chorobą zapalną o podłożu mikrobiologicznym. Według danych z 2010 roku, schorzenie to w zaawansowanej formie dotykało 11% populacji, co czyniło PZP 6-tą najpowszechniejszą chorobą na świecie [1]. Z kolei najnowsze dane pochodzące z oficjalnej strony internetowej WHO wskazują, że obecnie zaawansowane PZP jest problemem 19% ludzkości [2]. PZP kojarzone jest przede wszystkim z wypadaniem zębów, jednak objaw ten dotyczy pacjentów w najbardziej zaawansowanym stadium choroby. Objawami poprzedzającymi utratę zębów są degradacja przyzębia oraz resorpcja kości wyrostka zębodołowego, co prowadzi do osłabionej łączności pomiędzy zębami a tkanką [3]. Wśród czynników ryzyka szczególną uwagę zwraca się na brak dostatecznej higieny jamy ustnej – nagromadzona płytka nazębna tworzy środowisko sprzyjające kolonizacji przez patogenne bakterie [4]. Kolejnym ważnym czynnikiem ryzyka jest wiek. Badania pokazują, że w grupie osób powyżej 65 roku życia, 64% z nich miało mniej lub bardziej zaawansowaną formę choroby przyzębia [5]. Ryzyko zachorowania na PZP zwiększa też uszkodzenie nabłonka dziąsła. Uszkodzona bariera nabłonkowa pozwala bowiem patogennym bakteriom na przedostanie się w głąb tkanki [6]. Zwiększona podatność na zachorowanie występuje również u osób z zaburzeniami immunologicznymi – w tym kontekście warto zwrócić uwagę, że stres, który powoduje osłabienie odporności, także przyczynia się do rozwoju choroby [4]. Pozostałe czynniki ryzyka to czynniki genetyczne, palenie, zła dieta czy spożywanie nadmiernych ilości alkoholu [3], [7].

Patogeneza PZP związana jest z chronicznym stanem zapalnym wywołanym przez zaburzenie równowagi mikrobiologicznej w jamie ustanej. Według wcześniejszych danych za rozwój PZP odpowiadały tzw. bakterie „czerwonego kompleksu”, do których należą silnie patogenne gatunki: *Porphyromonas gingivalis*, *Tanarella forsyhia* oraz *Treponema denticola*. Jednak późniejsze badania pokazały, że za rozwój choroby nie jest odpowiedzialna konkretna grupa patogenów, a działająca synergistycznie wspólnota bakteryjna powstała wskutek zaburzenia równowagi mikrobiologicznej w tkance dziąsła (dysbioza) [8]. Jednym z podstawowych wymagań dla powstania potencjalnie patogennej mikroflory jest zdolność niektórych gatunków, określanych jako kluczowe patogeny (ang. *keystone pathogens*), do modulowania odpowiedzi gospodarza (np. *P. gingivalis*). Kluczowe patogeny powodują początkowo osłabienie reakcji układu immunologicznego gospodarza, co pozwala na rozwój dysbiotycznej

mikroflory [8], [9]. Postępująca kolonizacja tkanki przyzębia patogennymi gatunkami bakterii prowadzi do ich nadmiernego gromadzenia, co skutkuje silną odpowiedzią immunologiczną. Powstały stan zapalny jest korzystny dla periodontopatogenów, gdyż wzmożony napływ komórek układu odpornościowego powoduje destrukcję tkanki przyzębia, a produkty rozpadu tkanki są jednocześnie składnikami odżywczymi dla bakterii. Cały proces to zatem pętla pozytywnego sprzężenia zwrotnego, która napędza chroniczny stan zapalny [10].

Warto w tym miejscu dodać, że połączenie dysbiozy, obecności kluczowych periodontopatogenów oraz predyspozycji gospodarza jest warunkiem koniecznym do wywołania PZP [10]. W tym kontekście warto zwrócić uwagę, że w myszach pozbawionych mikroflory *P. gingivalis* jedynie kolonizował tkankę, nie wywołując choroby [11]. Pokazano także, że bakterie „czerwonego kompleksu” mogą występować także u niektórych osób zdrowych nie wywołując jednak choroby [8]. W patogenezie PZP ważną rolę odgrywa również obecność tzw. pomocniczych bakterii (ang. *accessory bacteria*), czyli komensalnych gatunków bakterii występujących w jamie ustnej, które ułatwiają kluczowym patogenom kolonizację. Bakterie pomocnicze to głównie bakterie z gatunku *Streptococcus*, które wzmacniają wirulencję *P. gingivalis* w heterotypowej wspólnocie poprzez różnorodne interakcje mikrobiologiczne, włączając wyczuwanie masy krytycznej (ang. *quorum sensing*) czy koagregację za pośrednictwem adhezji do powierzchni komórek [12]. Przykładowo ko-infekcja myszy *P. gingivalis* i *Streptococcus gordonii* powoduje znacznie większy ubytek kości wyrostka zębodołowego niż monoinfekcja *P. gingivalis* [13]. Ważnym patogenem w patofizjologii PZP jest też *Fusobacterium nucleatum*. Jest to bakteria pośrednicząca pomiędzy pierwotnymi (bakterie komensalne) a wtórnymi (kluczowe periodontopatogeny) kolonizatorami kieszonki przyzębnej. *F. nucleatum* wzmacnia patogenność innych bakterii. W tym kontekście warto zaznaczyć, że infekcja myszy *F. nucleatum* powoduje resorpcję kości wyrostków zębodołowych, a ko-infekcja z *P. gingivalis* lub *T. forsythia* wzmacnia ten efekt [14]. Podobnie, ko-infekcja makrofagów *F. nucleatum* z *P. gingivalis* osłabia aktywację inflamosomu, co sugeruje, że bakterie te działają wspólnie na rzecz uniknięcia rozpoznania przez układ odpornościowy i stworzenia środowiska zapalnego [15].

4.1.2 *P. gingivalis*

Jednym z najlepiej zbadanych i opisanych periodontopatogenów jest *P. gingivalis*. Jest to Gram-ujemna, beztlenowa bakteria, która na płytkach agarowych z krwią rośnie w czarnych koloniach. Do wzrostu wymaga obecności hemu lub heminy oraz witaminy K. Jest bakterią asacharolityczną niezdolną do fermentacji cukrów, która w kieszonce przyzębnej, jej głównym

miejszem bytowania, wykorzystuje fermentację aminokwasów jako źródło węgla i energii [16]. W obrębie kieszonki przyzębnej można wydzielić 3 mikrośrodowiska: powierzchnię korzenia zęba, płyn kieszonkowy (ang. *gingival crevicular fluid*; GCF) oraz komórki nabłonkowe dziąsła (ang. *gingival epithelial cells*; GECs), które bezpośrednio stykają się z kieszonką. *P. gingivalis* w procesie infekcji wnika do GECs [17], ale jest też zdolny do aktywnego opuszczania komórek, co przyczynia się do dalszej penetracji tkanki łącznej [18]. Bakterie te są też zdolne do wnikania do fibroblastów dziąsła (ang. *gingival fibroblasts*; GFs), choć w mniejszym stopniu niż do GECs [19]. Wewnątrzkomórkowa lokalizacja jest korzystna dla bakterii, ponieważ w ten sposób unikają one rozpoznania przez układ immunologiczny, jak również są chronione przed działaniem antybiotyków [18]. *P. gingivalis* wykształcił również wiele mechanizmów pozwalających mu uniknąć rozpoznania przez komórki immunologiczne i manipuluje odpowiedzią gospodarza w taki sposób, by oddzielić stan zapalny od aktywności bakteriobójczej [10], [17].

4.1.2.1 Czynniki wirulencji *P. gingivalis*

W procesie infekcji patogeny wykorzystują czynniki wirulencji, czyli składniki lub metabolity niezbędne do prawidłowego cyklu życiowego bakterii, które jednocześnie mają szkodliwy wpływ na gospodarza. To właśnie one ułatwiają kolonizację tkanki, jej degradację oraz unikanie mechanizmów obronnych gospodarza [20]. *P. gingivalis* produkuje wiele czynników wirulencji, które ułatwiają mu przeżycie w tkance dziąsła, a poniżej opisano najważniejsze z nich.

- Lipopolisacharyd (LPS)

Jest to główny składnik ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych. Zbudowany jest z polisacharydu O-specyficznego, rdzenia oligosacharydowego oraz lipidu A, który odpowiada za aktywację układu immunologicznego. Lipid A może występować w formie mono-, tetra- lub pentacylowanej i w zależności od tego w jakiej formie występuje w danej cząsteczce LPS-u może aktywować różne ścieżki sygnałowe, a co za tym idzie inicjować zróżnicowaną odpowiedź komórek gospodarza [21].

- Fimbrie

Są to nitkowate struktury wystające z błony zewnętrznej bakterii. *P. gingivalis* posiada dwa typy fimbrii – długie, zbudowane z podjednostek FimA, oraz krótkie zbudowane z podjednostek Mfa1. Różnią się one stopniem antygenowości, niemniej jednak oba typy są zdolne do aktywacji odpowiedzi immunologicznej. Fimbrie zwiększają ruchliwość bakterii

oraz zdolność do adhezji komórek gospodarza oraz ich internalizacji. Np. szczep *P. gingivalis* ATCC33277 charakteryzuje się dużą ilością fimbrii i łatwiej wnika do komórek niż szczep W83 pozbawiony fimbrii. Struktury te są rozpoznawane przez receptory na powierzchni komórek epitelialnych, endotelialnych oraz immunologicznych, co prowadzi do produkcji cytokin i cząsteczek adhezyjnych. Fimbrie ułatwiają także adhezję do innych bakterii, co jest ważne w procesie formowania biofilmu [22].

- Gingipainy

Są to proteiny cysteinowe, które odpowiadają za 85% zewnątrzkomórkowej aktywności proteolitycznej *P. gingivalis*. Zaliczają się do nich gingipainy argininowe (RgpA, RgpB) oraz lizynowa (Kgp) [23]. Enzymy te powodują aktywację MMPs (metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej), degradację składników ECM, takich jak kolagen, oraz czynników immunologicznych (cytokin, immunoglobulin czy składników układu dopełniacza), jak również odcinanie receptorów z powierzchni komórek immunologicznych, co utrudnia ich rozpoznanie. Gingipainy biorą też udział w niszczeniu bariery nabłonkowej oraz degradują peptydy antybakteryjne (defensyny). Enzymy te są także zaangażowane w formowanie biofilmu bakteryjnego w kieszonce przyzębnej poprzez agregację z innymi bakteriami, a także pomagają w adhezji do komórek gospodarza, co ułatwia zarówno przeżywanie bakterii, jak i infekcję [21]. Gingipainy są zdolne do degradacji fibryny/fibrynogenu, co przyczynia się do rozpadu tkanki, zapewniając w ten sposób składniki odżywcze dla pozostałych bakterii i stymulując ich proliferację (Ally 2003). Gingipainy pomagają zatem *P. gingivalis* w unikaniu mechanizmów obronnych i eliminacji przez układ odpornościowy gospodarza [21].

- Otoczka

Nazywana jest antygenem K i składa się głównie z polisacharydów i wody. Otoczka może różnić się pomiędzy poszczególnymi szczepami składem chemicznym, a niektóre szczepy mogą nie mieć jej wcale (np. szczep *P. gingivalis* ATCC33277) [21]. Otoczka jest słabym aktywatorem zapalnym, np. GFs infekowane *P. gingivalis* W83, który posiada otoczkę wykazywały niższą produkcję cytokin prozapalnych niż infekowane szczepem pozbawionym otoczki [24]. Otoczka chroni bakterie przed fagocytozą [25] oraz przed działaniem peptydów antybakteryjnych [26]. Szczepy z otoczką wykazują też większą przeżywalność niż szczepy, które jej nie mają [21].

4.1.3 Odpowiedź gospodarza w PZP

Etiologia PZP związana jest nie tylko z infekcją bakteryjną, ale również z odpowiedzią gospodarza na obecność patogenów [3]. Jak już wspomniano wcześniej, kluczowe periodontopatogeny mają zdolność do manipulacji odpowiedzią immunologiczną, początkowo ją osłabiając, tak by dysbiotyczna mikroflora mogła się rozwijać. W miarę wzrostu ilości patogennych bakterii dochodzi do silnej reakcji immunologicznej, która skutkuje napływem komórek układu odpornościowego, aktywacją osteoklastogenezy oraz ostatecznie destrukcją przyzębia, jak i resorpcją kości wyrostka zębodołowego [10]. *P. gingivalis* wykształcił wiele mechanizmów pozwalających na unikanie rozpoznania przez układ odpornościowy gospodarza, i o ile nie będą one tutaj szczegółowo opisane, warto jednak wspomnieć o zdolności tego patogenu do wywołania tzw. lokalnego paraliżu chemokinowego (*ang.* local chemokine paralysis) [27]. *P. gingivalis* może wnikać do GECs, gdzie powoduje zahamowanie wydzielania interleukiny (IL)-8, chemokiny będącej chemoatraktantem dla neutrofilii. W normalnych warunkach gradient IL-8 przyciąga komórki immunologiczne do miejsca infekcji, natomiast w tym przypadku, ze względu na brak chemoatraktanta, nie dochodzi do rekrutacji neutrofilii [28], co sprzyja rozwojowi dysbiotycznej mikroflory.

Kiedy jednak dochodzi do silnej aktywacji zapalnej komórek uwalniane są cytokiny oraz chemokiny, które powodują rekrutację komórek immunologicznych, co przyczynia się do destrukcji tkanek podczas PZP. TNF (czynnik martwicy nowotworu; *ang.* *tumor necrosis factor*), IL-1 β , IL-6 oraz IFN γ (interferon γ) to cytokiny prozapalne znajdujące w dużych ilościach w GCF [29], [30]. Dodatkowo u pacjentów z PZP zaobserwowano nadekspresję IL-17, IL-8, CCL2 (*ang.* *C-C motif chemokine ligand 2*) oraz CXCL-6 (*ang.* *C-C-C motif chemokine ligand 10*), natomiast ilość cytokin przeciwzapalnych IL-4 i IL-11 była obniżona [30], [31]. TNF, IL-1 β i IL-6 uruchamiają dalszy łańcuch cytokinowy prowadzący do uwalniania kolejnych mediatorów, które są związane z konkretnymi grupami limfocytów: Th1 (IL-12, IFN γ), Th2 (IL-4), Th17 (IL-17, IL-23) i Treg (IL-2, IL-10, TGF- β) [32]. Poziom ekspresji cytokin prozapalnych koreluje z migracją komórek immunologicznych oraz osteoklastogenezą [33]. Podsumowując, zachwiana równowaga pomiędzy poziomem cytokin prozapalnych a przeciwzapalnych prowadzi do utrzymującego się stanu zapalnego, zaburzenia homeostazy oraz nieodwracalnej destrukcji tkanek [34].

4.1.4 PZP a inne choroby zapalne

O ile lokalnie PZP związane jest z utratą łączności pomiędzy tkanką przyzębia a zębami, o tyle ogólnoustrojowo PZP zwiększa ryzyko zachorowania na inne choroby zapalne, jak np. choroby

serca, miażdżyca, cukrzyca, choroby płuc, choroba Alzheimera czy nowotwory [35]. Istnieje wiele badań dowodzących powiązania PZP z reumatoidalnym zapaleniem stawów (RZS). *P. gingivalis* produkuje bowiem enzym PPAD (demininaza peptydylo-argininowa *P. gingivalis*), który katalizuje proces cytrulinacji białek. Enzym ten jest bardzo podobny do ludzkiego białka PAD, przez co przyczynia się do produkcji autooprzeciwciał rozpoznających cytrulinowane białka (ang. *anti-citrullinated protein antibodies*, ACPA). ACPA istotnie przyczyniają się do rozwoju zapalenia i destrukcji błony maziowej w RZS oraz stanowią jeden z głównych biomarkerów w diagnostyce RZS. Nowsze badania wskazują również na rolę *Aggregibacter actinomycetemcomitans*, kolejnego periodontopatogenu, który indukuje hipercytrulinację w neutrofilach. Aktywacja enzymów katalizujących cytrulinację prowadziła do powstania cytrulinomu porównywalnego do obserwowanego lokalnie w stawach dotkniętych RZS [36]. Kolejną chorobą, z którą powiązane jest PZP jest cukrzyca. Przewlekły stan zapalny oraz nadmierna ilość cytokin w ślinie i GCF przyczyniają się do zaburzenia kontroli glikemicznej i insulinooporności [37]. Ostatnie badania pokazują, że obecność zarówno *P. gingivalis*, jak i gingipain, wykryto w mózgu osób cierpiących na chorobę Alzheimera. Co więcej, ilość nagromadzonych w mózgu gingipain korelowała z patologią białka tau. Pokazano również, że gingipainy wykazywały działanie neurotoksyczne, a zastosowanie małowcząsteczkowego inhibitora gingipain hamowało ten efekt [38]. Coraz więcej danych zbieranych jest również na temat podwyższonego ryzyka nowotworowego u osób chorych na PZP. Metaanaliza wykazała pozytywną korelację pomiędzy wystąpieniem PZP i nowotworów jamy ustnej, płuc oraz trzustki [39]. Podsumowując, na przykładzie tylko kilku opisanych przypadków można zauważyć, że nieleczone PZP prowadzi nie tylko do utraty zębów, ale przyczynia się do rozwoju chorób ogólnoustrojowych, które negatywnie wpływają na jakość życia pacjenta.

4.2 Rola GFs w patogenezie PZP

Fibroblasty to ważna grupa komórek tkanki łącznej, a zaburzenia w ich funkcjonowaniu mogą być przyczyną progresji wielu chorób. Fizjologicznie fibroblasty produkują składniki macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *extracellular matrix*; ECM) oraz biorą udział w jej przebudowie, przyczyniając się do utrzymania integralności tkanek. Jednak w obecności patogenów, DAMPs (ang. *damage-associated molecular patterns*; wzorce molekularne związane z uszkodzeniami komórkowymi) lub innych czynników wywołujących stan zapalny, fibroblasty przyjmują funkcję komórek immunologicznych, stając się w pewnym sensie nietypowym składnikiem

wrodzonego układu odpornościowego. Jest to związane z ich zdolnością do produkcji cytokin i chemokin prozapalnych, które indukują napływ komórek immunologicznych oraz podtrzymują stan zapalny. Fibroblasty w warunkach patologicznych produkują też wzmożone ilości MMPs i katepsyn, które przyczyniają się do degradacji ECM oraz osteoklastogenezy [40], [41].

Rola fibroblastów w różnych schorzeniach jest dobrze udokumentowana. W RZS analiza transkryptomyczna na poziomie pojedynczej komórki wskazała na istnienie dwóch populacji zapalnych fibroblastów mazi stawowej (ang. *fibroblast-like synoviocytes*; FLS) – jednej odpowiedzialnej za ekspresję cytokin i podtrzymywanie stanu zapalnego, a drugiej związanej z degradacją chrząstki [42]. Opisano też istnienie heterogennych populacji fibroblastów w płucach osób zdrowych i cierpiących na śródmiąższową chorobę płuc związaną z twardziną układową oraz wskazano, że za progresję choroby odpowiedzialne są miofibroblasty [43]. CAFs (ang. *cancer associated fibroblasts*) to populacje fibroblastów związanych z mikrośrodowiskiem nowotworu, które ułatwiają wzrost guza poprzez stymulowanie angiogenezy, udział w metastazie oraz modulację nacieków immunologicznych. CAFs mają również wpływ na skuteczność terapii antynowotworowych. Dla przykładu, w nowotworach piersi i płuc, CAFs poprzez wydzielanie IL-6 przyczyniały się do zwiększania przeżywalności nowotworowych komórek macierzystych, co prowadziło do oporności na chemioterapię [44].

Wiele badań podkreśla istotną rolę fibroblastów również w przebiegu PZP. GFs są najliczniej występującą grupą komórek budujących tkankę łączną dziąsła [45]. Przez produkcję receptorów rozpoznających wzorce (ang. *pattern recognition receptors*; PRR), takich jak receptory Toll-podobne (ang. *Toll-like receptors*; TLRs) 1 – 9, receptory NOD-podobne (ang. *nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors*) 1 i 2 oraz PAR-1 i 2 (ang. *protease activated receptors*) GFs rozpoznają liczne patogeny oraz ich czynniki wirulencji [46], [47]. Infekcja GFs periodontopatogenami prowadzi do nasilonej produkcji cytokin i chemokin prozapalnych, jak również MMPs, co przyczynia się do utrzymania stanu zapalnego i resorpcji kości wyrostka zębodołowego. Potwierdzają to najnowsze badania wskazujące na dużą heterogenność pomiędzy poszczególnymi typami komórek stromy [40]. Opublikowana niedawno analiza transkryptomyczna na poziomie pojedynczej komórki pokazała, że GFs są zdolne do modulacji procesów immunologicznych w PZP poprzez rekrutację neutrofilów i limfocytów do miejsca toczącego się stanu zapalnego [48].

4.2.1 Aktywacja zapalna GFs

Przedstawione w przytoczonej pracy dane pokazały, że rekrutacja komórek immunologicznych była związana z ekspresją chemokin prozapalnych przez GFs (CXCL1, CXCL2, CXCL12, CCL2 oraz CCL19) [48]. Z kolei inne badania wskazały, że aktywacja zapalna GFs prowadzi również do produkcji cytokin (IL-6, IL-1 β), MMPs (MMP1, MMP3, MMP8 i MMP9) i prostaglandyny E2 (PGE2) – cząsteczek ważnych w patogenezie PZP [49]. Aktywacja zapalna związana jest z ekspresją PRRs, a kluczowa rola przypisywana jest TLR2. W tym kontekście, przeprowadzone przez nasz zespół badania *in vitro* z wykorzystaniem unieśmiertelnionej linii GFs (TIGFs) pokazały, że komórki te z powodu obniżonej ekspresji TLR2 na swojej powierzchni są niewrażliwe na infekcję *P. gingivalis*, która w pierwotnych GFs powodowała podwyższenie poziomu sekrecji cytokin prozapalnych. Natomiast TIGFs w podobnym stopniu, jak komórki pierwotne odpowiadały na infekcję *F. nucleatum*, która związana jest z aktywacją TLR4 [50]. Warto również nadmienić, że dane kliniczne wskazują na występowanie ligandów TLR2 i TLR4 w ślinie osób cierpiących na PZP w znacznie większych ilościach niż u osób zdrowych [51], co koreluje z wyższą ekspresją TLR2 w tkance dziąsła u osób chorych [52], [53]. Istnieje również wiele badań pokazujących wpływ *Pg*-LPS na aktywację zapalną GFs. W jednym z nich pokazano, że GFs z wyciszoną ekspresją TLR2 stymulowane *Pg*-LPS lub syntetycznymi ligandami TLRs cechowały się niższą produkcją IL-6 i IL-8 w porównaniu do GFs z wyciszoną ekspresją TLR4, dla których efekt taki nie był obserwowany [54]. W tym miejscu warto zaznaczyć, że istnieją dwa typy komercyjnie dostępnych preparatów *Pg*-LPS: ultra-czysty (ang. *ultra-pure*) i uzyskany poprzez standardową metodę izolacji. Uważa się, że ultra-czysty *Pg*-LPS aktywuje GFs poprzez TLR4, natomiast aktywacja TLR2 przez preparat *Pg*-LPS uzyskany metodą standardową wynika głównie z zanieczyszczeń lipoproteinami [55]. Z kolei GFs poddane stymulacji *Pg*-LPS wykazywały zwiększoną ekspresję IL-8 i PGE2, a jednoczesna stymulacja *Pg*-LPS z IL-1 β prowadziła do synergistycznego podniesienia ekspresji MyD88 (ang. *myeloid differentiation primary response*). Pokazano także, że w procesy te zaangażowane były białka ze szlaków MEK/ERK, JNK, p38 czy NF κ B [56], [57]. Warto też podkreślić, że odpowiedź komórek na infekcję *P. gingivalis* może też zależeć od modyfikacji czynników wirulencji, takich jak acylacja lipidu A czy cytulinacja fimbrii [58], [59]. W kontekście infekcji GFs innymi periodontopatogenami, LPS z *T. denticola* zwiększał ekspresję IL-6, IL-8, CCL2, NO, PGE2 oraz MMP3, a kwas lipoteichojuowy z *Filifactor alocis* podwyższał ekspresję TNF, IL-6, IL-8 i MMP2. Obserwowane efekty były związane z aktywacją szlaków m.in. kinaz MAP czy NF κ B [60], [61]. Ciekawym jest również fakt, że mniej patogeniczne gatunki bakterii jamy ustnej wywołują silniejszą odpowiedź zapalną niż

bakterie „czerwonego kompleksu”, gdyż te unikają rozpoznania przez układ odpornościowy poprzez obniżanie odpowiedzi gospodarza (np. wspomniany wcześniej paraliż chemokinowy) [62].

Środowisko zapalne działa również wpływa na aktywację zapalną GFs i zmienioną ekspresję PRRs – np. stymulacja TNF powoduje podwyższenie ekspresji TLR2 w GFs [63]. Istnieje wiele badań pokazujących, że mediatory stanu zapalnego, takie jak np. TNF czy IL-1 β powodują zwiększenie poziomu ekspresji różnych cytokin, chemokin, MMPs oraz składników szlaku syntezy PGE2 [64], [65]. W jednym z najnowszych badań pokazano, że pre-stymulacja IFN- γ lub IL-4 prowadzi do polaryzacji GFs w kierunku zapalnym lub modulującym ECM w odpowiedzi na infekcję [66], a istnienie podobnych subpopulacji GFs w dziąśle potwierdziła analiza transkryptomyczna na poziomie pojedynczej komórki (Williams 2021).

4.2.2 Rola GFs w procesie internalizacji bakterii

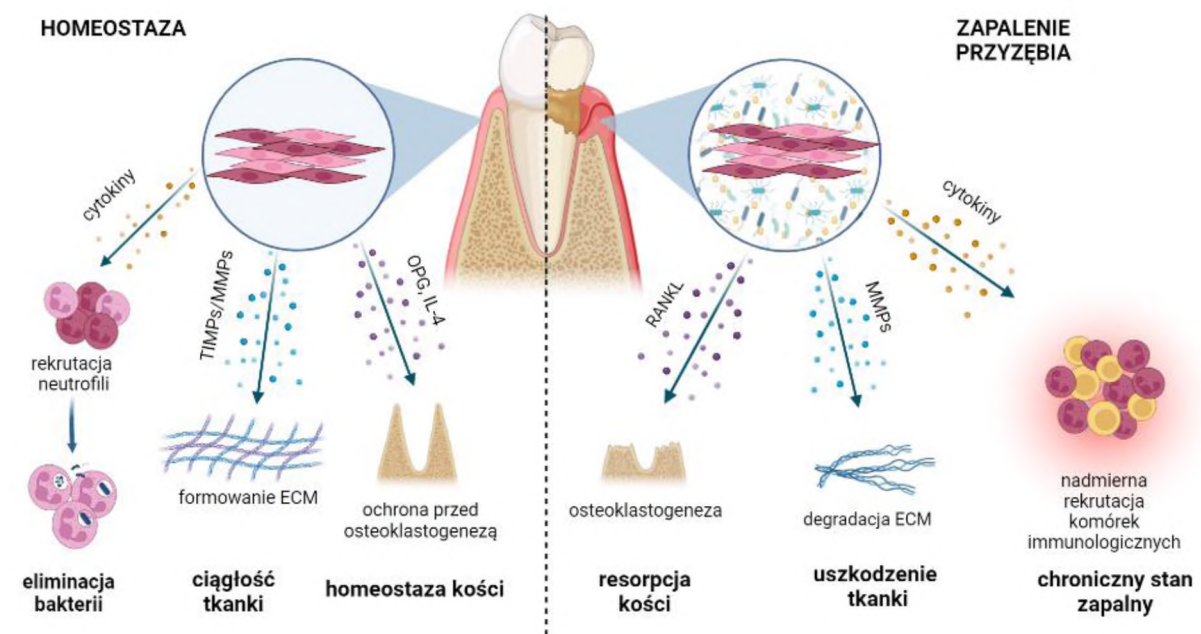
Proces internalizacji bakterii jest ważnym etapem patogenezы PZP, który prowadzi do progresji choroby. Jak zaznaczono wcześniej, wnikanie bakterii do wnętrza komórek jest sposobem na uniknięcie układu odpornościowego gospodarza, a co za tym idzie przeżycie i możliwość kolonizacji głębszych warstw tkanki przyzębia. Istnieje kilka prac pokazujących, że bakterie „czerwonego kompleksu” słabiej wnikają do GFs, niż mniej patogenne gatunki, jak np. *F. nucleatum* czy *Camphylobacter gracilis*. Wskazują jednak, że stopień inwazyjności klinicznych szczepów *P. gingivalis* jest wyższy niż szczepów laboratoryjnych (5,4% : 2%) [19]. Pokazano również, że jednoczesna infekcja GFs *P. gingivalis* i *F. nucleatum* znacznie ułatwia adhezję i internalizację kluczowego periodontopatogenu do komórek [19], [67]. Wyniki takie sugerują, że *F. nucleatum* może indukować ekspresję molekuł koniecznych do internalizacji *P. gingivalis* lub aktywować wyspy lipidowe. Tamai i in. pokazali, że internalizacja *P. gingivalis* przez GFs oraz GECs jest wzmocniona również przez *Candida albicans*. Pomimo, że rola tego patogenu w PZP nie jest poznana, jest on często izolowany z kieszonek przyzębnych. W badaniu tym pokazano, że proces internalizacji był niezależny od ICAM1 oraz integryn, natomiast zaktywowana dentyna-1 (receptor rozpoznający komponenty ściany komórkowej grzybów) oraz TLRs ulegały translokacji do wysp lipidowych, które są wymagane do wniknięcia bakterii do komórek [68]. Istnieje także szereg badań pokazujących istotną rolę czynników wirulencji *P. gingivalis* w procesie adhezji i internalizacji. W tym kontekście warto zaznaczyć, że zarówno otoczka, fimbrie oraz PPAD ułatwiają *P. gingivalis* wniknięcie do komórek [69]–[71].

Chociaż pokazano, że *P. gingivalis* i inne patogenne gatunki bakterii wnikają do GFs, to stopień ich internalizacji jest niski, wskazując tym samym, że GFs nie są głównym celem kluczowych

periodontopatogenów. Powyższe badania podkreślają też istotność mniej patogennych bakterii, tzw. bakterii pomocniczych w procesie kolonizacji tkanki przez bakterie „czerwonego kompleksu” i progresji PZP.

4.2.3 Rola GFs w innych procesach związanych z patofizjologią PZP

Tak jak wcześniej wspomniano, GFs są zaangażowane w liczne procesy, m.in. przebudowę ECM, osteoklastogenezę czy oddziaływania z innymi komórkami, co schematycznie przedstawiono na Ryc. 1.



Rycina 1. Rola GFs w warunkach homeostatycznych oraz w patogenezie PZP. Rycina zaadoptowana na podstawie Wielento A, Lagosz-Cwik KB, Potempa J, Grabiec AM. The Role of Gingival Fibroblasts in the Pathogenesis of Periodontitis. J Dent Res. 2023 May;102(5):489-496 [40], stworzona z pomocą BioRender.com.

Jak pokazało jedno z najnowszych badań, GFs są zdolne do interakcji z neutrofilami i limfocytami [48]. Ta interakcja może zachodzić bezpośrednio lub pośrednio wskutek chemotaktycznej aktywności GFs. Murakami i in. pokazali, że w obecności egzogennej IL-1 β , interakcja GFs z limfocytami miała efekt synergistyczny na produkcję IL-1 β przez GFs (Murakami 1999). Kolejne badania *in vitro* pokazały, że GFs wpływały na żywotność i retencję leukocytów oraz stymulowały proliferację populacji limfocytów T CD4+ i CD8+ [72]. W jednej z prac pokazano również, że IL-6 wydzielana przez GFs powodowała zwiększenie produkcji MMP1 przez monocyty (Sundararaj 2009). Z kolei w kokulturach GFs z PBMC, GFs mogą pośrednio wpływać na osteoklastogenezę poprzez wydzielanie cytokin [73].

Procesy związane z przebudową kości wyrostka zębodołowego są bowiem kolejnym procesem regulowanym przez GFs. W warunkach homeostatycznych, zachowana jest równowaga pomiędzy osteoprotegeryną (OPG) a RANKL (ligand aktywatora receptora NFκB), które wiążą się z RANK na powierzchni komórek prekursorowych, indukując osteogenezę (OPG) lub osteoklastogenezę (RANKL). Badania pokazują, że w warunkach fizjologicznych GFs poprzez wydzielanie OPG pełnią ochronną rolę w procesie resorpcji kości [74], [75]. Co więcej, pokazano również, że IL-4 wydzielana przez GFs może hamować proces osteoklastogenezy [76]. Dodatkowo zaobserwowano, że w kokulturach z PBMC GFs wykazywały słabszy potencjał do stymulacji tworzenia osteoklastów niż fibroblasty więzadła przyzębia (PDLFs) [77]. Natomiast w obecności periodontopatogenów GFs zwiększały stosunek RANKL/OPG, przyczyniając się do promowania osteoklastogenezy [78]. Warto dodać, że biofilm poddziąsłowy, ze względu na swój silnie wirulentny charakter, ma większy potencjał do indukcji osteoklastogenezy niż biofilm naddziąsłowy [79]. W jednym z najdokładniejszych badań określających wpływ GFs na proces formowania osteoklastów, PBMC hodowano w obecności mediów kondycjonowanych z GFs infekowanych *P. gingivalis*. Po 3 tygodniach zaobserwowano zwiększoną liczbę osteoklastów, co związane było prawdopodobnie z cytokinami stymulującymi osteoklastogenezę wydzielonymi w odpowiedzi na infekcję przez GFs [73]. Binderman i wsp. opisali z kolei ciekawy mechanizm, w którym degradacja włókien kolagenowych pobudzała GFs do wydzielania ATP. ATP z kolei wiąże się z receptorami puryn na powierzchni osteoblastów, co indukowało produkcję RANKL i osteoklastogenezę [80]. Istnieją jednak również prace pokazujące, że cytokiny lub chroniczna ekspozycja kokultur GF-PBMC na ligandy TLR2 lub TLR4 powodowały zahamowanie osteoklastogenezy [81]–[83]. Zatem wpływ GFs na proces formowania osteoklastów nie jest jednoznaczny i zależy od warunków, w jakich zostały przeprowadzone doświadczenia. Niemniej jednak istnieją mocne dowody na to, że w stanie patologicznym GFs pośrednio lub bezpośrednio mogą być zaangażowane w osteoklastogenezę.

GFs modyfikują ECM głównie poprzez produkcję MMPs i katepsyn. Pokazano, że stymulacja *Pg*-LPS powodowała zwiększenie stosunku MMP1/TIMP1 (tkankowy inhibitor metaloproteiny 1) w GFs, co w konsekwencji może przyspieszać degradację kolagenu [84]. Również *F. alocis* indukował ekspresję MMP1 w GFs [85]. Co więcej, stymulacja GFs IL-6 zwiększyła poziom MMP1 oraz katepsyn C i G, które prowadzą do aktywacji MMP1 i degradacji kolagenu [86]. W jednym z ostatnich badań zaobserwowano istotną rolę czynnika wzrostu hepatocytów (ang. *hepatocyte growth factor*; HGF) wydzielanego przez GFs w

procesie degradacji kolagenu, a użycie przeciwciał neutralizujących HGF zahamowało ten proces. Mając zatem na uwadze fakt, że duże ilości HGF wykryto w płynie kieszonkowym pacjentów, co korelowało z progresją choroby, zastosowanie terapii skierowanych przeciwko HGF mogłoby przynieść pozytywne skutki [87].

Podsumowując, przytoczone badania wskazują, jak ważną rolę w patogenezie PZP odgrywają GFs oraz sugerują, że zastosowanie terapii nakierowanych na ten typ komórek może być korzystne klinicznie.

4.3 Mechanizmy epigenetyczne w PZP

4.3.1 Mechanizmy epigenetyczne

Termin „epigenetyka” został po raz pierwszy użyty przez Conrada Waddingtona w latach 40-tych XX wieku. Wówczas epigenetykę definiował jako „dział biologii zajmujący się badaniem przyczynowych interakcji między genami i ich produktami, które powodują powstanie fenotypu” [88]. W międzyczasie pojęcie to uległo zmianom i obecnie epigenetyka określa naukę zajmującą się badaniem potencjalnie dziedzicznych zmian w ekspresji genów, u podłoża których nie leżą zmiany w sekwencji DNA [89]. Mechanizmy epigenetyczne obejmują: metylację DNA, potranslacyjne modyfikacje (PTM) histonów, re-organizację chromatyny oraz interferencję RNA przez małe niekodujące RNA [90]. PTM histonów obejmują metylację, fosforylację, acetylację, ubikwitynację, sumoilację czy rzadziej opisywane ADP-rybozylację i cytrulinację [91]. Ponieważ niniejsza praca opisuje badania dotyczące zmian w systemie acetylacji histonów oraz wzorców metylacji DNA, mechanizmom tym zostanie poświęcone najwięcej uwagi.

4.3.1.1 Acetylacja histonów

Acetylacja została po raz pierwszy opisana przez Allfrey’a w 1964 roku i dotyczyła histonów, jednak dopiero w latach 90-tych zdobyła większe zainteresowanie naukowców [92]. Niedawne badania wykazały, że powszechność występowania acetylacji białek jest porównywalna do fosforylacji [93]. Proces acetylacji jest odwracalny i jest kontrolowany przez dwie grupy enzymów – acetylotransferazy histonów (HATs) oraz deacetylazy histonów (HDACs). Acetylacja polega na przeniesieniu grupy acetylowej z acetylo-koenzymu A (acetylo-CoA) na resztę lizyny, co prowadzi do neutralizacji pozytywnego ładunku [94]. W przypadku histonów, acetylacja prowadzi do rozluźnienia struktury chromatyny, co umożliwia przyłączenie się czynników transkrypcyjnych i rozpoczęcie transkrypcji. Proces ten jest kontrolowany przez

HATs. Warto tutaj dodać, że sama acetylacja histonów nie jest wystarczająca do rozpoczęcia transkrypcji [95]. Z kolei deacetylacja prowadzi do kondensacji chromatyny przyczyniając się do zahamowania transkrypcji. Reakcja ta katalizowana jest przez HDACs. [94]. Proces acetylacji pierwotnie kojarzony był jedynie z histonami, jednak z czasem okazało się, że dotyczy również białek niehistonowych. Wiele czynników transkrypcyjnych jest acetylowanych, jak NFκB, FoxP3, EF2, GATA-1, STAT, p53 [91], [93]. Stąd w literaturze można spotkać się ze skrótami KAT/KDAC, które odnoszą się do acetylacji reszt lizyny [94]. Acetylacja reguluje takie procesy komórkowe jak: transkrypcja genów, naprawa uszkodzeń DNA, podziały komórkowe, organizacja cytoszkieletu, przekaz sygnału, procesowanie i stabilność RNA, fałdowanie białek, autofagię i metabolizm. Natomiast mechanizmy, poprzez które acetylacja wpływa na funkcje komórkowe to zmiana stabilności białka, jego aktywności enzymatycznej, lokalizacji komórkowej, współdziałanie z innymi PTM oraz kontrola oddziaływań białko-DNA i białko-białko [92], [96].

4.3.1.1.1 HDACs

HDACs na ogół działają w dużych kompleksach represorowych, a ich celem nie są jedynie histony, lecz również białka niehistonowe. W komórkach ssaków zidentyfikowano 18 HDACs, które w oparciu o budowę i zależność od kofaktora podzielono na dwie rodziny: klasyczne, Zn^{2+} -zależne, do których zaliczają się HDACs klasy I (HDAC1, 2, 3 i 8), II (HDAC4, 5, 6, 7, 9 i 10) i IV (HDAC11) oraz NAD^{+} -zależne sirtuiny obejmujące grupę 7 białek (SIRT1-7). Klasyczna rodzina HDACs zawiera enzymatyczną domenę deacetylazową. Aby móc spełniać swoje funkcje, HDACs powinny znajdować się w jądrze komórkowym, gdzie znajduje się ich główny substrat, ale niektóre z nich lokalizują się również w cytoplazmie. HDACs klasy I charakteryzują się wysoką aktywnością i zlokalizowane są głównie w jądrze komórkowym, choć istnieją badania pokazujące, że mogą lokalizować się również w wyspecjalizowanych organellach komórkowych [94], [97]. Z kolei HDAC klasy II są mniej aktywne i mogą przemieszczać się pomiędzy jądrem a cytoplazmą. HDACs w tej klasie podzielono na dwie podklasy: HDAC klasy IIa (HDAC4, 5, 7 i 9) oraz HDAC klasy IIb (HDAC6 i 10). HDAC klasy IIb różnią się od pozostałych ze względu na posiadanie dwóch domen deacetylazowych, przy czym w przypadku HDAC3 druga domena jest нефункционална [97]. HDAC11, będąca jedynym członkiem HDAC klasy IV, w zależności od typu komórek może wykazywać lokalizację jądrową, cytoplazmatyczną lub mitochondrialną, a jej ekspresja jest tkanko-zależna (np. serce, nerki, mózg czy mięśnie). Co ciekawe, HDAC11 wykazuje dużo silniejszą aktywność jako deacylaza kwasów tłuszczowych niż jako klasyczna deacetylaza [98]. Sirtuiny

różnią się od klasycznych HDACs nie tylko kofaktorem, ale wykazują też duże różnice strukturalne. Poza domeną deacetylazową, sirtuiny zawierają również domenę mono-ADP-rybozytransferazową i są zlokalizowane w jądrze komórkowym, cytoplazmie lub mitochondriach [97].

4.3.1.1.2 HDACi

HDACi znalazły szerokie zastosowanie w biologii i medycynie ze względu na ich dobrze udokumentowane właściwości przeciwnowotworowe i przeciwzapalne. Ich główny mechanizm działania związany jest z obecnością jonów Zn^{2+} , które są kofaktorem HDACs, przez co aktywność tych enzymów jest hamowana chelatorami kationów cynkowych. HDACi dzieli się na 5 klas:

- 1) pochodne kwasu hydroksmowego, np. SAHA (vorinostat), TSA (trichostatyna A), belinostat, panobinostat;
- 2) benzemidy, np. tucidinostat;
- 3) pochodne kwasów karboksylowych, np. maślan sodu (NaB);
- 4) ketony elektrofilowe;
- 5) cykliczne peptydy, w tym depsydeptydy, np. romidepsyna.

Pochodne kwasu hydroksamowego stanowią największą grupę HDACi, które są bardzo wydajne i są stosowane klinicznie. Związki te działają już w nanomolowych dawkach, podobnie jak cykliczne peptydy, które chemicznie są najbardziej złożoną grupą z wszystkich klas HDACi. Natomiast pochodne kwasów karboksylowych, poza NaB, są najslabszymi HDACi, działają dopiero w milimolowych stężeniach [99].

Amerykańska Agencja Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*, FDA) do użytku klinicznego zaakceptowała 5 HDACi: vorinostat, belinostat, romidepsynę, tucidinostat i panobiostat. Vorinostat, belinostat i panobinostat to globalne HDACi, nie wykazujące selektywności w kierunku konkretnych HDACs. Związki te zostały zatwierdzone w do leczenia skórno (vorinostat) i obwodowego chłoniaka T-komórkowego (belinostat) oraz do leczenia szpiczaka mnogiego (panobinostat) [99].

Działanie przeciwnowotworowe HDACi związane jest z procesami, które przyczynią się do zahamowania wzrostu guza. Skutkami działania HDACi zatem są: indukcja uszkodzeń DNA lub hamowanie jego naprawy, niestabilność chromatyny, produkcja ROS (reaktywne formy tlenu), zahamowanie cyklu komórkowego, apoptoza, autofagia oraz redukcja angiogenezy i migracji komórek [100].

Istnieje również wiele badań pokazujących potencjał terapeutyczny HDACi w ogólnoustrojowych chorobach zapalnych i infekcjach. Dla przykładu w zwierzęcych modelach RZS, HDACi (m.in. TSA, SAHA, MS-275, ITF2357 (givinostat)) powodowały osłabienie stanu zapalnego, zmniejszały obrzęk stawów i resorpcję kości. W modelu zapalenia wątroby SAHA i ITF2357 redukowały uszkodzenie wątroby [101]. Z kolei w mysim modelu sepsy zastosowanie vorinostatu, tubastatyny A (Tub A, HDAC6i) czy NaB powodowało zwiększenie przeżywalności myszy oraz osłabiało uszkodzenie płuc i wątroby [102]–[104]. Natomiast vorinostat, romidepsyna, tucidinostat i panobinostat są już testowane klinicznie we wskazaniach nienowotworowych, a jedne z testów dotyczą pacjentów cierpiących na AIDS. Zastosowanie SAHA jest również sprawdzane w chorobie Alzheimera, epilepsji i chorobie Crohna [99].

4.3.1.2 Metylacja DNA

Metylacja DNA zachodzi głównie na resztach cytozyny, ale modyfikacji tej ulega też adenina. Metylacji ulegają głównie dinukleotydy CpG, które w ludzkim genomie zlokalizowane są w obszarach nazywanych wyspami CpG. Są to obszary o długości około 200 pz, które występują głównie w regionach promotorowych genów. Metylacja promotorów związana jest z wyciszeniem ekspresji genów (Mohn 2008). Proces ten może również zachodzić na obrzeżach promotorów (obszary o mniejszej gęstości dinukleotydów CpG znajdujące się w odległości około 2000 pz od promotora) i tam również prowadzi do inaktywacji transkrypcji. Większość metylacji tkankowo-specyficznej związana jest właśnie z metylacją występującą na obrzeżach promotorów [105]. Co ciekawe, istnieją dowody na metylację DNA niezwiązaną z wyspami CpG w mysich i ludzkich embrionalnych komórkach macierzystych, ale zmiany te zanikają w dojrzałych tkankach [106], [107].

Metylacja DNA katalizowana jest przez enzymy z rodziny metylotransferaz DNA (DNMTs), które przenoszą grupę metylową z S-adenozylometioniny na piąty atom węgla w cytozynie, tworząc 5-metylocytozynę (5-mC). Rodzina DNMTs składa się z pięciu członków: DNMT1, DNMT2, DNMT3A, 3B i 3L. DNMT1 w kompleksie z UHRF1 (ang. *ubiquitin like with PHD and ring finger domains 1*) odpowiada za utrzymanie wzorca metylacji przepisywanego podczas replikacji na nową nić DNA, natomiast DNMT3A i 3B w kompleksie z katalitycznie nieaktywną DNMT3L odpowiadają za metylację *de novo* [108]. DNMT2 często wymieniana jest jako członek rodziny DNMTs, co wynika z jej podobieństwa strukturalnego do pozostałych białek z rodziny, ale enzym ten praktycznie nie wykazuje aktywności metylotransferazowej. Nowsze badania wykazały, że jest to metylotransferaza tRNA [109]. Demetylacja jest procesem

zachodzącym aktywnie lub pasywnie i wymagającym obecności białek TET, które katalizują utlenianie 5-mC do 5-hmC (hydroksymetylocytozyna). Demetylacja pasywna zachodzi najczęściej podczas replikacji, gdy brakuje DNMT1 albo jej aktywność jest zahamowana, lub w sytuacji, gdy z powodu oksydacji 5-mC kompleks DNMT1-UHRF1 nie rozpoznaje miejsca, które miało ulec metylacji [95]. Natomiast aktywna demetylacja wymaga obecności kolejnych białek, takich jak TGG (ang. *thymine DNA glycosylase*) i BER (ang. *base-excision repair*), których działanie prowadzi do powstania niemetylowanej cytozyny [110].

Metylacja DNA kontroluje takie procesy jak: imprinting genomowy, inaktywację chromosomu X, tkankowo-specyficzną regulację ekspresji genów, modulację struktury chromatyny czy wyciszanie elementów retrowirusowych. Co ważne, metylacja DNA w różnych regionach genomu może wywierać zróżnicowany wpływ na aktywność genów w zależności od sekwencji DNA [111].

4.3.1.2.1 DNMTi

W wielu chorobach, szczególnie nowotworach, zaburzenia we wzorach metylacji DNA są bardzo powszechne, natomiast drobnocząsteczkowe inhibitory DNMTs (DNMTi) mogą celować w te zmiany, doprowadzając do odwrócenia patologicznych zmian. DNMTi dzieli się na nukleozydowe i nienukleozydowe, które są pochodnymi związków naturalnego pochodzenia i wykazują mniejszą aktywność i selektywność niż inhibitory nukleozydowe, zaś ich aktywność jest niezależna od podziałów komórkowych. Najpowszechniejszymi nukleozydowymi DNMTi są 5-azacytydina i 5-aza-2'-deoskycytydina (decytabina), które są analogami cytydyny. Inhibitory te zostały dopuszczone przez FDA do użytku klinicznego w leczeniu zespołów mielodysplastycznych i ostrej białaczki szpikowej. Inhibitory te działają w fazie S cyklu komórkowego, kiedy dochodzi do replikacji, gdyż właśnie wtedy inhibitory te wbudowują się w nić DNA. To skutkuje nieodwracalnym wiązaniem się DNMT1 z DNA i zahamowaniem procesu metylacji, co powoduje zwiększenie ekspresji genów. Podaje się, że decytabina jest bardziej aktywna niż 5-azacytydina, gdyż ta może wiązać się również z RNA [112], [113]. Tylko 10% 5-azacytydyny jest wbudowywane w nić DNA, wykazując właściwości hipometylujące, natomiast aż do 90% jest wbudowywana w RNA. Taki mechanizm działania sprawia, że 5-azacytydina działa nie tylko w dzielących się komórkach, lecz również w fazie spoczynku, co wiąże się z większą cytotoksycznością tego związku w porównaniu do decytabiny [113].

Ze względu na ich toksyczne działanie DNMTi mają zastosowanie głównie w onkologii. Istnieją jednak prace pokazujące terapeutyczne efekty 5-azacytydyny/decytabiny w

zwierzęcych modelach ostrej niewydolności oddechowej [114], stwardnienia rozsianego [115] czy miażdżycy [116], gdzie wykazano przeciwwzajemne właściwości tych inhibitorów.

4.3.2 Mechanizmy epigenetyczne w patofizjologii PZP

4.3.2.1 Acetylacja histonów w PZP

Istnieje kilka badań pokazujących zaburzenia w systemie acetylacji w PZP. W jednym z nich wykonano analizę immunohistochemiczną dziąsła i pokazano, że ekspresja HDAC1 jest podwyższona w komórkach wykazujących ekspresję TNF, limfocytach i osteoklastach, natomiast w śródbłonku naczyń krwionośnych wykryto podwyższoną ekspresję HDAC5, 8 i 9 [117]. Natomiast jedno z najnowszych badań pokazało, że w próbkach śliny od pacjentów z PZP ekspresja *HDAC3*, *4*, *8* i *9* jest obniżona w porównaniu do osób zdrowych [118]. *In vitro* infekcja GECs *P. gingivalis* skutkowała obniżoną ekspresją *HDAC1* i *HDAC2* [119], a w PDLFs infekcja *T. denticola* obniżyła ekspresję *HDAC4*, *HDAC6* i *HDAC10* należących do HDACs klasy II [120]. Przeprowadzone badania na myszach pokazujące wzrost poziomu acetylacji H3K9 w GECs wskutek infekcji periodontopatogenami (*P. gingivalis*, *F. nucleatum*) lub stymulacji *Pg*-LPS generalnie są spójne z opisanymi wynikami. Warto jednak zaznaczyć, że w badaniu tym nie określono roli HDACs, a obserwowany wzrost acetylacji przypisywano aktywacji białek należących do rodziny HATs [121]. Z kolei w swojej pracy magisterskiej opisywałam doświadczenia, które pokazały, że infekcja GF *P. gingivalis* powoduje istotne podwyższenie ekspresji *HADC1*, *4* i *9* oraz obniżenie ekspresji HDAC11. Stymulacja komórek TNF lub IL1- β skutkowała natomiast podwyższeniem ekspresji *HDAC1*, *2*, *6* oraz *9* [122]. Przytoczone przykłady wskazują zatem na złożoność regulacji ekspresji i aktywności HDAC w zależności od typu komórek oraz warunków doświadczenia.

4.3.2.1.1 Zastosowanie HDACi w PZP

Ponieważ HDACi wykazują właściwości przeciwwzajemnie oraz działają ochronnie na resorpcję kości, ich potencjał przetestowano również w PZP. W modelach *in vitro* w PDLFs zastosowanie TSA i apicydyny powodowało obniżenie poziomu MMP2 indukowanego infekcją *T. denticola* [120]. Komórki te były też podatne na działanie TSA i maślanu sodu (NaB). Inhibicja HDAC powodowała bowiem zwiększenie poziomu ekspresji markerów osteoblastów, takich jak *RUNX2*, oraz indukowała różnicowanie w kierunku osteoblastów [123], [124]. Dodatkowo, zastosowanie NaB hamowało ekspresję TNF i IL-1 β indukowanych przez LPS oraz obniżało produkcję ROS w PDLFs [124]. W mysim modelu PZP wykorzystano inhibitor HDAC klasy I i II, 1179.4b, który powodował znaczną redukcję stopnia resorpcji kości, jednak nie odnotowano zmniejszenia intensywności stanu zapalnego [125]. Z kolei traktowanie szczurów

TSA wykazywało szersze działanie, gdyż TSA poza poprawą stanu kości poprzez indukcję różnicowania mezenchymalnych komórek macierzystych w osteoblasty, osłabiał także stan zapalny [126].

4.3.2.2 Metylacja DNA w PZP

Ponieważ metylacja DNA jest jednym z najczęściej badanych mechanizmów epigenetycznych, istnieje dużo więcej badań opisujących zaburzenia tego procesu w patogenezie PZP. Badania dotyczące metylacji prowadzono na kilku poziomach, porównując zmiany na promotorach genów, zmiany w ekspresji białek regulujących poziom metylacji oraz określając poziom całkowitej 5-mC.

Badania mające na celu porównanie poziomu ekspresji enzymów kontrolujących metylację w próbkach tkanek pobranych od zdrowych dawców i pacjentów nie wykazały istotnych zmian w ekspresji *DNMT1* oraz *DNMT3a* pomiędzy próbkami [127], [128], co wiązało się również z brakiem różnic w poziomie globalnej metylacji DNA [128]. W próbkach od pacjentów wykryto natomiast zwiększoną ilość komórek wykazujących ekspresję białka TET-2, jednak był to efekt specyficzny komórkowo, gdyż analiza qPCR wykonana z całej próbki dziąsła nie wykazała różnic w poziomie transkryptu *TET-2* [128]. Zbadano także poziom ekspresji DNMTs w komórkach strukturalnych dziąsła. W GECs infekcja *P. gingivalis* lub *F. nucleatum* obniżała ekspresję *DNMT1* [119]. Podobny efekt, lecz wywołany stymulacją *Pg*-LPS zaobserwowano w PDLFs [129]. W przypadku GFs zmiany w ekspresji DNMTs były obserwowane po stymulacji czynnikami zapalnymi – IL-1 β oraz PGE2 [130]. GFs traktowane IL-1 β wykazywały podwyższoną ekspresję *DNMT1* oraz obniżoną ekspresję *DNMT3a* i *TET-1*, natomiast PGE2 powodowała obniżenie ekspresji wszystkich enzymów. Zaobserwowano również, że zarówno IL-1 β , jak i PGE2 podnosiły poziom globalnej metylacji w GFs [130].

Najwięcej badań dotyczy jednak lokalnych zmian na promotorach poszczególnych genów, zwłaszcza związanych z odpowiedzią immunologiczną, jak cytokiny czy chemokiny, genów związanych z przebudową ECM oraz promotorów genów zaangażowanych w aktywację zapalną, jak receptory PAMPs (ang. *pathogen-associated molecular patterns*; wzorce molekularne związane z patogenami) (np. TLR2, TLR4) czy czynniki transkrypcyjne (np. STAT). Dużo badań opisuje analizy porównawcze profili metylacji DNA pomiędzy pacjentami z PZP a osobami zdrowymi, którym pobrano próbki krwi, tkanek dziąsła oraz poszczególne typy komórek strukturalnych dziąsła. W jednym z badań porównującym profil metylacji DNA pomiędzy tkankami pobranymi od pacjentów z PZP a osób zdrowych wykonano wysokoprzepustową analizę zmian w profilu metylacji DNA promotorów genów związanych z

odpowiedzią immunologiczną oraz cyklem komórkowym. Analiza wykazała, że średni poziom metylacji był niższy w grupie genów związanych z odpowiedzią immunologiczną, co było negatywnie skorelowane z ekspresją genów w tej grupie. W badaniu tym nie wyszczególniono jednak konkretnych genów [131]. W innych pracach pokazano, że promotory cytokin prozapalnych *IL6* [132] i *TNF* [133] oraz chemokin *CXCL3*, *CXCL5* i *CXCL10* [132] ulegają hipermetylacji w dziąsłach pobranych od pacjentów z PZP. Z kolei genami, których promotory wykazują obniżony poziom metylacji w PZP są *IFNG* [134] i *IL8* [132]. De Faria Amormino i wsp. pokazali, że w dziąsłach osób z PZP poziom metylacji promotora *TLR2* jest podwyższony, a ekspresja genu obniżona [135]. W innym badaniu sprawdzającym poziom metylacji promotorów *TLRs*, zaobserwowano niski poziom metylacji promotora *TLR4*, który nie różnił się pomiędzy próbkami od pacjentów i zdrowych dawców. Z kolei promotor *TLR2* był częściowo zmetylowany, wykazując trend w kierunku podwyższonej metylacji w tkankach pobranych od pacjentów [136]. Chociaż nie wszystkie te zmiany były potwierdzone przez inne zespoły badawcze, to istnieje zgodność pomiędzy badaniami pokazującymi hipometylację *STAT5* i hipermetylację *PTGS2* [95].

Zmiany w profilu metylacji w PZP nie ograniczają się jedynie do miejsca toczącego się stanu zapalnego. Odnotowano bowiem zmiany w statusie metylacji DNA tych samych genów w próbkach krwi od pacjentów, które były pokazane także dla dziąsła. Podobnie jak w tkance dziąsła, poziom metylacji promotora *TNF* był podniesiony we krwi [137], natomiast w przypadku *IL6* zaobserwowano hipometylację promotora we krwi [138], podczas gdy w tkance promotor *IL6* ulega silnej metylacji [132]. Wyniki te zostały potwierdzone w niezależnym badaniu pokazującym, że metylacja *IL6* jest znacznie wyższa we krwi niż w tkance dziąsła. Co ważne, badanie to pokazało także, że poziom metylacji *IL6* w dziąśle wykazuje negatywną korelację z głębokością sondowania kieszonki przyzębnej (ang. *periodontal probing depth*, PPD) [139], natomiast w przypadku promotora *TLR2* zaobserwowano pozytywną korelację z PPD [135]. Jednak nie zaobserwowano zależności pomiędzy metylacją promotora a kliniczną utratą przyczepu łącznotkankowego (ang. *clinical attachment loss*; CAL) czy wskaźnikiem krwawienia podczas zgłębnikowania kieszonki przyzębnej (ang. *bleeding on probing*; BOP) [135], [139]. Prace te pokazują zatem, że zmiany w statusie metylacji są powiązane z niektórymi parametrami klinicznymi w PZP.

Poza badaniami pokazującymi zmiany w metylacji DNA w całej tkance, istnieją też prace, gdzie sprawdzano, w jaki sposób infekcja lub stymulacja mediatorami stanu zapalnego wpływa na zaburzenia wzorców metylacji w poszczególnych typach komórek strukturalnych dziąsła.

Benakanakere i wsp. zaobserwowali, że niektóre spośród analizowanych linii GECs pochodzących od pacjentów z PZP słabo odpowiadają na infekcję *P. gingivalis*, co było związane z niską ekspresją *TLR2* i zwiększonym poziomem metylacji wysp CpG w promotorze tego genu. W celu sprawdzenia czy infekcja *P. gingivalis* zmienia poziom metylacji w zdrowych GECs, został zastosowany model chronicznej infekcji. Chroniczna ekspozycja GECs na *P. gingivalis* skutkowała hipermetylacją promotora *TLR2*, co potwierdzono także *in vivo* w mysim modelu PZP [140]. Dodatkowo, pokazano, że *P. gingivalis* powodował uszkodzenie bariery nabłonkowej poprzez hipermetylację promotorów i obniżenie ekspresji genów kodujących komponenty kompleksów połączeń międzykomórkowych [141]. Natomiast chroniczna ekspozycja PDLFs na *Pg-LPS* skutkowała podwyższeniem poziomu metylacji genów związanych z ECM, m.in. *COL4A1-A2*, *COL12A1*, *COL15A1*, *MMP25* czy *FANK1*, co było związane z obniżoną ekspresją tych genów [142]. Z kolei w GFs stymulowanych IL-1 β lub PGE2 zaobserwowano zmiany metylacji w promotorach *IL8*, *TNFRSF-10C*, *MMP13* i *CD40* [130].

Podsumowując, poziom metylacji wysp CpG w promotorach poszczególnych genów w tkance sprawdzany był przez różne zespoły, ale części wyników nie udało się potwierdzić niezależnymi badaniami. Przyczyn takich rozbieżności może być kilka, m. in. metoda, której użyto do wykrycia zmian, techniczne aspekty zbierania materiału do badań, różnice w klasyfikacji pacjentów oraz heterogenność tkanki [95]. Warto podkreślić również, że jeżeli zmiany w profilu metylacji obserwowane są w jednym typie komórek, to na poziomie globalnym zmiana może być niewykrywalna, ze względu na maskujący efekt pozostałych komórek. Biorąc pod uwagę wszystkie wymienione czynniki, wykrycie globalnych zmian metylacji DNA na poziomie tkanki jest dużym wyzwaniem od strony technicznej, zaś wyniki takich często nie znajdują bezpośredniego przełożenia na procesy biologiczne.

4.3.2.2.1 Zastosowanie DNMTi w PZP

Potencjał terapeutyczny inhibitorów DNMTs sprawdzano głównie w modelach *in vitro*, natomiast mało jest danych badających zastosowanie DNMTi w modelach zwierzęcych. Pre-inkubacja GECs z 5-azacytydyną lub decytabiną obniżała indukowany przez *P. gingivalis* poziom produkcji IL-6 oraz CXCL1. Podobny efekt zaobserwowano również w przypadku infekcji *F. nucleatum* dla 5-azacytydyny, ale nie decytabiny. Inhibicja DNMTs skutkowała także zwiększeniem ekspresji IL-1 α i TNF [143] oraz CCL20 i hBD2 [119] w GECs infekowanych *P. gingivalis*. Z kolei zastosowanie nie-nukleozydowych inhibitorów DNMTs (kurkumina, RG108, EGCG) w GECs odwracało niekorzystne skutki infekcji *P. gingivalis*, powodując

przywrócenie ciągłości nabłonka [141]. Pozytywne działanie DNMTi w kontekście patogenezy PZP pokazano także dla GFs – 4-dniowa pre-inkubacja komórek z 5-azacytydyną powodowała obniżenie indukowaną infekcją *T. denticola* ekspresję MMP2 [120]. Natomiast Cho i wsp. zaobserwowali, że GFs pre-inkubowane przez 24h z 5-azacytydyną wykazywały podwyższoną ekspresję genów związanych z osteogenezą (*RUNX2* i *ALP*), co było związane z obniżonym poziomem metylacji promotorów tych genów. Późniejsza kilkukrotna inkubacja GFs z BMP2 (ang. *bone morphogenic protein 2*; białko morfogenetyczne kości 2) powodowała różnicowanie GFs w funkcjonalne osteoblasty, co daje obiecujące efekty w kontekście terapii skierowanych na regenerację kości w PZP, tym bardziej, że efekt ten potwierdzono także *in vivo* [144]. Zastosowanie decytabiny miało również ochronny wpływ na resorpcję kości wyrostka zębodołowego – decytabina po pięciu dniach codziennego podawania myszom hamowała osteoklastogenezę, a w modelu komórkowym obniżała liczbę komórek wykazujących ekspresję winiano-opornej kwaśnej fosfatazy (TRAP). Dodatkowo, decytabina *in vitro* zwiększała potencjał kościotwórczy komórek prekursorowych osteoblastów, jak również podwyższała poziom ekspresji genów kodujących cytokiny przeciwzapalne IL10 oraz TGFβ1 w monocytach CD14+ (prekursory osteoklastów) [145].

5 Cele pracy

Oddziaływania pomiędzy komórkami strukturalnymi przyzębia a patogenami jamy ustnej odgrywają ważną rolę w rozwoju PZP. Jedną z najliczniejszych grup komórek dziąsła są GFs, które pod wpływem aktywacji mogą wykazywać funkcje immunologiczne. Literatura podaje również, że komórki te wykazują zjawisko „pamięci immunologicznej”, której podłoże często związane jest ze zmianami epigenetycznymi. Ostatnie doniesienia wskazują natomiast, że celowanie w mechanizmy epigenetyczne może odwrócić patologiczne zmiany obserwowane w PZP, przede wszystkim ze względu na przeciwwzapalne działania niektórych klas leków epigenetycznych. Ponieważ tradycyjne leczenie PZP, polegające na mechanicznym usunięciu płytki nazębnej, jest niewystarczające w przypadku wielu pacjentów, zastosowanie terapii pomocniczej skierowanej na procesy epigenetyczne wydaje się być obiecujące w kontekście trwałego przywrócenia równowagi mikrobiologicznej w tkance przyzębia i złagodzenia stanu zapalnego. W związku z powyższym w niniejsza praca miała na celu:

1. Zbadanie roli acetylacji histonów w aktywacji zapalnej GFs poprzez farmakologiczną i genetyczną modulację ekspresji HDACs
2. Określenie wpływu metylacji DNA na funkcje biologiczne i aktywację zapalną GFs za pomocą farmakologicznej modulacji ekspresji DNMTs
3. Zbadanie długofalowego efektu infekcji *P. gingivalis* na aktywację zapalną GFs oraz określenie roli mechanizmów epigenetycznych związanych z metylacją DNA w tym procesie

6 Materiały

6.1 Hodowle komórkowe

Odczynniki/naczynia/sprzęt laboratoryjny	Producent
DMEM, medium do hodowli PHGFs	Lonza
FBS, bydlęca surowica płodowa	Biowest
Gentamycyna	Gibco
Penicylina/streptomycyna	Gibco
Metronidazol	Sigma Aldrich
PBS 10x, roztwór soli fizjologicznej bez jonów Mg^{2+} i Ca^{2+}	Thermo Scientific
Roztwór trypsyny z EDTA	Biowest
Błękit trypanu	Merck Millipore
Komora do liczenia komórek	Bio-Rad
Automatyczny licznik komórek	Bio-Rad
TNF, IL-1 β , 50 μ g/ml	InvivoGen
Cykloheksymid, CHX	Cell Signaling Technology
Opti-MEM I Reduced Serum Medium	Thermo Scientific
Dharmafect, odczynnik do transfekcji	Dharmacon
siRNA: scrb, siHDAC1, siHDAC3	Dharmacon
HEPES	BioShop
Chlorek magnezu ($MgCl_2$)	Asisstant
Chlorek potasu (KCl)	Euroclone
Butelki do hodowli komórkowych T75, szalki hodowlane (10 cm), płytki	Thermo Scientific
Komora laminarna Safeflow 1.2	Thermo Scientific
Inkubatory do hodowli komórkowych: HeraCell 150, HeraCell 150i	Hund Wetzlar
Wirówka Heraeus Multifuge X1R	Eppendorf
Mikroskop odwrócony	Leica

6.2 Wykaz użytych inhibitorów

Inhibitor	Oznaczenie w pracy	Specyficzność	Producent
Vorinostat	SAHA	pan-HDACi	Abcam
MS-275	MS-275	HDACs klasy I	Italfarmaco
Givinostat	ITF2357	pan-HDACi	
ITF3307	HDAC3/6i	HDAC3, HDCA6	
ITF3107	HDAC6(a)i	HDAC6	
ITF3926	HDAC6(b)i	HDAC6	
ITF3056	HDAC8i	HDAC8	
5-aza-2'-deoksycytydina	Decytabina; Dec	DNMT1	TargetMol

5-azacytydina	5-Aza	DNMT1	
6-tioguanina	6-TG	DNMT	

6.3 Hodowle bateryjne

Odczynniki/naczynia/sprzęt laboratoryjny	Producent
<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277	American Type Culture Collection
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC10953	American Type Culture Collection
Agar	BioShop
Wyciąg mózgowo-sercowy	Becton Dickinson
Ekstrakt drożdżowy	BioShop
Hemina	Sigma-Aldrich
L-cysteina	BioShop
Witamina K	Sigma-Aldrich
Etanol, roztwór 96%	POCh
Wodorotlenek potasu (KOH)	POCh
Krew barania	Pro Animal
GasPak	Thermo Scientific
Komora do hodowli beztlenowych Withley A85	Don Whitley Scientific
Komora laminarna Mars Safety Class2	Scanlaf
Spektrofotometr BioPhotometer D30	Eppendorf
Cell Density Meter	Biochrom

6.4 Analiza qPCR

Odczynniki/naczynia/sprzęt laboratoryjny	Producent
Zestaw do izolacji RNA, ExtractMe	Blirt
Zestaw do izolacji RNA, RNeasy Mini Kit	Qiagen
Zestaw do odwrotnej transkrypcji, <i>High Capacity cDNA reverse transcription kit</i>	Applied Biosystems
Polimeraza PowerUp SYBR Green Master Mix	Applied Biosystems
Startery sensowne, antysensowne	Genomed, Thermo Scientific
Woda wolna od RNAz	BioShop
Płytki 96-dołkowe do reakcji PCR	Bio-Rad
Folie na płytki 96-dołkowe	Bio-Rad
Spektrofotometr NanoDrop 1000	Thermo Scientific
Termocykler TProfessional TRIO	Biometra
Termocykler do reakcji PCR w czasie rzeczywistym CFX96 Touch	Bio-Rad
Płytki 96-dołkowe do reakcji PCR	Bio-Rad
Spektrofotometr BioPhotometer D30	Eppendorf
Wirówka Centrifuge 5424R	Eppendorf

W poniżej tabeli zebrano sekwencje starterów użytych w niniejszej pracy.

Gen	Sekwencja startera sensownego	Sekwencja startera antysensownego
RPLP0	GCGTCCTCGTGGAAGTGACATCG	TCAGGGATTGCCACGCAGGG
HDAC1	CGAATCCGCATGACTCATAA	CATCTCCTCAGCATTGGCTT
HDAC3	GATGGCATTGATGACCAGAG	GATCACAGCCCAGAGAGTCA
DNMT1	AAGACAAAGACCAGGATGAGAAG	GGGTGTTGGTTCTTTGGTTTG
DNMT3A	TATTGATGAGCGCACAAAGAGAGC	GGGTGTTCCAGGGTAACATTGAG
DNMT3B	CCATTCGAGTCCTGTCATTG	GCAATGGACTCCTCACACAC
IL-1B	ACAGATGAAGTGCTCCTTCCA	GTCGGAGATTTCGTAGCTGGAT
IL-6	GACAGCCACTCACCTCTTCA	CCTCTTTGCTGCTTTCACAC
IL-8	GCTCTGTGTGAAGGTGCAGT	CCAGACAGAGCTCTCTTCCA
COX2	AGCCCTTCCTCCTGTGCCT	AATCAGGAAGCTGCTTTTTACCT
CCL2	TCTGTGCCTGCTGCTCATAG	GGGCATTGATTGCATCTGGC
CCL5	ATCCTCATTGCTACTGCCCTC	GCCACTGGTGTAGAAATACTCC
CCL20	AAGAGTTTGCTCCTGGCTGCTT	GCAGTCAAAGTTGCTTGCTGCT
CXCL10	TGAAATTATTCTGCAAGCCAA	CAGACATCTCTTCTCACCTTCTTT
MMP1	GGGAGATCATCGGACAACCTC	GGGCCTGGTTGAAAAGCAT
MMP3	GAGGACACCAGCATGAACCT	CACCTCCAGAGTGTCGGAGT
MMP9	CCTGGAGACCTGAGAACCAAT	GCCACCCGAGTGTAACCATAG
MMP13	AAGGAGCATGGCGACTTCT	TGGCCCAGGAGGAAAAGC
ICAM1	CCTTCCTCACCGTGTACTGG	AGCGTAGGGTAAGGTTCTTGC
TG2	CTGAGCACCAAGTACGATGC	GGACCCCTCTGGGTATTTGT
ITGB1	TGCGAGTGTGGTGTCTGTAA	AGGCTCTGCACTGAACACAT
RELA	TCTGCTTCCAGGTGACAGTG	ATCTTGAGCTCGGCAGTGTT

6.5 ELISA

W niniejszej pracy za pomocą testu ELISA określono poziom IL-6, IL-8, CCL2, CCL, CXCL10 (BioLegend) oraz CCL20 i MMP1 (R&D Systems). Do pomiaru absorbancji użyto czytnika mikropłytek FlexStation3 Multi-Mode Reader (Molecular Devices).

6.6 Western blot

Odczynniki/naczynia/sprzęt laboratoryjny	Producent
SDS (laurylosiarczan sodu)	BioShop
Glicerol	POCh
Tris	BioShop
β -merkaptoetanol	BioShop
Błękit bromofenolowy	Sigma Aldrich
Akrylamid	BioShop
Nadsiarczan amonu (APS)	BioShop
TEMED	BioShop

Glicyna	BioShop
Metanol	POCh
Chlorek sodu (NaCl)	POCh
Tween20	BioShop
Marker Precision Plus Protein Dual Color Standards	Bio-Rad
Statyw i szkiełka do wylewania żeli wraz z grzebieniami	Bio-Rad
Zestaw do elektroforezy	Bio-Rad
Odtłuszczone mleko w proszku	BioShop
Zestaw do transferu (membrany PVDF, bibułki, bufor)	Bio-Rad
Aparat do transferu – Trans-blot Turbo	Bio-Rad
Bufor do stripowania	Thermo Scientific
Substrat ECL	Bio-Rad
Kołyska Mini Rocker-Shaker	Grant-bio
Wytrząsarka rolkowa	Star Lab
Aparat do obrazowania żeli i detekcji chemiluminescencji – ChemiDoc MP Imaging System	Bio-Rad
Wirówka	Eppendorf

W poniższych tabelach zebrano przeciwciała I- i II-rzędowe używane do analizy western blot.

Antygen	Specyficzność	Producent
HDAC3	przeciwciało królicze anty-HDAC3	Cell Signaling Technology
AcH3	przeciwciało królicze anty-acetylowany histon H3 (Lys9/Lys14)	
AcTub	przeciwciało królicze anty-acetylowana tubulina	
p-p38	przeciwciało królicze anty-fosfo-p38	
p-ERK	przeciwciało królicze anty- fosfo-ERK	
p-p65	przeciwciało królicze anty- fosfo-p65	
IκBα	przeciwciało królicze anty- IκBα	
ICAM1	przeciwciało królicze anty- ICAM1	
β-aktyna	przeciwciało królicze anty- β-aktyna	
β-tubulina	przeciwciało mysie anty-β-tubulina	Sigma Aldrich

Specyficzność	Koniugant	Producent
Przeciwciała gęsie anty-królicze	Peroksydaza chrzanowa (HRP)	Dako
Przeciwciała gęsie anty-mysie		

6.7 Analiza cytometryczna

Odczynniki/naczynia/sprzęt laboratoryjny	Producent
Brefeldyna A	Abcam
Przeciwciało anti- IL-6 wyznakowane Alexa 647	BioLegend
Intracellular Staining Permeabilization Wash Buffer (10x)	BioLegend
Formaldehyd	POCH
CFSE	Life Technologies
Aneksyna V-APC	BD Biosciences
FACSCalibur	BD Biosciences
Fortessa	BD Biosciences

6.8 Ocena proliferacji i żywotności komórek

Do zbadania proliferacji użyto zestawu na inkorporację BrdU - Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) kit (Roche), natomiast stopnia żywotności komórek dodano za pomocą zestawów po pomiaru LDH (Roche) oraz Cell Death ELISA Kit (Roche). Aborbancję odczytywano za pomocą czytnika mikroplótek FlexStation3 Multi-Mode Reader (Molecular Devices).

6.9 Pomiar globalnej metylacji

Do izolacji DNA użyto zestawu DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen), natomiast do pomiaru globalnej metylacji DNA użyto zestawu Global DNA Methylation LINE-1 Kit (Active Motif).

6.10 Wykaz używanych programów

Oprogramowanie	Analiza
Microsoft Excel	Obróbka danych i analiza wyników
GraphPad Prism 8	Prezentacja wyników i analiza statystyczna
Bio-Rad CFX Manager 3.0	Analiza wyników qPCR
Image Lab 5.2	Analiza Western blot, densytometria
FlowJo	Analiza danych z cytometrii przepływowej
BioRender.com	Wykonanie rysunków (Ryc. 1 i 33)
Mendeley 1.19	Przygotowanie bibliografii

6.11 Skład buforów

Bufor	Skład
Bufor do siRNA	300 mM KCl; 1 mM MgCl ₂ ; 30 mM HEPES pH 7,5
Bufor Laemmli'ego	10% glicerol; 0,125 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, woda destylowana
Bufor obciążający do próbek do elektroforezy SDS-PAGE	0,5 % SDS; 50% glicerol; 10% β-merkaptoetanol; 250 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,05% błękit bromofenolowy; woda destylowana
Bufor do elektroforezy SDS-PAGE	192 mM glicyna; 25 mM Tris; 1% SDS; woda destylowana
TBS-Tween20 0,1% (TBS-T)	150 mM NaCl; 100 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,2% Tween20; woda destylowana
PBS-Tween20 0,05% (PBS-T)	10x stęż. PBS, woda, 0,05% Tween20

7 Metody

Opis metod podzielono na ogólne, które wykorzystywano w każdej części pracy oraz na metody, które były wykorzystywane wyłącznie w poszczególnych częściach pracy.

7.1 Metody ogólne

7.1.1 Hodowle komórkowe

7.1.1.1 Izolacja GFs

Pierwotne ludzkie GFs izolowano z próbek tkanki dziąsła zapewnionych dzięki współpracy z Instytutem Stomatologii *Collegium Medicum* UJ. Próbki od zdrowych dawców i pacjentów z PZP pobrano za zgodą Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego. Wszyscy dawcy, od których pobierano próbki wyrazili pisemną zgodę na udział w badaniu.

Skrawki dziąsła do momentu odebrania przez członków zespołu były przetrzymywane w 4°C. Pierwszego dnia, próbki dokładnie przepłukiwano roztworem PBS zawierającym antybiotyki (penicylina/streptomycyna (100 U/ml) i gentamycyna (100 U/ml)) oraz nystatynę (6 µg/ml). Następnie próbki umieszczano w roztworze dyspazy (7 mg/ml) i inkubowano przez ok. 20-24h w temperaturze 4°C. Kolejnego dnia próbki ponownie przepłukiwano roztworem PBS zawierającym antybiotyki i nystatynę, po czym oddzielano tkankę łączną zawierającą GFs od nabłonka. Tkanekę łączną następnie umieszczano w roztworze kolagenazy (1 mg/ml) i inkubowano do kolejnego dnia w inkubatorze komórkowym (w temperaturze 37°C i 5% CO₂ w atmosferze). Trzeciego dnia procedury izolacji, strawioną tkankę łączną wirowano (10 min, 300 x g, przed wirowaniem wstrząsając probówką), przepłukiwano roztworem PBS zawierającym antybiotyki i nystatynę i ponownie wirowano (10 min, 300 x g), po czym zawieszano w 10 ml pożywki DMEM zawierającej penicylinę/streptomycynę (100 U/ml), gentamycynę (100 U/ml) oraz nystatynę (6 µg/ml) i wysiewano na butelki T-75. GFs hodowano przez 12-18 dni, do momentu osiągnięcia co najmniej 70% konfluencji, po czym komórki rozsiewano na 3 butelki i hodowano do pełnej konfluencji, a następnie bankowano.

7.1.1.2 Izolacja PDLFs

Pierwotne ludzkie PDLFs izolowano z zębów zgodnie z protokołem zawartym w [146]. Materiał zbierano na Oddziale Chirurgii Stomatologicznej i Szczękowo-Twarzowej w szpitalu OLVG w Amsterdamie (Holandia). Komórki do badań zostały udostępnione dzięki uprzejmości dr Teuna de Vriesa, z którym nawiązano współpracę w trakcie trwania projektu.

7.1.1.3 Hodowla komórek

GFs i PDLFs hodowano w pożywce DMEM zawierającej 10% FBS oraz penicylinę/streptomycynę (50 U/ml) i gentamycynę (50 U/ml). Hodowle komórkowe prowadzono na butelkach T-75 w inkubatorze w temperaturze 37°C i w atmosferze zawierającej 5% CO₂. Komórki przesiewano co 1–2 tygodnie, gdy osiągnęły konfluencję co najmniej 80%. Do eksperymentów używano komórek pomiędzy 4 a 9 pasażem.

7.1.2 Hodowle bakteryjne

Hodowlę *P. gingivalis* (szczep ATCC33277) oraz *F. nucleatum* (szczep ATCC10953) hodowano w warunkach beztlenowych w temperaturze 37°C na podłożu stałym zawierającym BHI, ekstrakt drożdżowy, 5% krew barania, L-cysteinę (0,5 mg/ml), heminę (10 µg/ml) i witaminę K (0,5 µg/ml). Bakterie przesiewano raz w tygodniu i hodowano maksymalnie do piątego pasażu.

7.1.3 Przygotowanie bakterii do infekcji

W celu przygotowania bakterii do infekcji, bakterie inokulowano w 10 ml pożywki płynnej BHI zawierającej L-cysteinę (0,5 mg/ml), heminę (10 µg/ml) oraz witaminę K (0,5 µg/ml) (skład Tab. X) i hodowano przez ok. 20h. Hodowlę płynną prowadzono w komorze beztlenowej Whitley A85 w probówkach typu *falcon* przy lekko odkręconych zakrętkach. Kolejnego dnia za pomocą spektrofotometru BioPhotometer D30 mierzono gęstość optyczną zawiesiny bakteryjnej przy długości fali $\lambda=600$ nm (OD₆₀₀) i zakładano hodowlę o OD₆₀₀=0,1. Po kolejnych 20h bakterie wirowano (5 000 x g, 15 min, 4°C) oraz przepłukiwano zimnym roztworem PBS i ponownie wirowano w tych samych warunkach. Następnie osad bakteryjny zawieszano w 3-5 ml zimnego roztworu PBS i mierzono OD₆₀₀. Bakterie rozcieńczano w taki sposób, aby otrzymać zawiesiny o OD₆₀₀=1. Dla *P. gingivalis* OD₆₀₀=1 odpowiada 10⁹ bakterii w 1 ml, a dla *F. nucleatum* – 5x10⁸/ml.

7.1.4 Analiza ekspresji genów

W celu analizy ekspresji genów za pomocą metody qPCR komórki wysiewano na płytkach 12-dółkowych w ilości 150-250 tys./ dółek w pożywce DMEM pozbawionej antybiotyków i zawierającej 2% FBS. Kolejnego dnia pożywkę wymieniano na świeżą, a komórki poddawano stymulacji/infekcji przez określony czas, w zależności od eksperymentu.

7.1.4.1 Izolacja RNA

Po zakończonej stymulacji ściągano pożywkę z nacieków komórek, a dołki przepłukiwano roztworem PBS. Komórki lizowano w 350 µl buforu lizującego dołączonego do zestawu do izolacji RNA

(ExtractMe). Izolację przeprowadzano na kolumnkach wg zaleceń producenta. RNA wmywano w 30 μ l buforu elucyjnego. Stężenie RNA w próbkach mierzono za pomocą spektrofotometru BioPhotometer D30. Otrzymane próbki przechowywano w temperaturze - 80°C.

7.1.4.2 Reakcja odwrotnej transkrypcji

Do reakcji odwrotnej transkrypcji używano zestawu High Capacity cDNA reverse transcription kit. Do reakcji używano 200 – 1000 ng RNA i rozcieńczano wodą wolną od RNaz do objętości 10 μ l oraz 10 μ l 2-krotnie stężonej mieszaniny reakcyjnej przygotowanej wg poniższych proporcji:

odczynnik	objętość/reakcję
10x stęż. bufor do reakcji	2 μ l
25x stęż. mieszanina dNTP	0,8 μ l
10x stęż. przypadkowe startery	2 μ l
odwrotna transkryptaza MultiScribe	1 μ l
woda wolna od RNaz	4,2 μ l

Natomiast reakcję prowadzono przy użyciu termocyklera TProfessional TRIO w następujących warunkach:

etap	temperatura	czas
przyłączanie starterów	25°C	10 min
polimeryzacja DNA	37°C	120 min
denaturacja enzymu	85°C	5 min

Gotowe próbki cDNA rozcieńczano wodą wolną od RNaz w proporcji 180 μ l wody/ 20 μ l próbki, gdy ilość RNA użytego do syntezy cDNA wynosiła 1000 ng. Przy niższych ilościach RNA, próbki rozcieńczano w odpowiednio mniejszej objętości wody.

7.1.4.3 Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. *quantitative polymerase chain reaction*; qPCR w czasie rzeczywistym)

Reakcję qPCR przeprowadzano na płytках 96-dółkowych, gdzie na jedną reakcję przypadało 4 μ l rozcieńczonego cDNA, 5 μ l PowerUp SYBR Green Master Mix i po 0,5 μ l starterów sensownych i antysensownych (sekwencje starterów zamieszczono w Tabeli X). Reakcję qPCR przeprowadzano w warunkach opisanych w Tabeli X przy użyciu termocyklera CFX96 Touch.

czas	temperatura
2 min	50°C
2min	95°C
15 sek	95°C
1 min	60°C
5 sek	65°C

x 40

Otrzymane wartości Ct normalizowano do wartości Ct genu referencyjnego RPLP0 i analizowano względem kalibratora wykorzystując metodę $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

7.1.5 Analiza ilości wydzielonych mediatorów zapalnych za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA

Do testu ELISA, określającego ilość wydzielonych mediatorów stanu zapalnego do pożywki komórki wysiewano w ilości 25 tys./dołek na płytkach 96-dołkowych w pożywce bez antybiotyków zawierającej 2% FBS. Kolejnego dnia pożywkę wymieniano na świeżą, a komórki poddawano odpowiedniej stymulacji, w zależności od doświadczenia. Po 24h zbierano pożywkę z nad komórek i przechowywano w zamrażarce (-20°C) aż do momentu wykonania testu ELISA. W opisywanych w niniejszej pracy badaniach za pomocą testu ELISA określono poziom IL-6, IL-8, CCL2, CCL, CXCL10 (BioLegend) oraz CCL20 i MMP1 (R&D Systems). Test wykonywano zgodnie z zaleceniami producenta, a dla przejrzystości warunki poszczególnych inkubacji zebrano w tabeli poniżej.

Wszystkie etapy od blokowania do inkubacji z przeciwciałem II-rzędowym włącznie wykonywano na wytrząsarce. Po zakończonej inkubacji ze streptawidyną-HRP płytki 5-krotnie przepłukiwano roztworem PBS-T, dodawano substrat TMB i inkubowano 2-15 min w ciemności, po czym reakcję zatrzymywano 0,5M roztworem H₂SO₄. Natychmiast po przerwaniu reakcji mierzono absorbancję przy długościach fali $\lambda=450$ nm i $\lambda=570$ nm (fala referencyjna) przy użyciu czytnika mikropłytek FlexStation3 Multi-Mode Reader. Stężenie badanych mediatorów stanu zapalnego określano na podstawie krzywej standardowej.

etap	bufor	czas/temperatura inkubacji
opłaszczanie płytki	PSB-T (BioLegend) PBS (R&D Systems)	noc/4°C noc/RT
blokowanie	bufor reakcyjny (1% BSA w PBS-T)	1h/RT
inkubacja z próbkami/standardami		2h/RT
inkubacja z przeciwciałem I-rz.		1h/RT (BioLegend) 2h/RT (R&D Systems)
inkubacja z przeciwciałem II-rz.		1h/RT
inkubacja ze streptawidyną-HRP		30 min/RT (BioLegend) 20 min/RT (R&D Systems)

7.1.6 Analiza ekspresji białek za pomocą metody western blot

W celu wykonania analizy western blot, komórki wysiewano na płytkach 12-dołkowych w ilości 200-250 tys./dołek w pożywce pozbawionej antybiotyków i zawierającej 2% FBS. Kolejnego dnia pożywkę wymieniano na świeżą, a komórki poddawano stymulacji przez odpowiedni czas, w zależności od doświadczenia. Po zakończonej stymulacji, komórki przepłukiwano PBS i dodawano po 100-150 µl buforu Laemlliego. Komórki lizowano na lodzie przez 5 min, po czym lizaty zbierano do próbek typu Eppendorf i przechowywano w temperaturze -20°C.

7.1.6.1 Elektroforeza SDS-PAGE

Do elektroforezy lizaty rozcieńczano z buforem obciążającym w stosunku 4:1 i denaturowano przez 5 min w temperaturze 95°C przez 5 min. Po inkubacji próbki wortexowano i wirowano przez 1 min przy maksymalnych obrotach wirówki. Do elektroforezy typu SDS-PAGE używano 10-15% żeli poliakrylamidowych. Do jednej studzienki nakładano po 15-30 µl próbki, a rozdział prowadzono przy napięciu 80V przez ok. 20 min, a następnie napięcie zmieniano na 120 V.

7.1.6.2 Western blot

Następnie białka z żelu poddawano transferowi na membranę PVDF przy użyciu TransBlot Turbo. Przed transferem membranę aktywowano przez ok. 30 sek w metanolu. Po transferze membrany blokowano przez godzinę w 5% odtłuszczonego mleku, a następnie inkubowano z przeciwciałem I-rzędowym przez noc. Kolejnego dnia membrany przepłukiwano 5x5-6min w roztworze TBS-T, inkubowano z przeciwciałem II-rzędowym i ponownie płukano 5x 5-6min. Następnie membrany inkubowano z substratem ECL, a do detekcji sygnału używano czytnika

ChemiDoc MP Imaging System. Zdjęcia membran poddawano obróbce w programie ImageLab, który pozwala również na wykonanie analizy densytometrycznej.

7.1.7 Pomiar cytotoksyczności HDACi/DNMTi

W celu określenia poziomu cytotoksyczności wykorzystywanych w pracy inhibitorów użyto Cytotoxicity Detection Kit pokazujący poziom uwolnienia dehydrogenazy mleczanowej (LDH) do pożywki. Do testu LDH na płytce 96-dołkowe wysiewano po 25 tys. komórek/dołek. Kolejnego dnia pożywkę wymieniano i dodawano HDACi lub zostawiano bez inhibitorów w przypadku DNMTi (ponieważ w tym przypadku komórki do testu rozsiewano po 12-dniowej hodowli w obecności inhibitorów). Dodatkowo komórki były stymulowane przez 24h staurosporyną (STS; 1 μ M), która indukuje śmierć komórkową i służyła jako kontrola pozytywna. Kontrolę do testu stanowiły komórki traktowane buforem lizującym (100% cytotoksyczności). Test wykonano zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta. W skrócie – po inkubacji komórek z inhibitorami/STS/buforem lizującym zbierano pożywkę, do której następnie dodawano katalizatora rozcieńczonego w roztworze barwników. Po 20-30 min inkubacji reakcję zatrzymywano i mierzono absorbancję przy $\lambda=490$ nm za pomocą czytnika mikropłytek FlexStation3 Multi-Mode Reader.

7.1.8 Pomiar tempa proliferacji komórek

Do pomiaru tempa proliferacji komórek użyto testu na inkorporację BrdU – Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) kit, który przeprowadzono zgodnie z zaleceniami producenta. W celu wykonania testu komórki wysiewano na płytce 96-dołkowe w ilości 15 tys./dołek w pożywce zawierającej 2% FBS. Następnego dnia pożywkę wymieniano na świeżą i dodawano barwnik na ok. 20 h, aby zapewnić komórkom odpowiedni czas na wbudowanie BrdU. Kolejnego dnia komórki utrwalano, a następnie dodawano przeciwciała anty-BrdU znakowane peroksydazą (POD) i inkubowano przez 90 min na wytrząsarce. Następnie dodawano substrat i płytki inkubowano w ciemności do czasu zajścia reakcji kolorymetrycznej. Reakcję hamowano przy użyciu 0,5M roztworu H_2SO_4 , a absorbancję odczytywano przy $\lambda=450$ i $\lambda=690$ (fala referencyjna) za pomocą czytnika mikropłytek FlexStation3 Multi-Mode Reader. Tempo proliferacji wyznaczano względem kontroli, którą stanowiły komórki nietraktowane DNMTi lub nieinfekowane *P. gingivalis*.

7.1.9 Pomiar globalnej metylacji DNA

7.1.9.1 Izolacja DNA

Do izolacji DNA komórki były trypsynizowane, liczone i odwirowywane (300 x g, 5 min). DNA izolowano z co najmniej 300 tys. komórek. Osad komórkowy przepłukiwano w roztworze PBS i zawieszano w roztworze PBS zawierającym proteinazę K i dodawano bufor lizujący. Do izolacji DNA użyto zestawu DNeasy Blood and Tissue Kit, a procedurę izolacji wykonano zgodnie z zaleceniami producenta. Pomiaru stężenia DNA dokonywano przy pomocy spektrofotometru BioPhotometer D30. Otrzymane próbki przechowywano w temperaturze -20°C.

7.1.9.2 Test na globalną metylację DNA

Do testu na globalną metylację używano zestawu Global DNA Methylation LINE-1 Kit, który pozwala na wykrycie 5-mC w sekwencjach LINE-1, bogatych w wyspy CpG. Test wykonano zgodnie z zaleceniami producenta. W skrócie - w pierwszym etapie 1 µg DNA poddawano trawieniu z enzymem MseI, który powoduje fragmentację DNA. Reakcję prowadzono przez noc w temperaturze 37°C, po czym reakcja była zatrzymana poprzez inkubację próbek w temperaturze 65°C przez 20 min. W następnym kroku, próbki strawionego DNA rozcieńczano do końcowego stężenia 4 ng/ml i hybrydyzowano z biotynylowaną sondą LINE-1. Następnie próbki i standardy przenoszono na płytkę opłaszczoną streptawidyną i inkubowano z przeciwciałem wykrywającym 5-mC. Absorbancję mierzono przy $\lambda=450$ nm i fali referencyjnej $\lambda=655$ przy użyciu czytnika mikropłytek FlexStation3 Multi-Mode Reader. % 5-mC wyznaczano na podstawie krzywej standardowej i określano względem całkowitej ilości cytozyn.

7.1.10 Badanie internalizacji i przeżywalności wewnątrzkomórkowej bakterii metodą posiewową

W celu zbadania przeżywania wewnątrzkomórkowego *P. gingivalis* oraz jego eliminacji przez GFs, komórki wysiewano w ilości 125 tys./dołek w pożywce zawierającej 2% FBS i pozbawionej antybiotyków. Na drugi dzień pożywkę wymieniało się na świeżą, a komórki infekowano *P. gingivalis* (MOI 100) przez godzinę lub 24h (1h infekcji, płukanie roztworem PBS i hodowla w medium pozbawionym antybiotyków przez kolejne 23h). Natomiast w celu zbadania internalizacji bakterii GFs były infekowane przez godzinę, po czym bakterie odpłukiwano, komórki przepłukiwano 3-krotnie roztworem PBS i hodowano przez kolejną godzinę w pożywce zawierającej 0,25 mg/ml gentamycyny i 0,2 mg/ml metronidazolu (internalizacja) lub w pożywce bez antybiotyków (adhezja i internalizacja). Po odpowiednim

czasie dołki z komórkami przepłukiwano roztworem PBS i dodawano 100 μ l sterylnej wody destylowanej. Komórki lizowano przez 40 min w cieplarni w 37°C, po czym za pomocą końcówki do pipety pozostałości komórek zdrapywano z dołków. Następnie wykonywano 5-krotne seryjne rozcieńczenia, a tak przygotowane lizaty komórkowe wysiewano kroplami w objętości 10 μ l/rozcieńczenie na podłoże stałe w tryplikatach technicznych. Bakterie hodowano w warunkach beztlenowych przez 5-7 dni do czasu wyrośnięcia kolonii bakteryjnych. Po tym czasie zliczano kolonie bakteryjne przypadające na jedną kroplę.

7.1.11 Analiza statystyczna

Dane zaprezentowano jako średnia \pm SEM. Analizę statystyczną wykonywano przy użyciu programu GraphPad Prism 8. W celu określenia istotności statystycznej wykonywano sparowany t-test lub jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA wraz z testem post-hoc Bonferroniego uwzględniającym wielokrotne powtórzenia. Jako istotne statystycznie uznawano różnice, dla których wartość p wynosiła poniżej 0,05.

7.2 Badanie wpływu HDACi na aktywację zapalną GFs

7.2.1 Układ eksperymentalny

GFs pre-stymulowano HDACi przez 30 min, po czym komórki infekowano *P. gingivalis* (MOI 100) lub stymulowano cytokinami prozapalnymi: TNF i IL-1 β (10 ng/ml) przez 4h lub 24h. Wykaz poszczególnych HDACi znajduje się w tabeli X (Materiały). W celu zbadania aktywacji zapalnej GFs HDACi użyto w następujących stężeniach: 5 μ M SAHA, 500 nM ITF2357, 2,5 μ M MS-275 oraz 500 nM HDAC3/6i, HDAC6i oraz HDAC8i. Natomiast w celu zbadania specyficzności HDACi, komórki inkubowano ze związkami przez 2h, po czym zbierano lizaty białkowe i wykonywano analizę western blot (rozd. 7.1.6).

7.2.2 Ocena wpływu HDACi na żywotność GFs

W celu oceny wpływu HDACi na żywotność komórek, GFs inkubowano z DMSO, HDACi (5 μ M SAHA, 2,5 μ M MS-275 i 1 μ M pozostałe HDACi) oraz STS (1 μ M) przez 24h, po czym wykonywano test LDH jak opisano w pkt. 7.1.7. Alternatywnie, wpływ SAHA i ITF2357 na żywotność GFs oceniano wykonując barwienie aneksyną V zgodnie z zaleceniami producenta i wyznaczając % komórek pozytywnych za pomocą cytometrii przepływowej.

7.2.3 Badanie pośrednich efektów działania HDACi

Aby ocenić czy HDACi mogą wywierać pośrednie efekty, niezwiązane ze zmianami w strukturze chromatyny na GFs, sprawdzono ich wpływ na aktywację ścieżek zapalnych oraz na syntezę negatywnych regulatorów transkrypcji.

Aktywację szlaków sygnałowych sprawdzano w GF pre-inkubowanych z DMSO lub 500 nM HDACi: ITF2357 oraz HDAC3/6i i stymulowanych TNF przez 5, 20 i 60 min. Następnie zbierano lizaty komórkowe i wykonywano analizę western blot jak opisano w rozdz. 7.1.6. Użyto przeciwciał rozpoznających p-p38, p-ERK, I κ B α , p-p65 oraz tubulinę (kontrola).

Natomiast w celu sprawdzenia czy HDACi mogą wpływać na syntezę negatywnych regulatorów transkrypcji, GFs pre-inkubowano z DMSO lub SAHA (5 μ M) przez 30 min, po czym komórki stymulowano przez 4h TNF (10 ng/ml) w obecności lub nieobecności cykloheksymidu (CHX, 10 μ g/ml), który powoduje zahamowanie syntezy białek. Po tym czasie zbierano lizaty komórkowe, izolowano RNA i przeprowadzano analizę qPCR wg opisu z pkt. 7.1.4.

7.2.4 Internalizacja bakterii

Oceny procesu internalizacji bakterii dokonywano na dwa sposoby: 1) metodą posiewową (opisaną w rozdz. 7.1.10) lub 2) posługując się cytometrią przepływową. W tym celu GFs infekowano wyznakowanym CFSE *P. gingivalis* (MOI 100) przez 1h. Bakterie do wyznakowania przygotowano w następujący sposób: przygotowano zawiesinę bakteryjną o OD₆₀₀=2, następnie bakterie wirowano (5000 x g, 5 min, 4°C) i przepłukiwano roztworem PBS, po czym ponownie wirowano. Bakterie zawieszano w roztworze PBS i dodawano CFSE do końcowego stężenia 5 μ M. Tak przygotowaną zawiesinę inkubowano przez 20 min w ciemności w temperaturze 37°C. W celu pozbycia się niezwiązanego barwnika, do zawiesiny dodawano 5-krotnie większą objętość pożywki hodowlanej DMEM i inkubowano jeszcze 5 min. Następnie bakterie wirowano i 2-krotnie przepłukiwano roztworem PBS. W ostatnim etapie bakterie doprowadzano do OD₆₀₀=1. Komórki infekowano 1h, następnie trypsynizowano, a do analizy cytometrycznej zawieszano w roztworze PBS.

Oceny stopnia internalizacji *P. gingivalis* przez GFs wykonywano przy użyciu cytometru przepływowego FACSCalibur, natomiast analizę uzyskanych wyników przeprowadzono w programie FlowJo.

7.2.5 Transfekcja

GFs do transfekcji wysiewano w ilości 125 tys./dołek na płytkach 12-dołkowych w pożywce zawierającej 10% FBS i pozbawionej antybiotyków. Kolejnego dnia pożywkę usuwano, komórki przepłukiwano roztworem PBS i na jeden dołek płytki dodawano 800 μ l pożywki Opti-MEM I Reduced Serum Medium (1 ml w przypadku nietransfekowanej kontroli), do której kroplami dodawano 190 μ l mieszaniny zawierającej odczynnik do transfekcji (DharmaFECT 1 Transfection Reagent) oraz siRNA (100 nM). Mieszaninę tę przygotowano w następujący sposób:

Mieszanina 1:

88,75 μ l Opti-MEM I + 1,25 μ l DharmaFECT 1

Mieszanina 2:

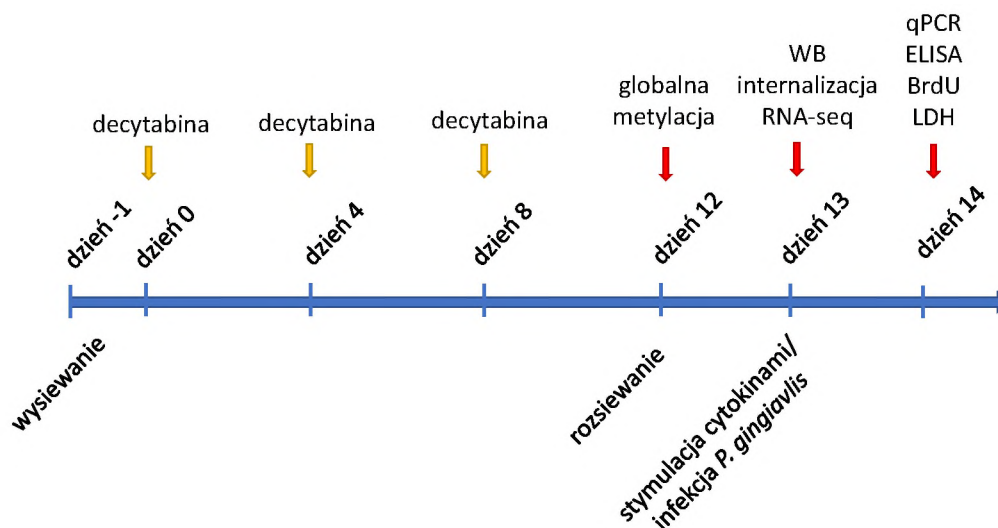
100 nM siRNA + Opti-MEM I (do końcowej objętości 100 μ l)

Każdą z mieszanin inkubowano 5 min w temperaturze pokojowej, po czym mieszano je ze sobą i inkubowano kolejne 20 min, a następnie dodawano do komórek. Do transfekcji użyto siRNA wyciszającego ekspresję HDAC3 (siHDAC3) lub HDAC1 (siHDAC1) oraz niespecyficznego siRNA (scrb), które służyło jako kontrola. Po 24-godzinnej transfekcji, pożywkę usuwano i komórki hodowano w pożywce DMEM zawierającej 10% FBS przez kolejne 48h. Po tym czasie komórki infekowano *P. gingivalis* (MOI 100) lub stymulowano TNF (10 ng/ml) przez 4h w pożywce zawierającej 2% FBS i pozbawionej antybiotyków. Następnie komórki lizowano w buforze do izolacji RNA lub przygotowywano lizat białkowy w buforze Laemmliego i postępowano z opisami z punktów 7.1.4 i 7.1.6.

7.3 Badanie wpływu DNMTi na aktywację zapalną GFs i PDLFs

7.3.1 Układ eksperymentalny

Komórki w obecności DNMTi: decytabiny (5 μ M), 5-azacytydyny (5 μ M) lub 6-tioguaniny (10 μ M) lub DMSO (kontrola) hodowano przez 12 dni, co 4 dni wymieniając pożywkę i dodając świeżą porcję inhibitora. Hodowlę prowadzono na szlakach 10 cm w pożywce hodowlanej DMEM zawierającej standardową ilość antybiotyków i 10% FBS. Po 12 dniach hodowli komórki trypsynizowano, liczone i zbierano osady komórkowe do izolacji DNA (celem zmierzenia poziomu globalnej metylacji) lub rozsiewano na kolejne testy. Poniżej znajduje się schematyczne przedstawienie układu eksperymentalnego (Ryc. 2):



Rycina 2. Schematyczne przedstawienie układu eksperymentalnego. Żółtymi strzałkami zaznaczano dni, kiedy dodawano świeżą porcję decytabiny/DMSO, natomiast czerwone strzałki oznaczają dzień eksperymentu, w którym zbierano próbki, zaznaczono również rodzaj testu/analizy, na jaki zbierano próbki danego dnia.

Alternatywnie komórki hodowano przez 3 dni w obecności decytabiny (5 μ M) lub DMSO w pożywce zawierającej antybiotyki i 10% FBS bez wymiany pożywki i bez dodawania świeżej porcji związków w czasie trwania hodowli. W innym wariantcie doświadczenia GFs hodowano w obecności decytabiny (5 μ M) lub DMSO przez 3 lub 12 dni, codziennie zmieniając pożywkę i dodając świeżą porcję inhibitora/DMSO.

7.3.2 Analiza transkryptomyczna (sekwencjonowanie RNA; RNA-seq)

Po inkubacji z decytabiną (5 μ M) lub DMSO, GFs rozświetano na płytce 6-dołkowe, po 500 tys./dołek w pożywce bez antybiotyków zawierającej 2% FBS. Kolejnego dnia pożywkę wymieniano, a komórki infekowano *P. gingivalis* (MOI 20) przez 4h. Pożywkę usuwano, komórki przepłukiwano roztworem PBS i dodawano po 600 μ l buforu lizującego zawierającego 1% β -merkaptioetanolu. Izolację RNA wykonano przy pomocy zestawu RNeasy Mini Kit wg zaleceń producenta. Otrzymane próbki RNA zawieszano w 30 μ l wody wolnej od RNaz, a pomiaru stężenia RNA dokonywano przy pomocy spektrofotometru BioPhotometer D30. Otrzymane próbki RNA zostały przekazane firmie Intelliseq S. A., której zlecono wykonanie sekwencjonowania RNA i analizy bioinformatycznej.

7.3.3 Analiza ekspresji mRNA i produkcji mediatorów stanu zapalnego

Do analizy qPCR komórki wysiewano jak opisano w punkcie 7.1.4 i infekowano *P. gingivalis* (MOI 20) lub stymulowano TNF (10 ng/ml) przez 4h.

Natomiast do testu ELISA komórki poddawane były 24-godzinnej stymulacji z TNF lub IL-1B (10 ng/ml) lub infekowane przez godzinę *P. gingivalis* (MOI 10 lub 50), po czym bakterie usuwano przepłukując komórki 3-krotnie roztworem PBS i dodawano pożywkę zawierającą 2% FBS oraz gentamycyne (0,25 mg/ml) i metronidazol (0,2 mg/ml) na 23h. Wyższe stężenie antybiotyków miało na celu pozbycie się zewnątrzkomórkowych bakterii. Następnie zbierano pożywkę z nad komórek i wykonywano test ELISA wg opisu z punktu 7.1.5.

7.3.4 Analiza wpływu rekombinowanej CCL20 (r-CCL20) na przeżywalność *P. gingivalis*

W celu zbadania antybakteryjnych właściwości CCL20, *P. gingivalis* hodowano w warunkach beztlenowych w pożywce BHI zawierającej suplementy wraz z r-CCL20 w stężeniach 200 lub 1000 ng/ml do 24h. Jako kontroli użyto bestatyny (5 mg/ml), która hamuje wzrost *P. gingivalis* [147]. Pomiaru gęstości optycznej (OD_{600}) dokonywano przez 8h co 2h i po 24h przy pomocy spektrofotometru Cell Density Meter.

7.3.5 Pomiar degradacji r-CCL20 przez *P. gingivalis*

W celu określenia wpływu *P. gingivalis* na degradację CCL20, bakterie o następujących mianach: 1; 2,5; 5; 10×10^6 /ml inkubowano wraz z r-CCL20 (200 ng/ml) przez 2h lub 24h w pożywce komórkowej w temperaturze 37°C i atmosferze zawierającej 5% CO₂. Po zebraniu, próbki były wirowane (10 000 x g, 10 min, 4°C), w celu pozbycia się bakterii. Następnie za pomocą testu ELISA mierzono stężenie CCL20, zgodnie z opisem umieszczonym w pkt 7.1.5. Kontrolę stanowiła pożywka, do której nie dodano bakterii, zawierająca jedynie r-CCL20. Dla każdego punktu czasowego zastosowano osobną kontrolę.

7.3.6 Pomiar cytotoksyczności DNMTi

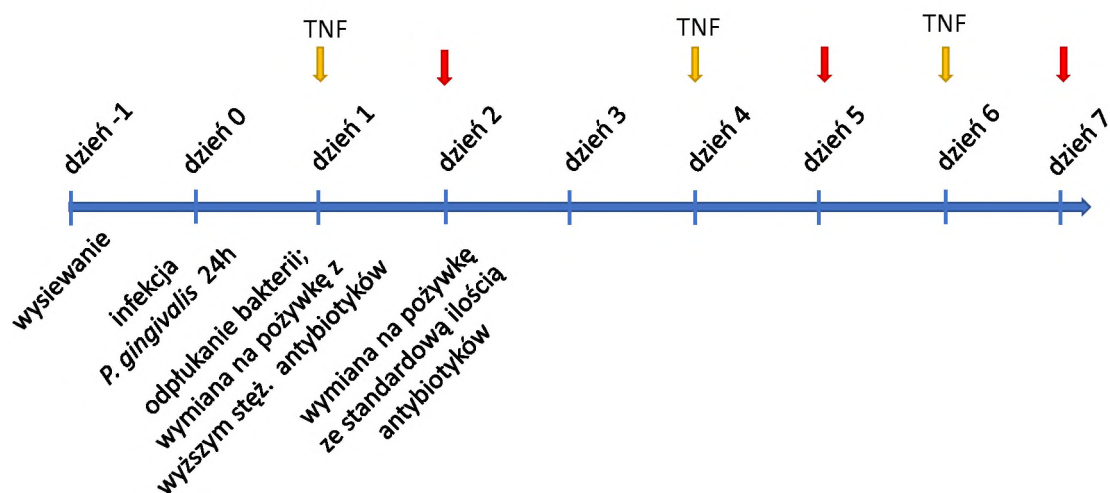
W celu określenia cytotoksyczności decytabiny oraz pozostałych inhibitorów: 5-azacytydyny oraz 6-tioguaniny wykonywano test LDH opisany w sekcji 7.1.7 lub dokonywano pomiaru żywotności komórek za pomocą testu Cell Death ELISA Kit. W tym celu zbierano pożywkę z nad komórek lub lizaty zawierające jedynie frakcje cytozolowe i określano poziom akumulacji kompleksów DNA-histony. Obecność kompleksów w lizatach komórkowych świadczy o apoptozie, natomiast w pożywce hodowalnej o nekrozie. Test wykonano zgodnie z instrukcją dołączoną przez producenta.

7.4 Badanie długofalowych efektów infekcji *P. gingivalis* na aktywację zapalną GFs

W celu zbadania długofalowych efektów *P. gingivalis* na aktywację zapalną GFs, komórki pre-infekowano *P. gingivalis*, poddawano stymulacji TNF w różnych odstępach czasowych od ekspozycji komórek na bakterie.

7.4.1 Układ eksperymentalny – optymalizacja modelu

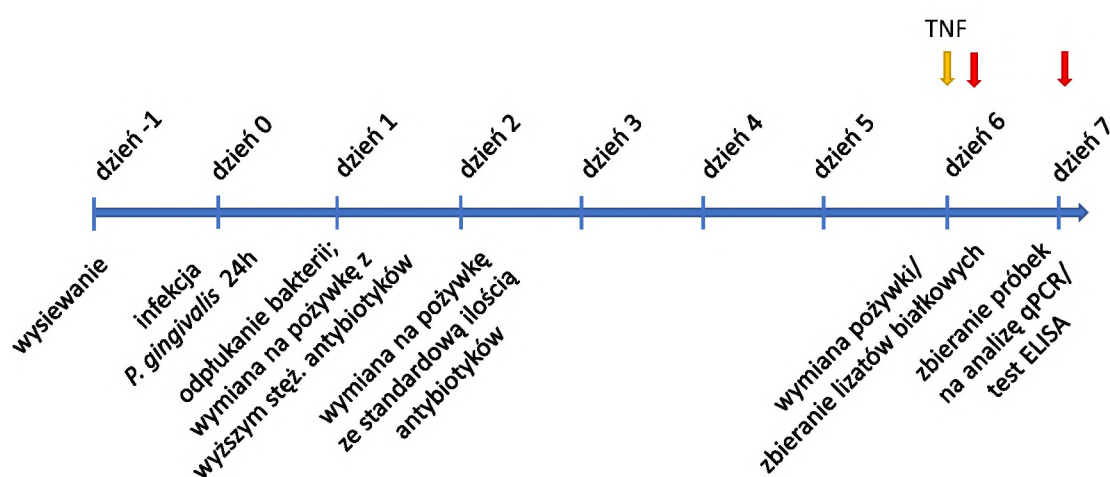
GFs wysiewano na płytkach 96-dołkowych w ilości 15 tys./dołek w pożywce zawierającej 2% FBS, bez antybiotyków. Kolejnego dnia pożywkę wymieniało na świeżą, a komórki infekowano *P. gingivalis* MOI 20 lub 50 przez 24h. Po tym czasie pożywkę usuwano, komórki przepłukiwano 3-krotnie roztworem PBS i dodawano świeżą pożywkę. Do komórek, które były stymulowane TNF (10 ng/ml) natychmiast po infekcji (dzień 1) dodawano pożywkę bez antybiotyków, natomiast do pozostałych komórek dodawano pożywkę zawierającą 2% FBS i wyższe stężenie antybiotyków: 0,25 mg/ml gentymycyny i 0,2 mg/ml metronidazolu w celu wyeliminowania bakterii pozostających w hodowli. Po 24h pożywkę wymieniało na świeżą, a komórki hodowano do czwartego lub szóstego dnia, kiedy pożywkę wymieniało po raz kolejny i dodawano TNF (10 ng/ml) na 24h wg schematu zamieszczonego poniżej (Ryc. 3). Pożywkę z komórek do pomiaru ilości wydzielonych mediatorów zapalnych za pomocą testu ELISA zbierano dnia drugiego, piątego i siódmego. Zebrane próbki wykorzystywano następnie do testu ELISA (pkt 7.1.5).



Rycina 3. Schematyczne przedstawienie układu eksperymentalnego. Żółte strzałki oznaczają dzień, w którym komórki stymulowano TNF, natomiast czerwone - dzień, w którym zbierano próbki do dalszych pomiarów.

7.4.2 Układ eksperymentalny – główny model

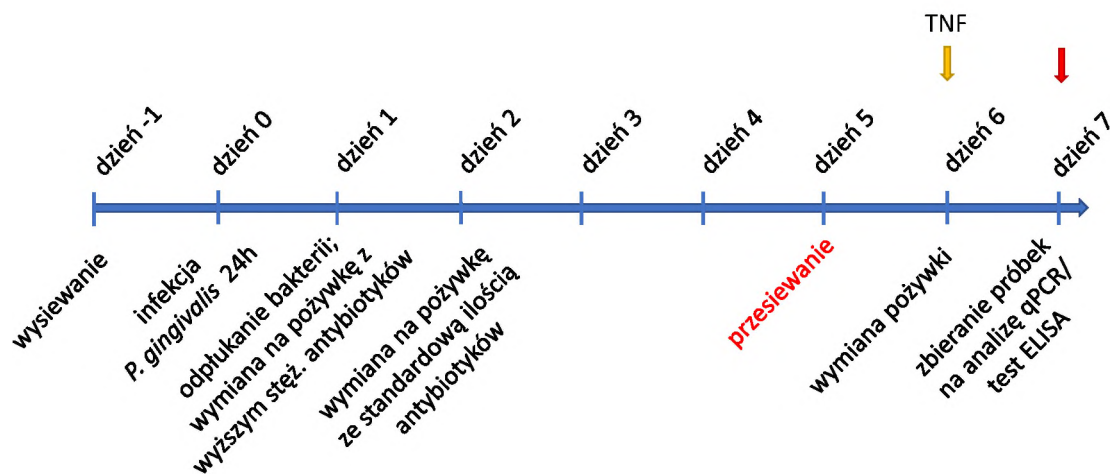
GFs wysiewano na płytkach 96-dołkowych (15 tys./dołek) do testu ELISA lub na płytkach 12-dołkowych (40 tys./dołek) do analizy qPCR lub western blot. Kolejnego dnia pożywkę (DMEM+2% FBS) wymieniało na świeżą, a komórki poddawano 24-godzinnej infekcji *P. gingivalis* MOI 50. Po tym czasie pożywkę usuwano, komórki przepłukiwano 3-krotnie roztworem PBS i dodawano pożywkę zawierającą 2% FBS oraz wyższe stężenie antybiotyków: 0,25 mg/ml gentamycyny i 0,2 mg/ml metronidazolu. Po 24h pożywkę wymieniało na świeżą zawierającą 2-10% FBS, a komórki hodowano do dnia 6, kiedy to pożywkę po raz kolejny wymieniało i dodawano TNF (10 ng/ml) na 24h. Po tym czasie zbierano pożywkę z komórek w celu wykonania testu ELISA (rozdz. 7.1.5) lub komórki zawieszano w buforze lizującym do dalszej izolacji RNA i analizy qPCR (rozdz. 7.1.4). Natomiast do analizy western blot komórki stymulowano dnia szóstego TNF (10 ng/ml) przez 5, 20 i 60 min, po czym zbierano lizaty białkowe i analizowano jak opisano w rozdziale 7.1.6.



Rycina 4. Schemat przedstawiający układ eksperymentalny. Żółtą strzałką zaznaczono moment dodania TNF do komórek, natomiast czerwona – moment zbierania próbek.

7.4.3 Układ eksperymentalny – model z dodatkowym etapem przesiewania komórek

Komórki wysiewano na płytce 6-dołkowej (75-100 tys./dołek) i hodowano tak samo jak powyżej. Piątego dnia komórki trypsynizowano, liczone i wysiewano po 25 tys./dołek na płytce 96-dołkowej. Szóstego dnia GFs stymulowano TNF (10 ng/ml), a po 24h zbierano próbki na test ELISA. Schemat opisujący układ eksperymentalny przedstawiono na Ryc. 5 poniżej.



Rycina 5. Schematyczne przedstawienie układu eksperymentalnego uwzględniającego dodatkowy krok przesiewania komórek. Żółta strzałka oznacza moment stymulacji komórek TNF, natomiast czerwona – moment zbierania próbek do analizy.

7.4.4 Pomiar wewnątrzkomórkowej produkcji IL-6

W celu zmierzenia wewnątrzkomórkowej produkcji IL-6 w GFs pre-infekowanych *P. gingivalis*, komórki wysiewano na płytce 6-dołkowej (75-100 tys./dołek) i hodowano wg schematu przedstawionego na Ryc. 4. Siódmego dnia GFs stymulowano TNF (10 ng/ml) przez 2h, po czym dodawano brefeldynę A (10 µg/ml), która blokuje wydzielanie białek przez komórkę. Po 4h inkubacji, komórki trypsynizowano, wirowano, a osad komórkowy przepłukiwano roztworem PBS i ponownie wirowano. Następnie komórki utrwalano w 500 µl 4% formaldehydu przez 15 min w 4°C. Osad komórkowy 2-krotnie przepłukiwano roztworem PBS i wirowano. Następnie osad komórkowy zawieszano w 2 ml PBA i przechowywano przez noc w 4°C. Kolejnego dnia komórki wirowano, a osad zawieszano w 2 ml buforu do permeabilizacji (Intracellular Staining Permeabilization Wash Buffer) i ponownie wirowano. Następnie osad komórkowy zwieszano w 50 µl buforu do permeabilizacji z przeciwciałem anti-IL-6 wyznakowanym barwnikiem fluorescencyjnym Alexa Fluor 467 (rozcieńczenie 200 x) i inkubowano w ciemności na lodzie przez 30 min. Niebarwioną kontrolę zawieszano w 50 µl buforu do permeabilizacji. Po zakończonej inkubacji z przeciwciałem, do zawiesiny wybarwionych komórek dodawano 1ml buforu do permeabilizacji i wirowano. Następnie komórki przepłukiwano 1 ml buforu PBA i ponownie wirowano, a do analizy cytometrycznej komórki zawieszano w 200-250 µl PBA. Analizę przeprowadzano przy użyciu cytometru przepływowego Fortessa. Wyniki analizowano przy użyciu programu FlowJo.

7.4.5 Analiza RRBS (ang. *reduced representation bisulfite sequencing*; zredukowane reprezentacyjne sekwencjonowanie bisulfitowe)

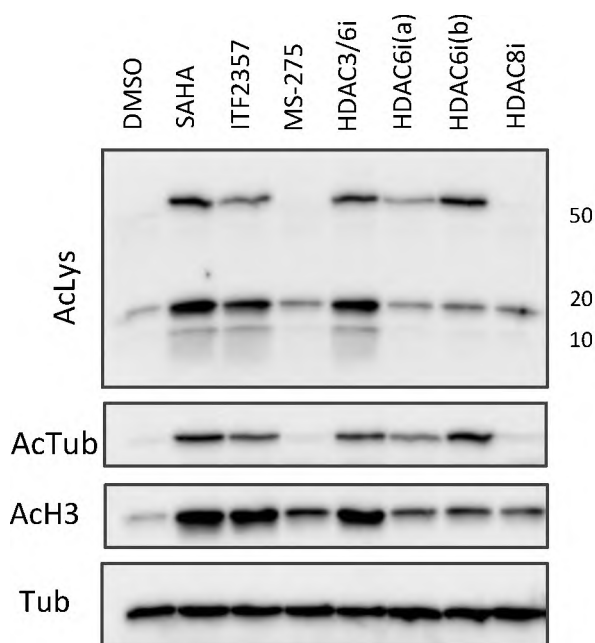
Izolację DNA wykonano tak jak opisano w 7.1.9.1. Pomiaru stężenia DNA dokonano przy użyciu Qubit4, który został udostępniony do pomiarów dzięki uprzejmości p. Agaty Jarosz z Małopolskiego Centrum Biotechnologii UJ. Następnie próbki przekazano firmie Novogene, której zlecono wykonanie sekwencjonowania. Próbki po dodatkowym etapie oczyszczania pozytywnie przeszły kontrolę jakości i mogły zostać przygotowane biblioteki do konwersji wodorosiarczynem. Konwersja ta powoduje deaminację niezmetylowanych zasad cytozyny do uracylu, który następnie w analizie rozpoznawany jest jako tymina. Natomiast zmetylowane cytozyny są niewrażliwe na konwersję, a podczas analizy odczytywane są jako cytozyny. Analiza RRBS pozwala na ocenę cało-genomowego profilu metylacji DNA w oparciu o sekwencjonowanie regionów bogatych w wyspy CpG. W pracy przedstawiono wyniki analizy głównych składowych PCA, przedstawiono poziom metylacji poszczególnych regionów genomu oraz mapę cieplną genów, których poziom metylacji był istotnie podwyższony. Analizę bioinformatyczną otrzymanych wyników wykonała Mariia Melnykova pod kierunkiem dr. Guillemo Yalla, Kierownika Pracowni Bioinformatyki i Biologii Genomu na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ. Analiza została wykonana przy pomocy pakietów FastQC i Brismarck.

8 Wyniki

8.1 Badanie wpływu HDACi na aktywację zapalną GFs

8.1.1 HDACi powodują zwiększenie poziomu acetylacji białek

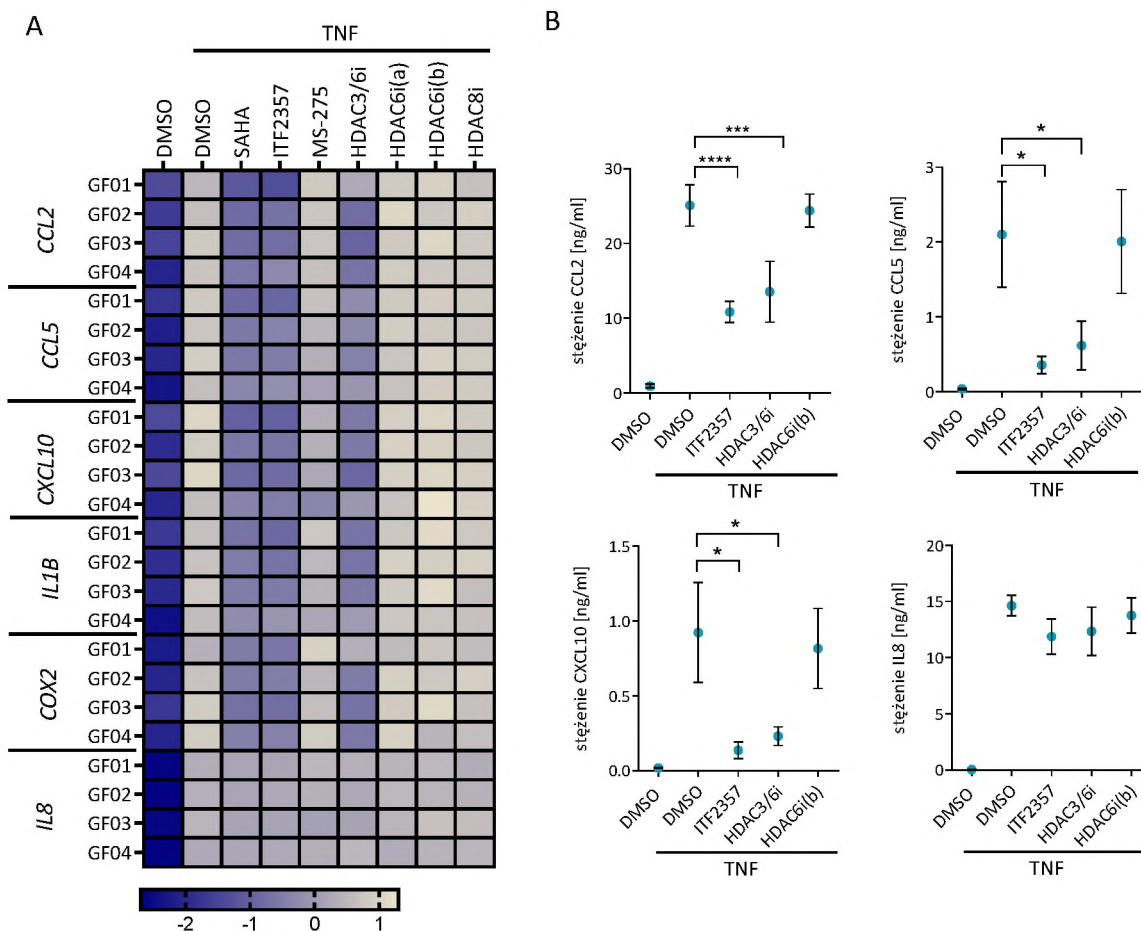
Jednym z celów badawczych niniejszej pracy jest określenie wpływu inhibitorów HDAC (HDACi) na aktywację zapalną GFs. Do doświadczeń użyto globalnych HDACi – SAHA i ITF2357, inhibitora HDAC klasy I, który wykazuje selektywność względem HDAC1 – MS-275, jak również specyficznych inhibitorów HDAC3/6, HDAC6 oraz HDAC8. Zanim przeprowadzono doświadczenia sprawdzające wpływ badanych związków na aktywację zapalną GFs, za pomocą metody western blot zweryfikowano ich aktywność biologiczną (Ryc. 6). Kontrolę stanowiły komórki inkubowane z DMSO. SAHA, ITF2357 oraz HDAC3/6 powodowały hiperacetylację tubuliny oraz histonu H3, natomiast obydwie użyte HDAC6i (HDAC6i(a) oraz HDAC6i(b)) powodowały hiperacetylację tubuliny (przy czym w przypadku HDAC6i(b) efekt ten był silniejszy), bez znaczącego wpływu na acetylację histonu H3. Jest to wynik zgodny z założeniami, ponieważ HDAC3 jest deacetylazą jądrową, a HDAC6 to główna deacetylaza cytoplazmatyczna. Z kolei MS-275 oraz HDAC8i podwyższały poziom acetylacji jedynie w histonie H3, co także jest zgodne z oczekiwaniami, gdyż HDAC klasy I wykazują lokalizację jądrową. Globalny poziom acetylacji białek sprawdzono poprzez analizę western blot acetylowanych reszt lizyny w badanych próbkach. Analiza potwierdziła wyniki uzyskane dla poszczególnych białek, bowiem zaobserwowane prążki na wysokościach 52, 18 i 11 kDa najprawdopodobniej odpowiadają acetylowanej tubulinie, histonowi H3 oraz histonowi H4. Przeprowadzone analizy potwierdziły zatem biologiczną aktywność użytych związków.



Rycina 6. Wpływ HDACi na poziom acetylacji białek. Poziom globalnej acetylacji lizyn (AcLys) oraz acetylowanej tubuliny (AcTub) i acetylowanego histonu H3 (AcH3) w lizatach komórkowych GFs inkubowanych przez 2h z DMSO lub HDACi: SAHA (5 μ M), ITF2357 (500 nM), MS-275 (2,5 μ M) oraz HDAC3/6i, HDAC6i(a), HDAC6i(b) i HDAC8i (wszystkie w stężeniu 500 nM). Jako kontroli użyto przeciwciał rozpoznających tubulinę (Tub). Na rycinie przedstawiono jeden z trzech reprezentatywnych wyników analizy western blot.

8.1.2 HDACi obniżają odpowiedź zapalną GFs indukowaną przez TNF

Po potwierdzeniu aktywności i specyficzności działania testowanych HDACi przystąpiono do doświadczeń, których celem była ocena ich wpływu na aktywację zapalną GFs. PZP jest chorobą o podłożu zapalnym, dlatego w pierwszym etapie eksperymentów GFs stymulowano TNF – cytokiną prozapalną obecną w dużych ilościach w płynie kieszonkowym pacjentów [148]. W pierwszej kolejności zbadano poziom ekspresji mediatorów stanu zapalnego, które odgrywają istotną rolę w patogenezie PZP. Analiza qPCR wykazała obniżenie indukowanej przez TNF ekspresji *CCL2*, *CCL5*, *CXCL10*, *IL1B* oraz *COX2* w GFs pre-inkubowanych z SAHA, ITF2357 oraz HDAC3/6i. Natomiast MS-275, oba inhibitory HDAC6 oraz HDAC8i nie miały wpływu na ekspresję badanych genów po stymulacji TNF. Ekspresja *IL8* nie uległa zmianie pod wpływem żadnego z użytych inhibitorów (Ryc. 7A). W następnym kroku sprawdzono czy uzyskane z analizy qPCR wyniki przekładają się na odpowiedź GFs na poziomie białka. Ponieważ otrzymane wyniki sugerowały, że zahamowanie aktywności HDAC3, ale nie HDAC6, może mieć istotne znaczenie w osłabieniu odpowiedzi zapalnej GFs indukowanej TNF, do testów ELISA wybrano próbki po inkubacji komórek z ITF2357, HDAC3/6i oraz jednym z inhibitorów HDAC6 – HDAC6i(b). W analizowanych próbkach zmierzono poziom produkcji chemokin prozapalnych: *CCL2*, *CCL5*, *CXCL10* oraz *IL8*. Wyniki wskazały na istotną statystycznie redukcję poziomu wydzielania *CCL2*, *CCL5* oraz *CXCL10* przez GFs traktowane ITF2357 oraz HDAC3/6i, ale nie HDAC6i(b). Natomiast żaden z badanych HDACi nie regulował produkcji *IL-8* (Ryc. 7B). Otrzymane wyniki pokazują, że globalne HDACi oraz HDAC3/6i obniżają produkcję mediatorów stanu zapalnego i sugerują, że HDAC3 może odgrywać ważną rolę w regulacji odpowiedzi zapalnej GFs.

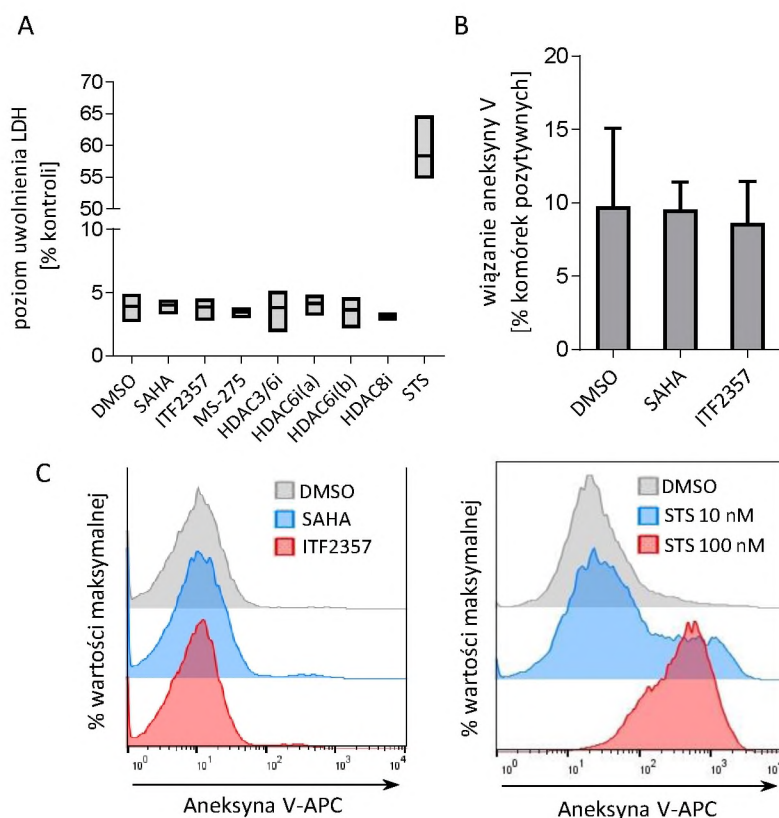


Rycina 7. Wpływ HDACi na ekspresję i produkcję mediatorów stanu zapalnego po stymulacji komórek TNF. GFs pre-inkubowano z DMSO lub HDACi: SAHA (5 μ M), ITF2357 (500 nM), MS-275 (2,5 μ M) oraz specyficznymi HDACi – HDAC3/6i, HDAC6i(a), HDAC6i(b) i HDAC8i (wszystkie w stężeniu 500 nM) przez 30 min, po czym stymulowano TNF (10 ng/ml). (A) Analiza qPCR ekspresji mediatorów stanu zapalnego mierzona po 4h stymulacji TNF. Dane dla indywidualnych dawców (GF01-04) przedstawiono na mapie cieplnej jako standardowy wynik (ang. z-score) policzony na podstawie wartości Δ Ct względem genu referencyjnego (*RPLP0*). (B) Poziom produkcji CCL2, CCL5, CXCL10 i IL-8 zmierzony za pomocą testu ELISA. Wyniki przedstawiono jako średnie stężenie \pm SEM (n=4-5). *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001

8.1.3 HDACi nie wykazują działania cytotoksycznego na GFs

W celu zweryfikowania czy obserwowane przeciwzapalne efekty HDACi nie są wynikiem ich cytotoksycznego działania na GFs, sprawdzono wpływ użytych związków na żywotność komórek. Wykonano test LDH (Ryc. 8A) dla wszystkich badanych związków, który wskazał na brak cytotoksycznych efektów HDACi. Wpływ pan-HDACi (SAHA i ITF2357) na żywotność komórek sprawdzono również za pomocą cytometrii przepływowej wykonując barwienie aneksyną V (Ryc. 8B, C), która wiąże się do komórek apoptotycznych. Przeprowadzona analiza potwierdziła wcześniej uzyskane wyniki. Ponieważ obydwa testy nie

wykazały istotnego wpływu badanych związków na żywotność GFs, wykluczono możliwość, że wyniki kolejnych doświadczeń i analiz mogłyby zostać zaburzone przez cytotoksyczne efekty wywołane przez HDACi.



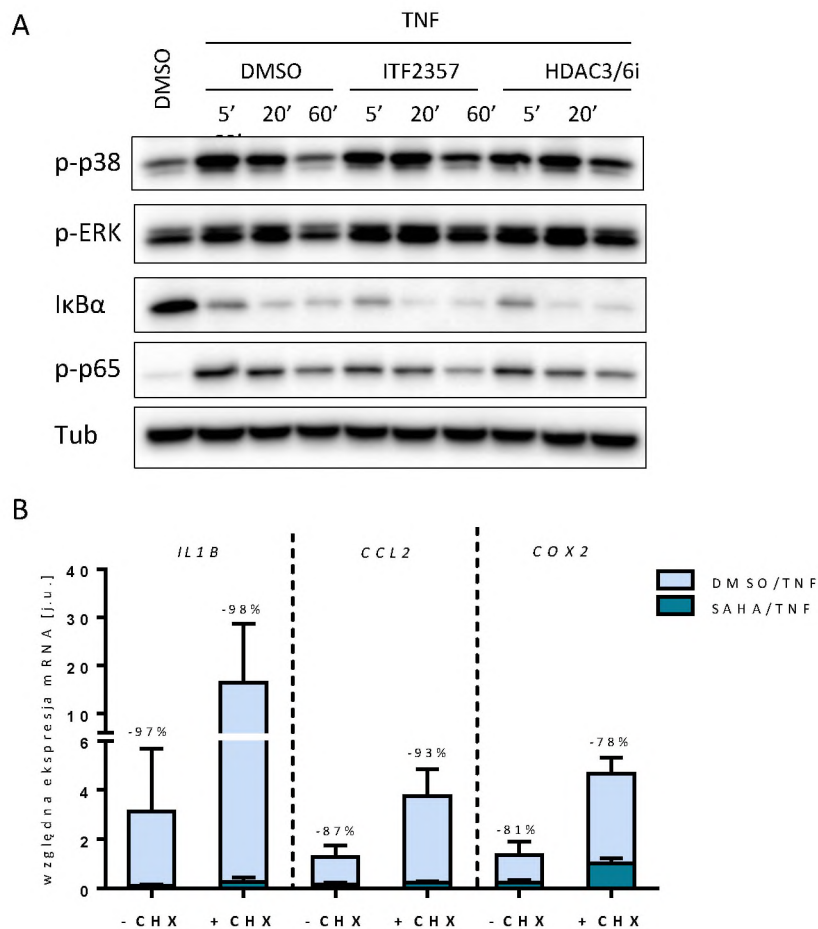
Rycina 8. Wpływ HDACi na żywotność GFs. GFs traktowano DMSO lub HDACi: SAHA (5 μ M), ITF2357 (1 μ M), MS-275 (2,5 μ M) oraz HDAC3/6i, HDAC6i(a), HDAC6i(b), HDAC8i (1 μ M) przez 24h. (A) Żywotność oceniono za pomocą testu LDH. Kontrolę pozytywną stanowiły GFs inkubowane ze staurosporyną (STS, 1 μ M). Wynik wyrażono jako średni % kontroli wraz z zakresem policzony względem lizatów komórkowych (n=3). (B,C) Analiza poziomu wiązania aneksyny V przez komórki wykonana przy pomocy cytometrii przepływowej. Jako kontroli pozytywnej użyto STS (10 nM i 100 nM). Wyniki przedstawiono jako (B) % komórek pozytywnych + SEM oraz (C) w formie reprezentatywnych histogramów (n=3).

8.1.4 HDACi nie mają wpływu na aktywację ścieżek sygnałowych ani nie indukują syntezy korepresorów transkrypcji

Celem kolejnego etapu badań była weryfikacja czy zahamowanie aktywacji zapalnej GFs przez HDACi jest wynikiem ich bezpośredniego wpływu na strukturę chromatyiny, czy być może jest to wynik pośredniego działania HDACi na szlaki sygnałowe lub syntezę negatywnych regulatorów transkrypcji.

Istnieją prace pokazujące, że aktywacja szlaków sygnałowych NF κ B oraz MAPK może być regulowana przez acetylację [149], [150]. Aby wykluczyć możliwość, że obserwowane w poprzednich doświadczeniach efekty były wtórne do działania HDACi na szlaki sygnałowe, przeprowadzono analizę western blot w komórkach inkubowanych z ITF2357 oraz HDAC3/6i oraz stymulowanych TNF przez 5, 20 i 60 minut. Analiza nie wykazała istotnych różnic w kinetyce i poziomie aktywacji białek związanych ze szlakiem sygnałowym kinaz MAP (fosfo(p)-p38, p-ERK) oraz czynnika transkrypcyjnego NF κ B (I κ B α , p-p65) pomiędzy kontrolą, którą stanowiły komórki inkubowane z DMSO, a komórkami inkubowanymi z HDACi (Ryc. 9A). Taki wynik sugeruje, że HDACi nie hamują aktywacji ścieżek sygnałowych.

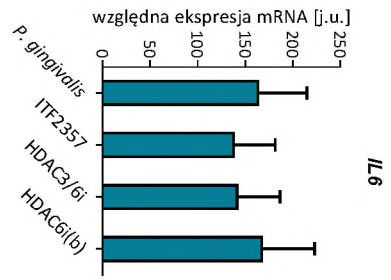
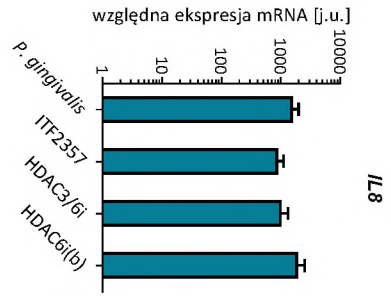
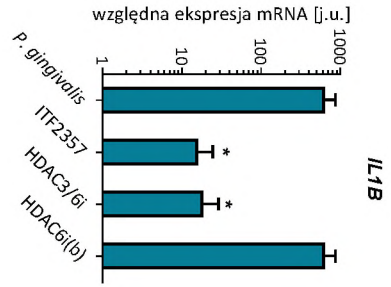
Pokazano również, że pośrednim mechanizmem działania HDACi może być indukcja korepresorów transkrypcji [151]. W celu sprawdzenia czy obserwowane efekty są wynikiem indukcji transkrypcyjnych korepresorów użyto cykloheksymidu (CHX), który blokuje proces translacji. Analiza qPCR pokazała, że SAHA w podobnym stopniu obniża poziom ekspresji mRNA *CCL2*, *IL1B* i *COX2* po stymulacji TNF zarówno w komórkach, do których nie dodano CHX, jak i w obecności CHX, osiągając porównywalny spadek ekspresji transkryptów (Ryc. 9B). Co ciekawe, zanotowano podwyższoną ekspresję badanych genów po dodaniu CHX w porównaniu z kontrolą (Ryc. 9B). Zjawisko takie może wynikać z faktu, że komórka po aktywacji zapalnej aktywuje produkcję korepresorów transkrypcji, które umożliwiają kontrolowane wyciszenie stanu zapalnego. W obecności CHX negatywne regulatory transkrypcji nie są produkowane, zatem proces transkrypcji genów zapalnych przeprowadzany jest dalej, stąd obserwowany wzrost poziomu mRNA badanych genów. Podsumowując, otrzymane w tym doświadczeniu wyniki sugerują, że do obniżenia ekspresji genów zapalnych przez HDACi nie jest wymagana synteza białek negatywnych regulatorów transkrypcji. Zaprezentowane wyniki wskazują zatem, że globalne HDACi i HDAC3/6i obniżają ekspresję mediatorów stanu zapalnego najprawdopodobniej poprzez bezpośredni wpływ na strukturę chromatyny w wyniku zahamowania aktywności HDAC.

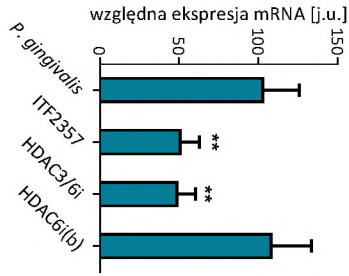
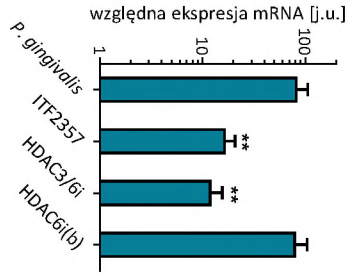
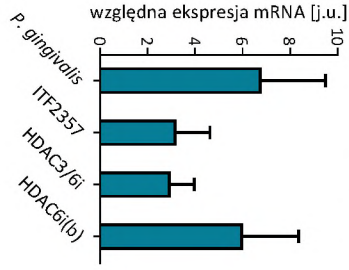
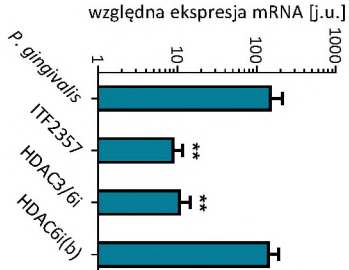
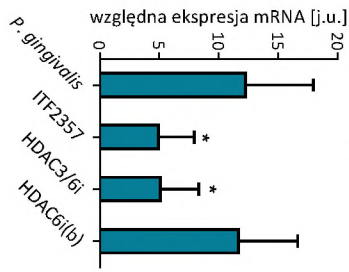
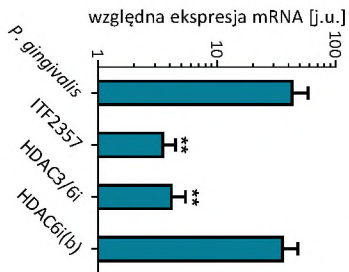


Rycina 9. Wpływ HDACi na aktywację szlaków sygnałowych oraz produkcję negatywnych regulatorów transkrypcji. (A) GFs pre-inkubowano z DMSO lub 500 nM HDACi: ITF2357 oraz HDAC3/6i przez 30 min, po czym stymulowano TNF (10 ng/ml) przez 5, 20 i 60 min i przygotowywano lizaty białkowe. Przeprowadzono analizę aktywacji białek szlaków sygnałowych kinaz MAP (p-p38, p-ERK) oraz NFκB (IκBα, p-p65) za pomocą techniki western blot z użyciem przeciwciał specyficznie rozpoznających badane białka. Jako kontroli użyto przeciwciał rozpoznających tubulinę. Na rycinie przedstawiono jedno z trzech reprezentatywnych powtórzeń eksperymentu. (B) Analiza qPCR ekspresji genów *IL1B*, *CCL2* i *COX2* w GFS pre-inkubowanych z DMSO lub SAHA (5 μM) przez 30 min, a następnie stymulowanych TNF (10 ng/ml) przez 4h w obecności lub nieobecności CXH (10 μg/ml). Wynik przedstawiono jako średnią względną ekspresję mRNA + SEM (n=4), a na wykresie zaznaczono procentowe obniżenie ekspresji badanych genów w obecności SAHA.

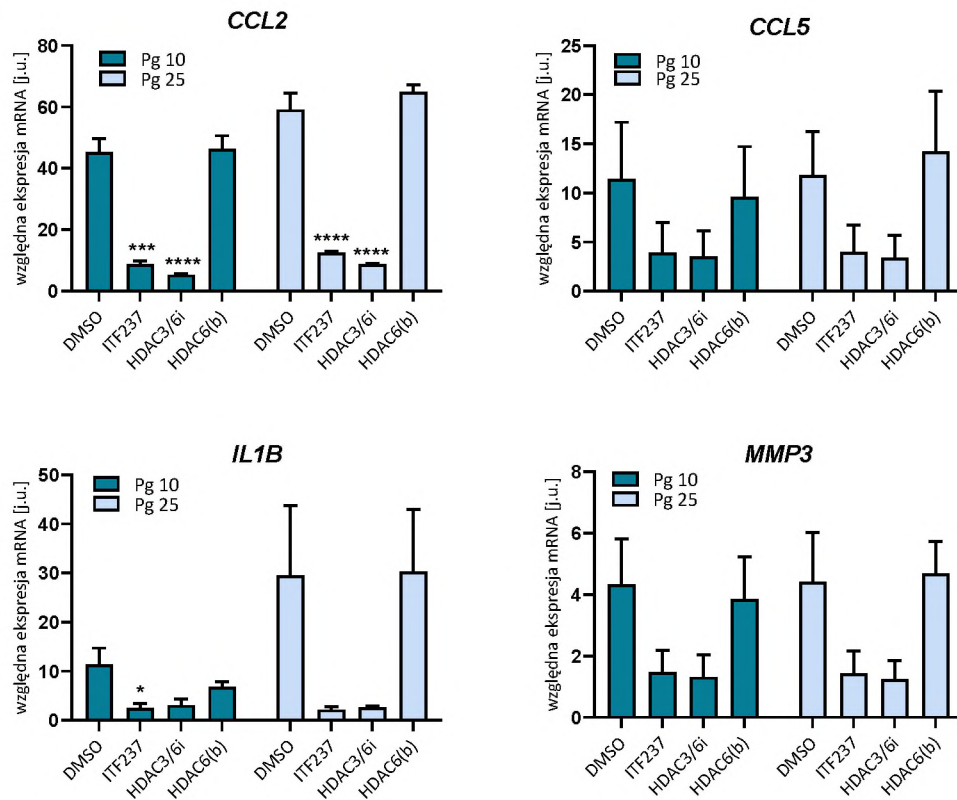
8.1.5 HDAC3 odgrywa istotną rolę w regulacji odpowiedzi zapalnej GFs na infekcję *P. gingivalis*

Poprzednie eksperymenty dowiodły, że efekty obserwowane po użyciu HDACi są najprawdopodobniej bezpośrednim wynikiem ich działania na strukturę chromatyny. Mając pewność, że użyte związki działają specyficznym i nie powodują efektów cytotoksycznych, przeanalizowano wpływ wybranych HDACi na odpowiedź zapalną GFs po infekcji *P. gingivalis*. Wyniki analizy qPCR były zbieżne z wynikami uzyskanymi po stymulacji TNF. Zaobserwowano bowiem, że HDAC3/6i w podobnym stopniu jak ITF2357 redukował poziom ekspresji mediatorów stanu zapalnego: *COX2*, *CCL2*, *CCL5*, *CXCL10*, *IL1B* oraz genu kodującego metaloproteinazę *MMP3* biorącą udział w degradacji ECM. Z kolei HDAC6i(b) nie miał wpływu na ekspresję badanych genów w komórkach infekowanych *P. gingivalis*. Również żaden z użytych inhibitorów nie regulował poziomu ekspresji *IL6* i *IL8* (Ryc. 10A). Dodatkowo pokazano, że HDAC3/6i w podobnym stopniu jak globalny HDACi osłabiał odpowiedź zapalną GFs również w komórkach infekowanych niższymi MOI *P. gingivalis* (Ryc. 10B). Redukcję ekspresji *CCL2* w GFs inkubowanych z HDAC3/6i potwierdzono także testem ELISA, mierząc poziom wydzielonego do pożywki hodowlanej białka (Ryc. 10C). Przedstawione w tej części wyniki potwierdzają wcześniejsze obserwacje dotyczące przeciwzapalnego działania HDACi oraz kluczowej roli HDAC3 w regulacji odpowiedzi zapalnej GFs, oraz sugerują, że przeciwzapalne działanie HDACi jest niezależne od czynnika wywołującego aktywację zapalną komórek.

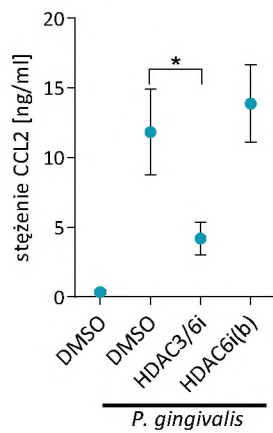


A**COX2****CCL2****MMP1****CCL5****MMP3****CXCL10**

B



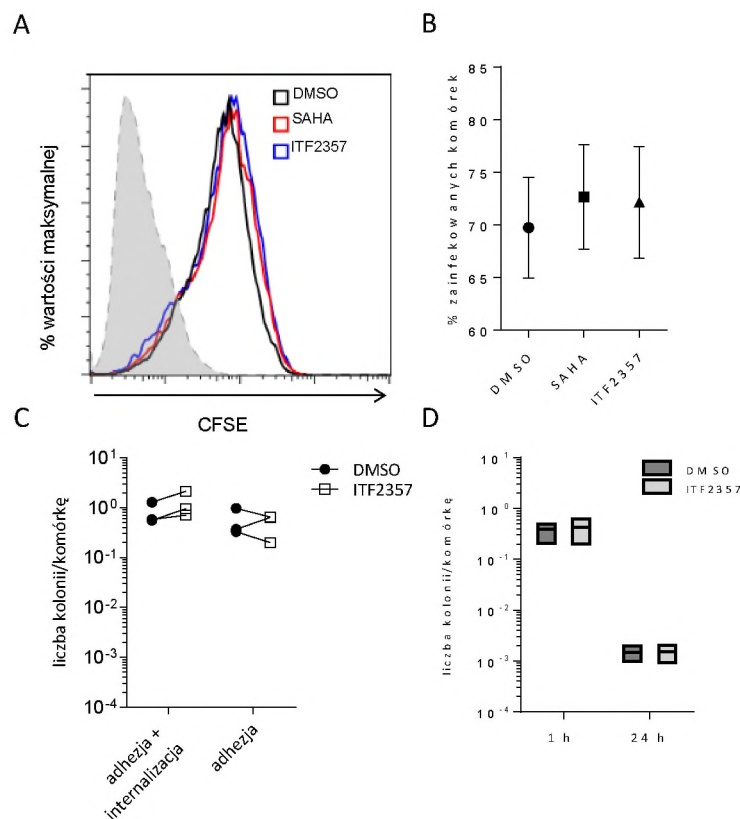
C



Rycina 10. Wpływ HDACi na odpowiedź zapalną GFs indukowaną infekcją *P. gingivalis*. Komórki pre-inkubowano przez 30 min z DMSO oraz HDACi: ITF2357, HDAC3/6i oraz HDAC6i(b) (wszystkie w stężeniu 500 nM), a następnie infekowano *P. gingivalis*. (A, B) Analiza qPCR ekspresji mediatorów stanu zapalnego mierzona po 4h infekcji *P. gingivalis* ((A) MOI 100 (n=6), (B) MOI 10 MOI 25 (n=3)). (A, B) Wynik przedstawiony jako średnia względna ekspresja mRNA +SEM (n=3) policzona względem niestymulowanej kontroli. Jako genu referencyjnego użyto *RPLPO*. (C) Poziom produkcji CCL2 w GFs po infekcji *P. gingivalis* (MOI 100) przez 1h, odptulkaniu bakterii i pozostawieniu w świeżej pożywce na kolejne 23h zmierzony za pomocą testu ELISA (n=4). *p <0,05

8.1.6 HDACi nie wpływają na procesy związane z internalizacją bakterii, ich przeżywaniami wewnątrz komórek gospodarza oraz ich eliminacją

W następnym kroku sprawdzono, czy HDACi wpływają na proces internalizacji i wewnątrzkomórkowe przeżywanie *P. gingivalis* w GFs. Przeprowadzona analiza cytometryczna wykazała, że globalne HDACi – SAHA i ITF2357 nie wpływają na odsetek komórek zainfekowanych wyznakowanymi fluorescencyjnie bakteriami *P. gingivalis* (Ryc.11A), co sugeruje brak wpływu inhibitorów na internalizację bakterii (Ryc.11B). Wyniki te potwierdzono w niezależnych eksperymentach wykorzystując metodę posiewową: nie odnotowano wpływu ITF2357 na adhezję i internalizację bakterii do GFs (Ryc.11C), jak również na eliminację *P. gingivalis* po 24 h od infekcji (Ryc.11D). Przedstawione wyniki pokazują zatem, że HDACi działają selektywnie na odpowiedź zapalną GFs na infekcję, nie wpływając przy tym na procesy związane z internalizacją bakterii czy ich późniejszą eliminacją.



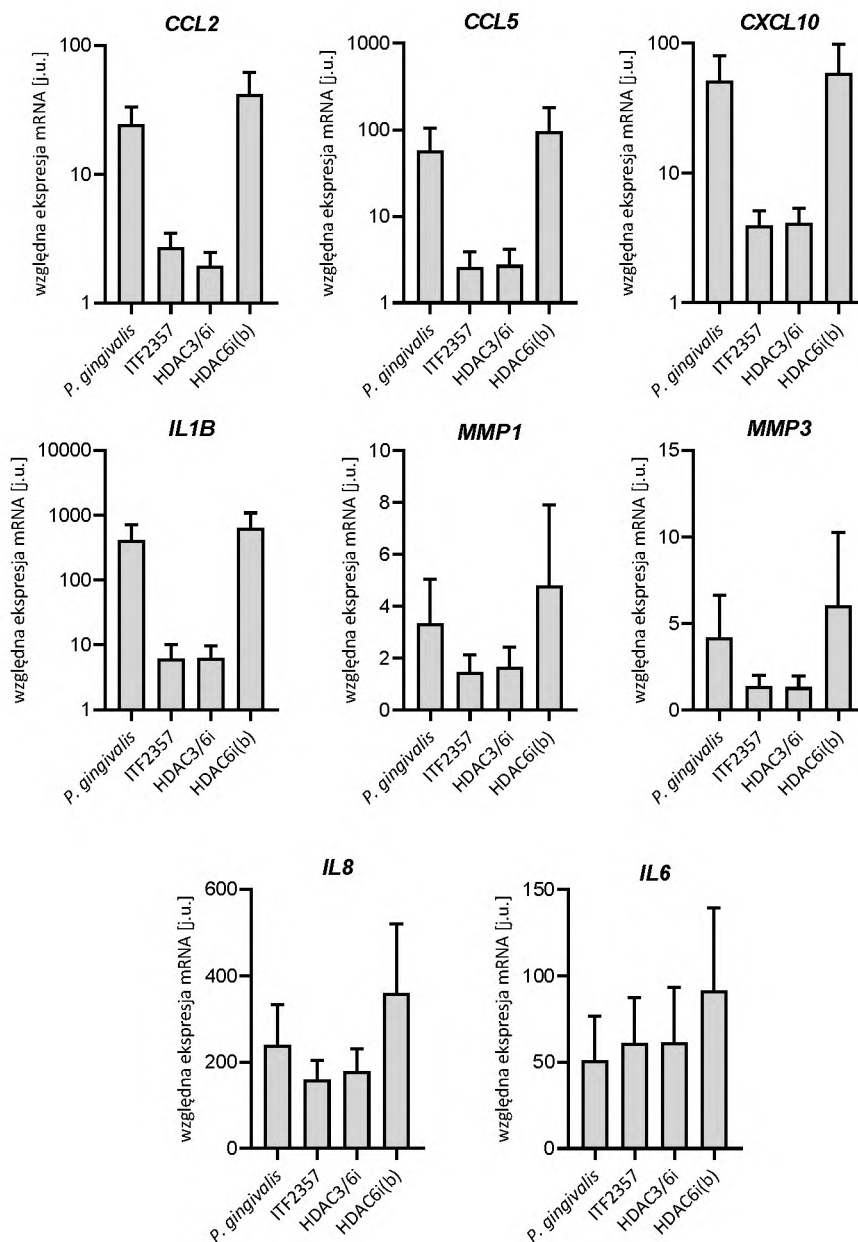
Rycina 11. Wpływ HDACi na internalizację i przeżywanie wewnątrzkomórkowe *P. gingivalis* w GFs. (A, B) Komórki w obecności DMSO, SAHA (5 μ M) lub ITF2357 (500 nM) infekowano przez 1h *P. gingivalis* (MOI 100) wyznakowanym CFSE. Wyniki analizy cytometrycznej pokazujące internalizację bakterii (A) przedstawiono w postaci histogramu oraz (B) wyrażono jako % zainfekowanych komórek (n=2). (C, D) Stopień przeżywania wewnątrzkomórkowego bakterii określony za pomocą metody posiewowej. (C) GFs traktowane DMSO lub ITF2357 (500 nM) infekowano *P. gingivalis* (MOI 100) przez 1h, po czym przez

kolejną godzinę hodowano w pożywce zawierającej antybiotyki (internalizacja) lub pozbawionej antybiotyków (adhezja i internalizacja). Wyniki przedstawiono osobno dla każdego dawcy w formie linii łączących poszczególne wartości liczby kolonii/komórkę utworzonych w lizatach komórek traktowanych DMSO lub ITF2357 (n=3). (D) W celu określenia wpływu HDACi na wewnątrzkomórkowe przeżywanie i eliminację bakterii, GFs infekowano *P. gingivalis* przez 1h lub 24h. Wyniki przedstawiono jako średnią liczbę kolonii bakteryjnych utworzonych w przeliczeniu na jedną komórkę wraz z zakresem (n=3).

8.1.7 HDACi redukują poziom ekspresji mediatorów stanu zapalnego w GFs wyizolowanych od pacjentów z PZP

Istnieje kilka prac pokazujących, że GFs wyizolowane z tkanki pobranej od pacjentów z PZP (PDGFs) silniej odpowiadają na infekcję *P. gingivalis* niż GFs wyizolowane od zdrowych dawców [152], [153]. Celem kolejnego eksperymentu było zbadanie wpływu HDACi na odpowiedź zapalną PDGFs po infekcji *P. gingivalis*. Za pomocą metody qPCR sprawdzono poziom ekspresji mediatorów stanu zapalnego. Analiza ponownie pokazała, że ITF2357 oraz HDAC3/6i, ale nie HDAC6i(b), obniżają ekspresję *CCL2*, *CCL5*, *CXCL10*, *IL1B*, *MMP1* i *MMP3*. Nie odnotowano natomiast wpływu użytych HDACi na ekspresję *IL6* i *IL8* (Ryc. 12). Co prawda otrzymane wyniki nie wykazały istotności statystycznej, jednak można to wytłumaczyć dużym zróżnicowaniem odpowiedzi komórek pierwotnych. Biorąc pod uwagę fakt, że doświadczenie przeprowadzono na komórkach wyizolowanych od pacjentów z PZP, efekt ten może być silniejszy, ponieważ stopień zaawansowania choroby jest różny pomiędzy poszczególnymi dawcami, co przekłada się na odpowiedź PDGFs na infekcję.

Podsumowując, uzyskane wyniki pokazały kluczową rolę HDAC3 w aktywacji zapalnej PDGFs. Dodatkowo wskazują na przeciwzapalne działanie HDACi na komórki utrzymujące fenotyp zapalny, co dodatkowo zwiększa ich potencjał terapeutyczny w chronicznym zapaleniu przyzębia.

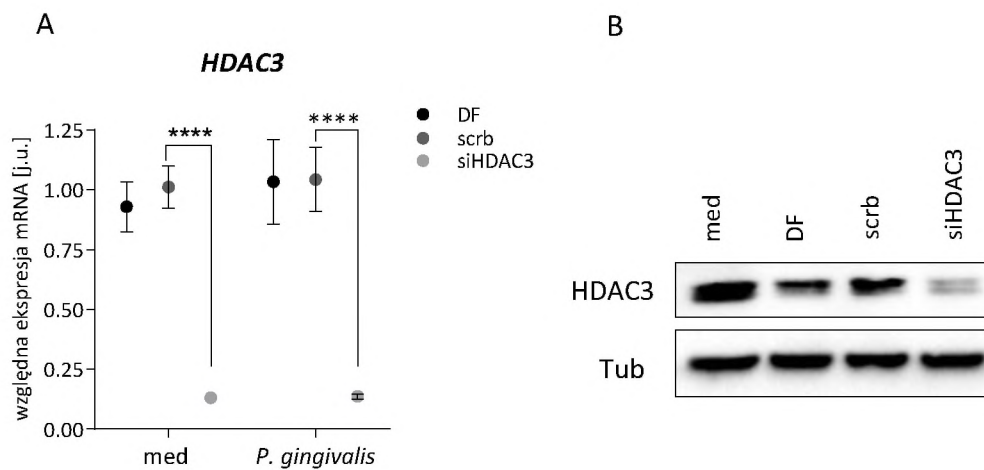


Rycina 12. Wpływ HDACi na ekspresję mRNA mediatorów stanu zapalnego w PDGFs. Komórki pre-inkubowano z DMSO lub HDACi: ITF2357, HDAC3/6i oraz HDAC6i(b) (wszystkie w stężeniu 500 nM), a następnie infekowano *P. gingivalis* (MOI 100) przez 4h. Analiza qPCR ekspresji mediatorów stanu zapalnego przedstawiona jako średnia względna ekspresja mRNA + SEM porównana do nieinfekowanej kontroli. Jako genu referencyjnego użyto *RPLP0* (n=4).

8.1.8 siRNA skutecznie wycisza ekspresję HDAC3 na poziomie mRNA oraz białka

Przedstawione powyżej wyniki sugerują istotną rolę HDAC3 w regulacji odpowiedzi zapalnej GFs zarówno na infekcję *P. gingivalis*, jak i na stymulację TNF. Aby jednoznacznie potwierdzić poprzednie obserwacje, wykorzystano technologię wyciszania ekspresji genów za pomocą

siRNA. GFs transfekowano siHDAC3, a wydajność transfekcji potwierdzono za pomocą metody qPCR (Ryc. 13A) oraz western blot (Ryc. 13B). Analiza qPCR wykazała istotny spadek ekspresji mRNA *HDAC3* po wyciszeniu w porównaniu z próbkami kontrolnymi, które stanowiły komórki traktowane czynnikiem transfekującym (DF) oraz transfekowane niespecyficznym siRNA (scrb) zarówno w stanie spoczynkowym, jak i po infekcji *P. gingivalis* (Ryc. 13A). Wyniki otrzymane dla mRNA przełożyły się na efekty obserwowane na poziomie białka – poziom produkcji HDAC3 był wyraźnie niższy w porównaniu z kontrolą (Ryc. 13B). Przedstawione wyniki pokazują zatem, że transfekcja przebiegła skutecznie i metoda wyciszania ekspresji za pomocą siRNA pozwala na przeprowadzenie dalszych doświadczeń mających na celu potwierdzenie roli HDAC3 w aktywacji zapalnej GFs.

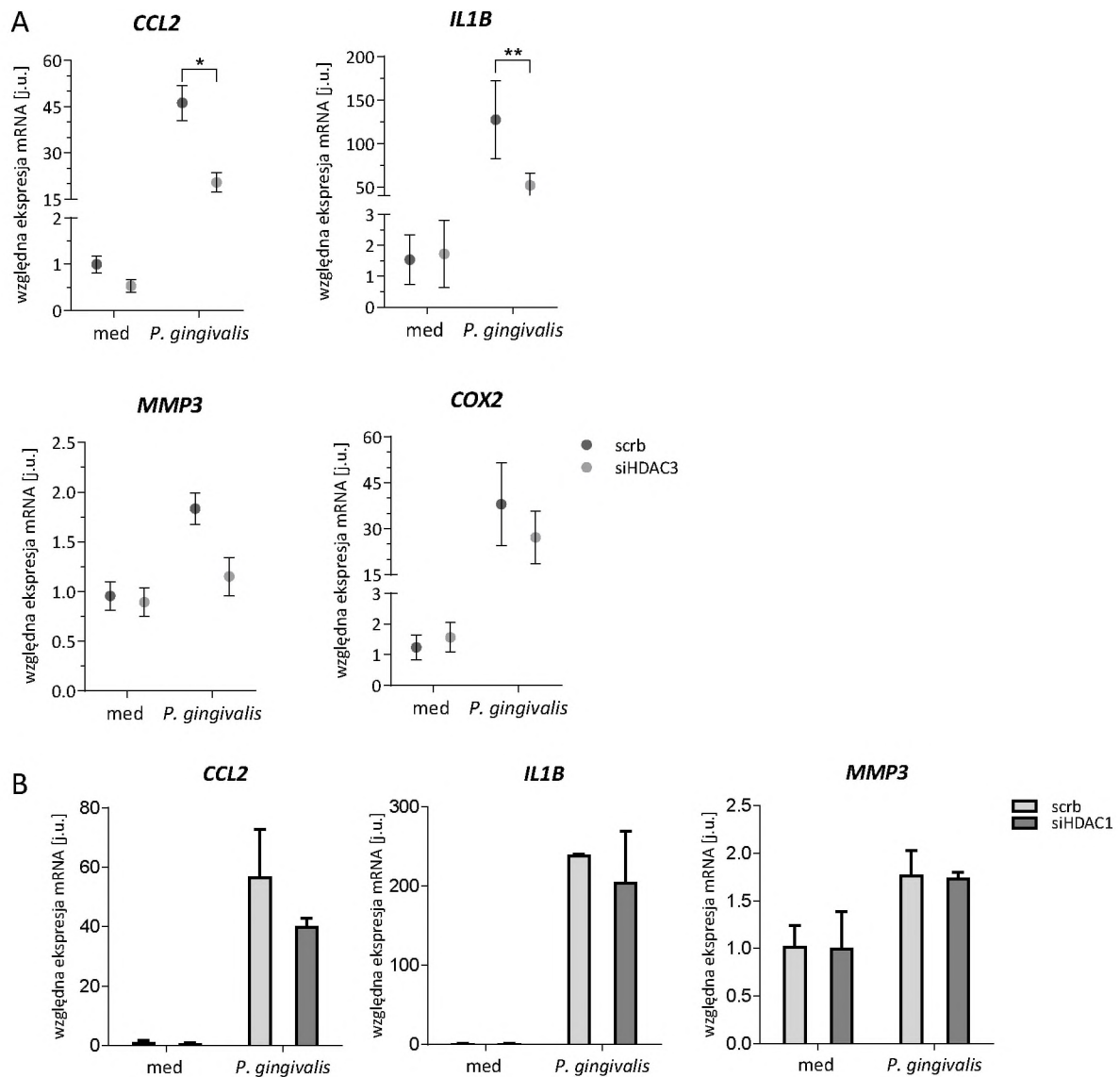


Rycina 13. Potwierdzenie skuteczności wyciszenia ekspresji HDAC3 za pomocą siRNA. GFs transfekowano siRNA specyficznie wyciszającymi ekspresję HDAC3 (siHDAC3) przez 24h oraz hodowano przez kolejne 48h, a następnie infekowano *P. gingivalis* (MOI 100) przez 4h lub pozostawiano w pożywce. Kontrolę stanowiły komórki traktowane samym odczynnikiem do transfekcji (Dharmafect; DF) lub transfekowane niespecyficznym siRNA (scrb; 100 nM). Analiza ekspresji (A) mRNA i (B) białka HDAC3 w GFs po transfekcji. (A) Średnia względna ekspresja mRNA \pm SEM (n=4) znormalizowana względem genu referencyjnego (*RPLP0*). (B) Na rycinie przedstawiono jeden z dwóch reprezentatywnych wyników analizy western blot. **** p<0,0001

8.1.9 Efekty wyciszenia ekspresji HDAC3 częściowo pokrywają się z efektami działania HDACi

W celu sprawdzenia roli HDAC3 w aktywacji zapalnej GFs, transfekowane komórki infekowano *P. gingivalis*. Analiza ekspresji genów wykazała istotne obniżenie poziomu indukcji *CCL2* i *IL1B* po infekcji. Zaobserwowano również tendencję do obniżonej ekspresji *COX2* i *MMP3* (Ryc. 14A). Wyniki te w dużym stopniu pokrywały się z efektami wywołanymi przez HDAC3/i (Ryc. 7 i 10). Warto dodać, że wyciszenie ekspresji HDAC1 (której

skuteczność potwierdzono w [122]) nie miało wpływu na ekspresję wybranych genów (Ryc. 14B). Uzyskane w tej części wyniki jednoznacznie potwierdziły, że HDAC3 odgrywa kluczową rolę w regulacji odpowiedzi zapalnej GFs, a zahamowanie jej aktywności może mieć potencjał terapeutyczny w PZP.



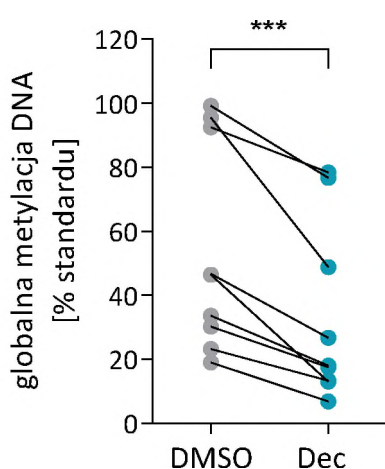
Rycina 14. Wpływ wyciszenia ekspresji HDAC3 na odpowiedź zapalną GFs. GFs transfekowano siRNA specyficznie wyciszającymi ekspresję HDAC3 (siHDAC3) oraz HDAC1 (siHDAC1) przez 24h, a po kolejnych 48h komórki infekowano *P. gingivalis* (MOI 100) przez 4h. Kontrolę stanowiły komórki transfekowane niespecyficznym siRNA (scrb; 100 nM). Poziom ekspresji markerów stanu zapalnego po infekcji *P. gingivalis* w komórkach transfekowanych (A) siHDAC3 (n=4) lub (B) siHDAC1 (n=2). Wyniki analizy qPCR przedstawiono jako (A) średnią względną ekspresję mRNA wraz z zakresem lub jako (B) średnią + SEM. Jako genu referencyjnego użyto *RPLPO*. * p<0,05; ** p<0,01

8.2 Określenie wpływu inhibicji DNMT1 na aktywację zapalną i inne funkcje biologiczne komórek strukturalnych dziąsła

8.2.1 Decytabina indukuje globalną hipometylację DNA

W celu określenia wpływu hipometylacji DNA na odpowiedź zapalną GFs indukowaną *P. gingivalis* lub mediatorami stanu zapalnego, komórki hodowano w obecności decytabiny, inhibitora DNMT1. Wzór metylacji jest przepisywany podczas replikacji, dlatego aby komórki mogły utrwalić nowy wzór metylacji w hodowli muszą przejść wiele podziałów. Bazując na danych literaturowych wybrano zatem model, w którym GFs hodowano w obecności decytabiny (5 μ M) przez 12 dni, co 4 dni wymieniając pożywkę i dodając świeżą porcję inhibitora.

W celu zweryfikowania, czy hodowla w obecności decytabiny indukowała hipometylację, sprawdzono globalny poziom metylacji DNA. Test wykrywający metylację zasad cytozyny w sekwencjach LINE-1 (która jest bogata w wyspy CpG) pokazał, że decytabina w stężeniu 5 μ M obniża poziom metylacji DNA w GFs po 12 dniach inkubacji ze związkiem o około 20% w porównaniu do kontroli, którą stanowiły komórki hodowane z DMSO (Ryc. 15).



Rycina 15. Wpływ decytabiny na globalny poziom metylacji DNA. Poziom globalnej metylacji DNA w GFs hodowanych z decytabiną (Dec) lub DMSO przez 12 dni (n=9). Wynik przedstawiono jako średnia \pm SEM wraz z poszczególnymi wartościami. ***p<0,001

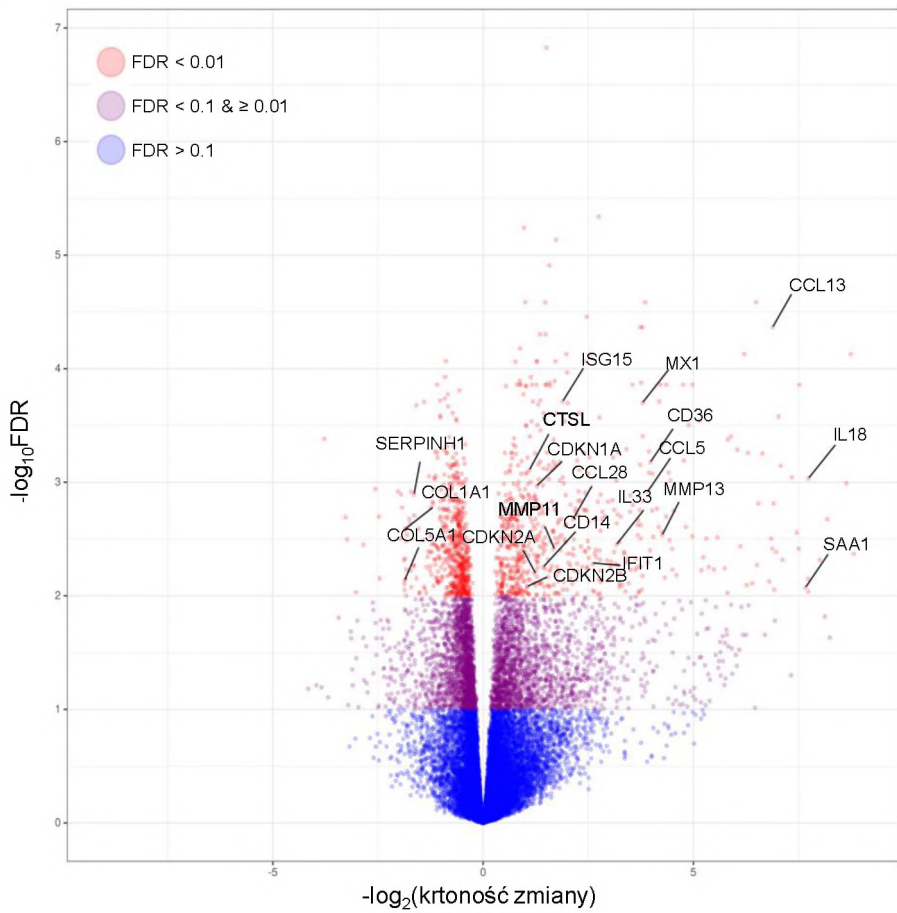
8.2.2 Decytabina indukuje globalne zmiany w transkryptomie GFs wpływając na szeroki zakres procesów komórkowych

Po potwierdzeniu, że decytabina wykazuje działanie hipometylujące, wykonano analizę transkryptomyczną w GFs hodowanych w obecności DMSO lub Dec przez 12 dni, a następnie infekowanych *P. gingivalis*. Analiza ta pozwoliła na uzyskanie pełniejszego obrazu zmian na poziomie transkryptomycznym po indukcji hipometylacji w komórkach. W warunkach kontrolnych wykryto 480 genów, których ekspresja była istotnie zmieniona pod wpływem decytabiny w porównaniu do komórek hodowanych w obecności DMSO, z czego ekspresja 384

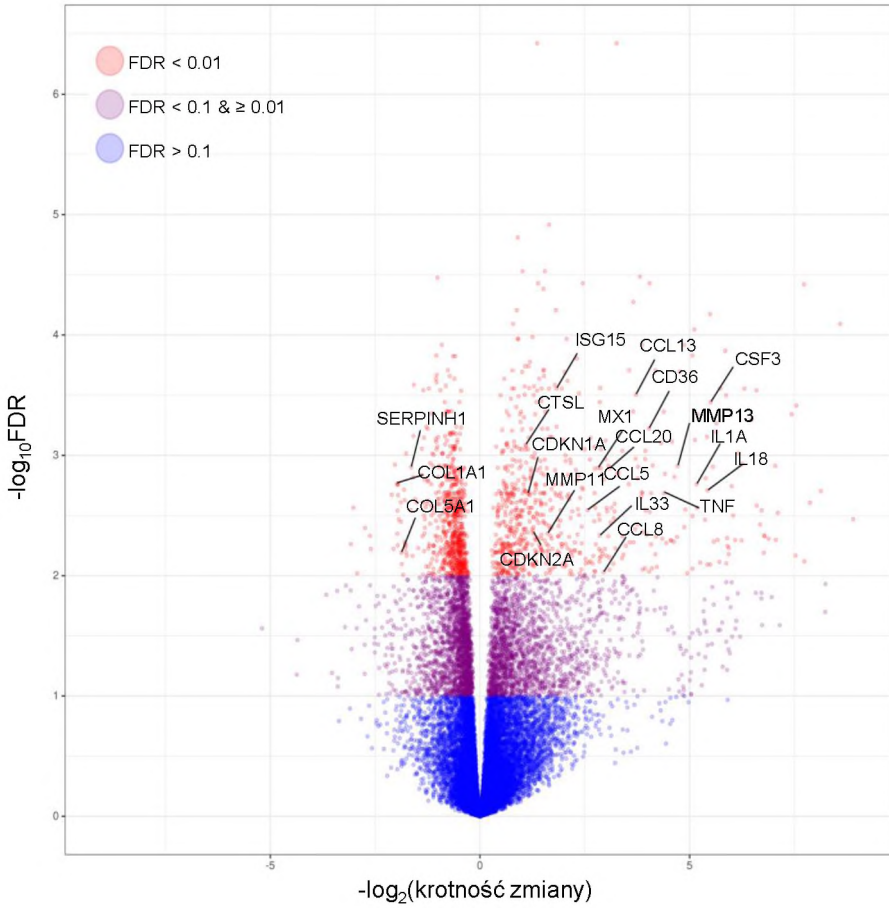
genów była podwyższona, a 96 obniżona. Natomiast po infekcji wykryto 538 genów, które w obecności decytabiny podlegały statystycznie istotnej regulacji. Spośród tych genów 429 ulegało indukcji w komórkach traktowanych decytabiną w stosunku do DMSO, a ekspresja pozostałych 109 ulegała redukcji. W obu przypadkach ok. 80% genów ulegało indukcji, co jest zgodne modelem zakładającym, że hipometylacja powoduje podwyższenie ekspresji genów. Interesujące z punktu widzenia patofizjologii PZP geny zaznaczono na wykresach rozrzutu (Ryc. 16 A, B). W kolejnym kroku przeprowadzono analizę procesów zawierających geny, których ekspresja była istotnie zmieniona (ang. *pathway enrichment analysis*). W komórkach traktowanych decytabiną, które następnie były infekowane *P. gingivalis* indukcji ulegały geny związane z odpowiedzią zapalną i immunologiczną (*CCL5*, *CCL8*, *CCL13*, *CCL20*, *TNF*, *IL1A*, *IL18*, *IL33* i *CSF3*). Warto dodać, że decytabina wywoływała też istotną statystycznie indukcję ekspresji *MMP11* i *MMP13*, które odpowiadają za degradację ECM, a proces ten jest silnie związany z patofizjologią PZP. Co ciekawe, analiza wykazała także podwyższenie ekspresji genów związanych z odpowiedzią antywirusową oraz transdukcją sygnału w ścieżce interferonu typu I (Ryc. 16C), co pokrywało się także z analizą przeprowadzoną w komórkach nieinfekowanych (Ryc. 16D). Natomiast geny, których ekspresja była obniżona w obecności decytabiny były głównie związane z organizacją włókien kolagenowych oraz ECM (*COL1A1*, *COL5A1*, *SERPINH1*) zarówno w komórkach infekowanych *P. gingivalis* (Ryc. 16E), jak i kontrolnych (Ryc. 16F).

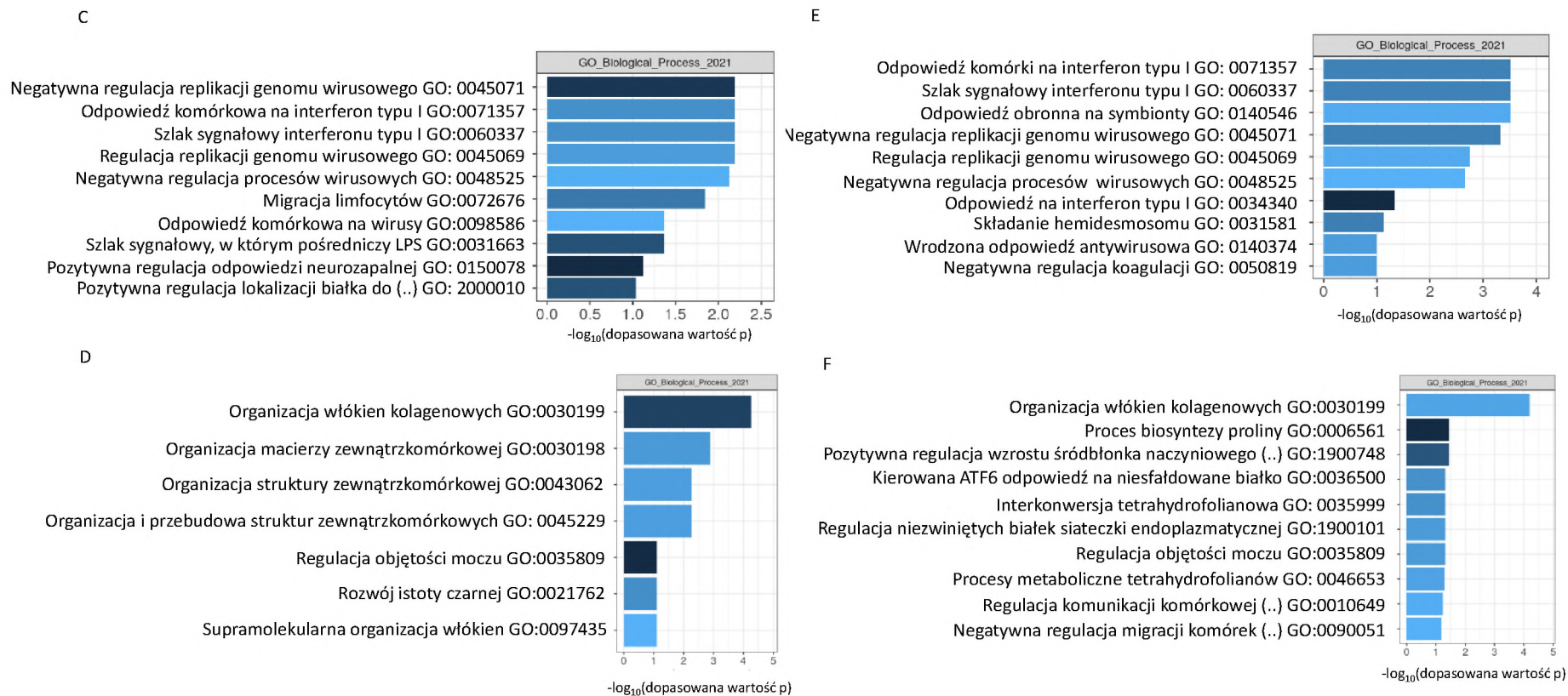
Przeprowadzona analiza transkryptomiczna pokazała, że decytabina indukuje szereg genów prozapalnych w GFs oraz może zaburzać regulatorowe funkcje GFs w utrzymaniu homeostazy tkanki łącznej. W kolejnych etapach badań przeprowadzono doświadczenia mające na celu weryfikację uzyskanych w przedstawionej analizie wyników oraz scharakteryzowanie funkcjonalnych konsekwencji działania decytabiny.

A



B



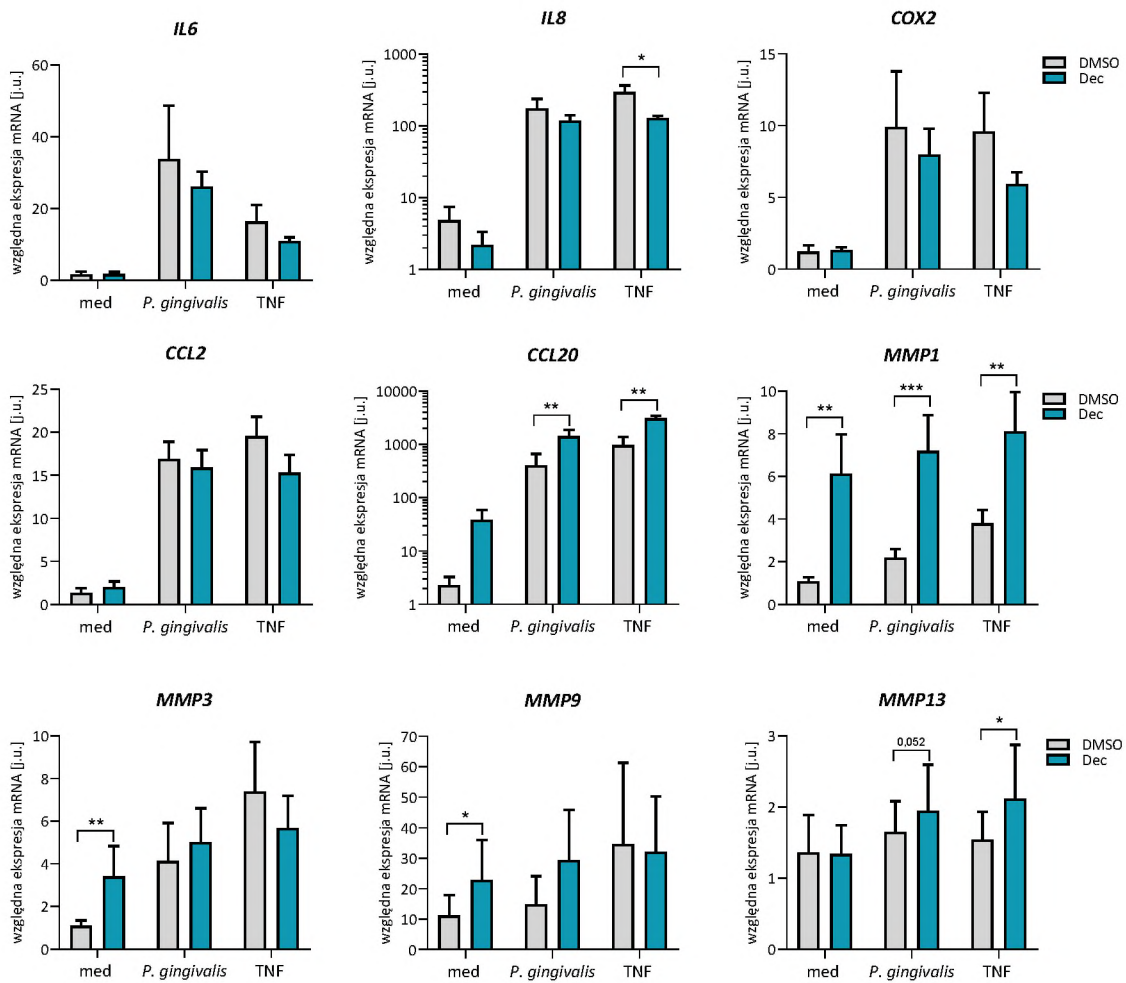


Rycina 16. Wpływ decytabiny na transkryptom. GFs hodowano w obecności DMSO lub decytabiny (5 μ M) przez 12 dni, po czym komórki zostawiono w pożywce lub infekowano *P. gingivalis* (MOI 20) przez 4h (n=5). Ekspresja genów została zmierzona za pomocą metody sekwencjonowania RNA. (A, B) Wykres rozrzutu danych pokazujący wartości $\log_2FC(FDR)$ i $-\log_2FC(FDR)$ w GFs hodowanych w obecności DMSO lub decytabiny, które pozostawiono w pożywce (A) lub infekowano *P. gingivalis* (B). (C-F) Analiza wzbogacenia szlaków genów (C, E) indukowanych lub (D, F) redukowanych przez decytabinę w (C, D) komórkach kontrolnych lub (E, F) traktowanych decytabiną. Zaprezentowano najlepsze trafienia w oparciu o wynik standardowy i skorygowaną wartość $p < 0,01$.

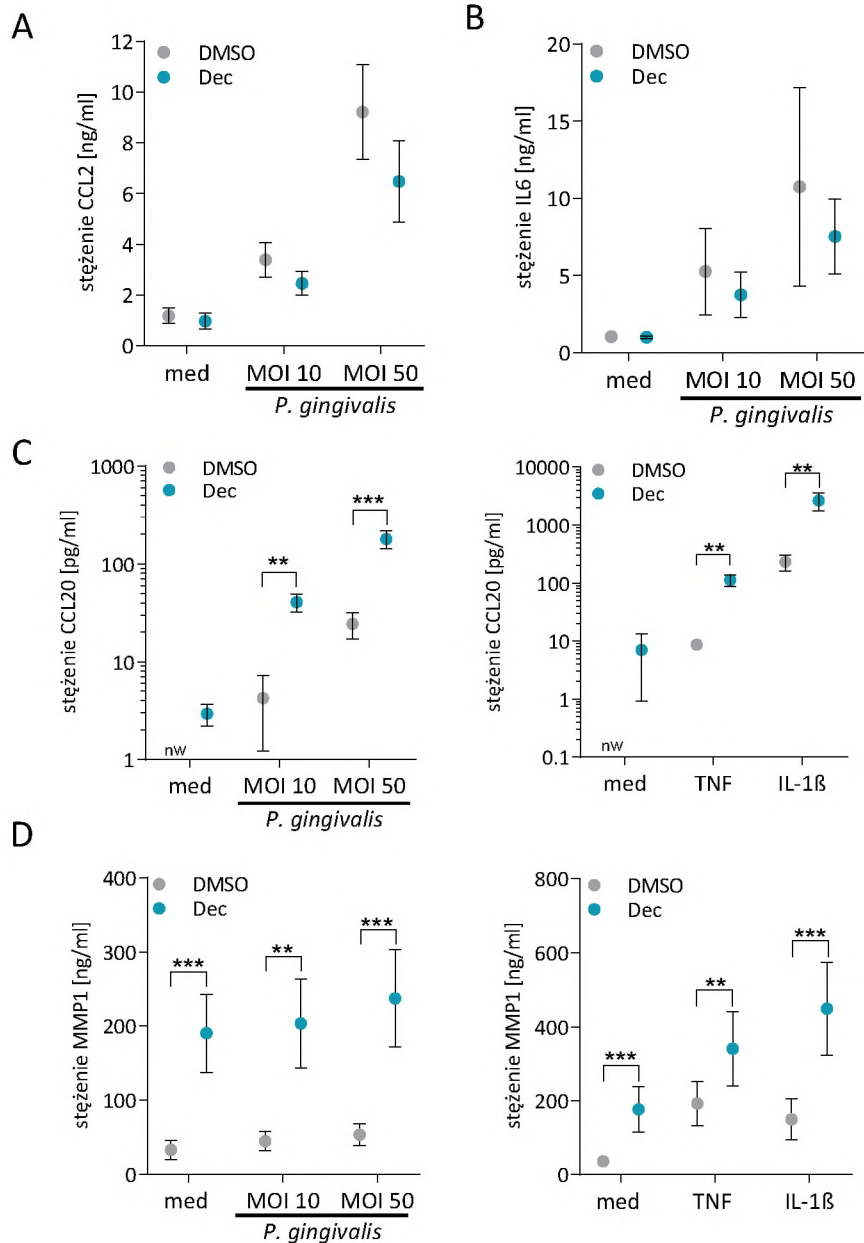
8.2.3 Decytabina indukuje ekspresję CCL20 i MMPs

Celem pierwszego etapu weryfikacji wyników analizy transkryptomicznej było potwierdzenie indukcji ekspresji wybranych genów (*CCL20* i *MMP13*) przez decytabinę w GFs infekowanych *P. gingivalis* lub stymulowanych TNF. TNF został wybrany do stymulacji zapalnej komórek ze względu na wysokie stężenie w płynie kieszonkowym pacjentów z PZP [148]. Zbadano również poziom ekspresji innych genów związanych ze stanem zapalnym w PZP: *IL6*, *IL8*, *COX2*, *CCL2* oraz MMPs: *MMP1*, *MMP3* i *MMP9*. Przeprowadzona analiza qPCR potwierdziła indukcję ekspresji *CCL20* i *MMP13* przez decytabinę, zarówno w komórkach infekowanych *P. gingivalis*, jak i stymulowanych TNF (Ryc. 17). Decytabina znacząco podwyższała także bazalny poziom ekspresji *MMP3* i *MMP9*, oraz ekspresję *MMP1* we wszystkich warunkach. Z kolei poziom ekspresji *IL8* był obniżony w komórkach, w których stymulacja TNF była poprzedzona hodowlą w obecności decytabiny. W przypadku *IL6*, *COX2* oraz *CCL2* odnotowano trendy w kierunku obniżenia poziomu ekspresji po inhibicji DNMT1 w GFs stymulowanych TNF lub infekowanych *P. gingivalis*, ale nie osiągnęły one istotności statystycznej (Ryc. 17). Następnie sprawdzono czy otrzymane wyniki analizy profilu ekspresji genów przekładają się na poziom białka wydzielanego do pożywki hodowlanej. Wykonano test ELISA dla wybranych białek – CCL2, IL-6, CCL20 oraz MMP1. Przeprowadzona analiza potwierdziła wcześniejsze obserwacje – poziom CCL2 (Ryc. 18A) oraz IL-6 (Ryc.18B) nie ulegał istotnym zmianom, natomiast ilość wydzielonych w odpowiedzi na *P. gingivalis* i cytokiny prozapalne CCL20 (Ryc. 18C) oraz MMP1 (Ryc. 18D) znacznie wzrosła w komórkach traktowanych decytabiną.

Przedstawione w tej części wyniki wskazały na różnorodność działania decytabiny względem określonych genów – z jednej strony zaobserwowano indukcję ekspresji i produkcji CCL20 oraz MMPs, a z drugiej odnotowano obniżenie ekspresji *IL8* oraz brak istotnych zmian ekspresji w przypadku *IL6* i *COX2*. Podwyższony poziom MMPs oraz CCL20 w tkankach przyzębia jest charakterystyczny dla patofizjologii PZP i może promować degradację ECM oraz infiltrację leukocytów do objętego stanem zapalnym dziąsła. Przedstawione wyniki potwierdzają zatem dane uzyskane w analizie transkryptomicznej.



Rycina 17. Wpływ decytabiny na ekspresję genów prozapalnych. Komórki hodowano przez 12 dni w obecności decytabiny (5 μ M), a następnie infekowano *P. gingivalis* (MOI 20) lub stymulowano TNF (10 ng/ml). Analiza qPCR ekspresji genów w GF po 4-godzinnej infekcji *P. gingivalis* lub stymulacji TNF (n=4-5). Wynik przedstawiony jako średnia względna ekspresja mRNA +SEM znormalizowana do genu referencyjnego (*RPLP0*). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

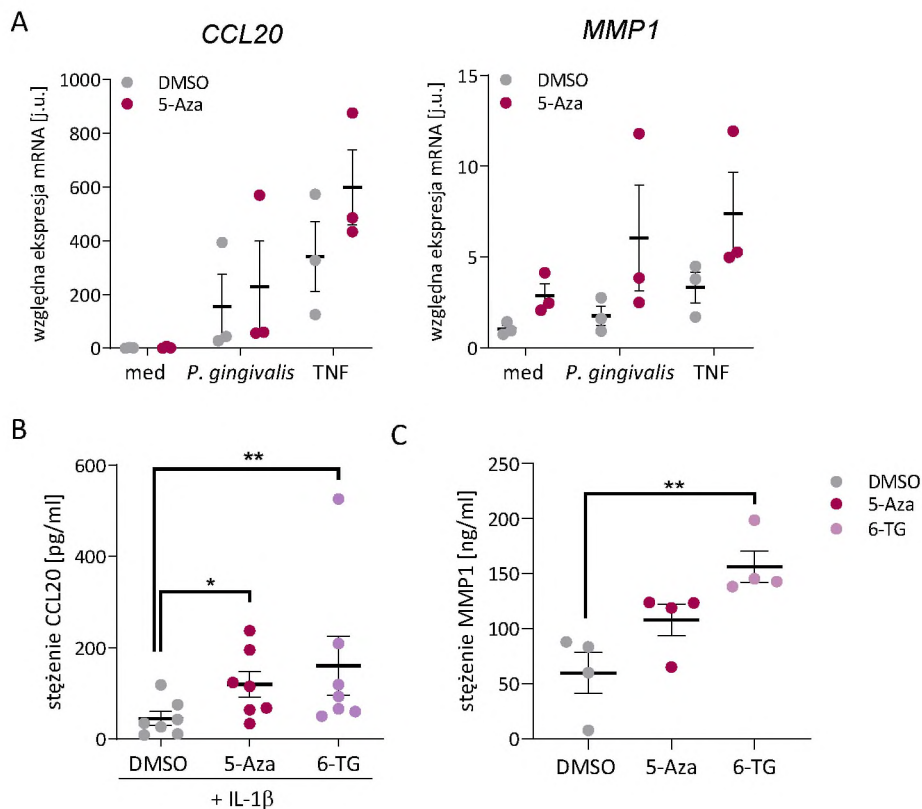


Rycina 18. Wpływ decytabiny na odpowiedź zapalną GFs. Komórki hodowano przez 12 dni w obecności decytabiny (5 μ M), a następnie infekowano *P. gingivalis* lub stymulowano TNF. Poziom (A) CCL2, (B) IL-6, (C, D) CCL20 oraz (E, F) MMP1 w pożywce hodowlanej po stymulacji TNF lub IL-1 β (10 ng/ml) przez 24h lub infekcji *P. gingivalis* (MOI10, 50) przez 1h, odptukaniu bakterii i hodowli w świeżej pożywce zawierającej antybiotyki przez kolejne 23h (n=3-8). Wynik przedstawiono jako średnia \pm SEM. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. nw – niewykrywalny poziom białka

8.2.4 Działanie innych inhibitorów DNMT1 na odpowiedź zapalną GFs potwierdza specyficzność działania decytabiny.

Celem kolejnego doświadczenia było zbadanie czy obserwowana indukcja CCL20 i MMP1 może wynikać z niespecyficznego działania decytabiny. W tym celu wykorzystano dwa inne inhibitory DNMT1 – 5-azacytydynę, która podobnie jak decytabina jest analogiem cytydyny

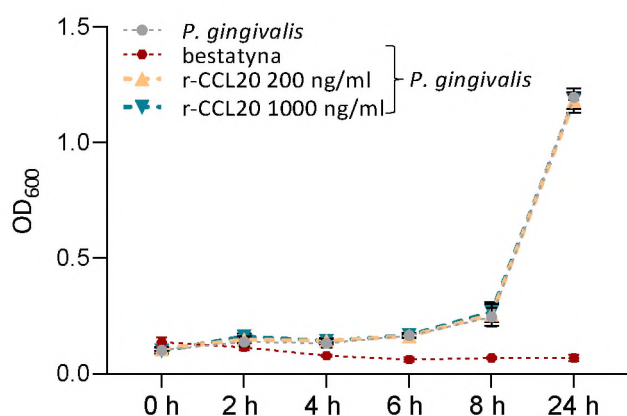
oraz 6-tioguaninę, która różni się strukturalnie od decytabiny. Otrzymane wyniki wskazały, że 5-azacytydyna podnosi poziom ekspresji *CCL20* i *MMP1* po infekcji *P. gingivalis* lub stymulacji TNF (Ryc. 19A). Pokazano także, że zarówno 5-azacytydyna, jak i 6-tioguanina podwyższały poziom wydzielanej do pożywki CCL20 po stymulacji IL-1 β (Ryc. 19B), jak również zwiększały bazalny poziom produkcji MMP1 (Ryc. 19C). Zaobserwowane podobieństwo efektów działania różnych inhibitorów DNMT1 dowodzi, że zwiększona ekspresja CCL20 i MMP1 najprawdopodobniej jest następstwem hipometylacji indukowanej w GFs przez zastosowane związki.



Rycina 19. Wpływ 5-azacytydyny i 6-tioguaniny na odpowiedź zapalną oraz funkcje biologiczne GFs. Komórki hodowano przez 12 dni w obecności DMSO, 5-azacytydyny (5-Aza; 5 μ M) lub 6-tioguaniny (6-TG; 10 μ M). (A) Analiza ekspresji *CCL20* i *MMP1* w komórkach traktowanych 5-Aza oraz infekowanych *P. gingivalis* (MOI 20) lub stymulowanych TNF (10 ng/ml) przez 4h (n=3). Wynik przedstawiono jako średnią względną ekspresję mRNA \pm SEM wraz z wartościami uzyskanymi dla poszczególnych dawców. Jako genu referencyjnego użyto *RPLPO*. (B) Poziom produkcji CCL20 po 24h stymulacji IL-1 β (10 ng/ml) w GFs hodowanych w obecności 5-azacytydyny lub 6-tioguaniny (n=7). (C) Bazalny poziom produkcji MMP1 w GFs po inkubacji z inhibitorami (n=4). (B, C) Dane wyrażone jako średnia \pm SEM wraz z poszczególnymi wartościami. *p<0,05; **p<0,01

8.2.5 Decytabina produkowana przez GFs w obecności inhibitorów DNMT1 nie wykazuje działania antybakteryjnego

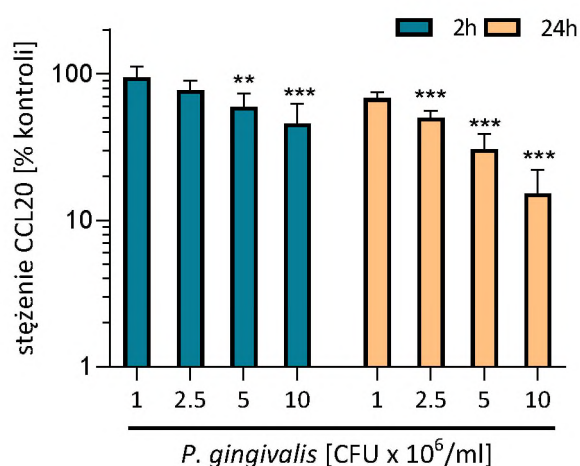
Powyższe wyniki wskazały, że związki hipometylujące w znacznym stopniu podwyższają poziom CCL20, a efekt ten był szczególnie silny wskutek działania decytabiny. CCL20 jest białkiem, które może pełnić dwojaką funkcję. Z jednej strony jest to chemokina prozapalna, która może stymulować napływ leukocytów do objętego stanem zapalnym dziąsła [154], a z drugiej strony istnieją prace pokazujące, że CCL20 może wykazywać działanie antybakteryjne [155]. Aby sprawdzić czy zwiększone ilości CCL20 produkowanej przez GFs pod wpływem decytabiny wpływają na żywotność *P. gingivalis*, bakterie hodowano w obecności rekombinowanej CCL20 (r-CCL20) przez 24h. Jako kontroli użyto bestatyny, która hamuje wzrost *P. gingivalis* [147]. Otrzymane krzywe wzrostu pokazały, że bestatyna ma silne działanie bakteriostatyczne, natomiast CCL20, nawet w stężeniach znacznie wyższych niż obserwowane w pożywkach hodowlanych GFs traktowanych decytabiną (1000 ng/ml), nie wpłynęła na wzrost *P. gingivalis* (Ryc. 20).



Rycina 20. Wpływ CCL20 na przeżywalność *P. gingivalis*. W celu zbadania antybakteryjnych właściwości CCL20, *P. gingivalis* hodowano w warunkach behtlenowych z rekombinowaną CCL20 (r-CCL20) w stężeniach 200 i 1000 ng/ml do 24h. Jako kontroli użyto bestatyny (5 mg/ml), która hamuje wzrost *P. gingivalis*. Dane pokazane jako średnie wartości OD₆₀₀ w danym punkcie czasowym ± SEM połączone liniami (n=3).

Ponieważ gingipainy będące jednym z głównych czynników wirulencji *P. gingivalis* które wykazują bardzo silne właściwości proteolityczne zbadano, czy bakteria ta w warunkach odpowiadających infekcji komórek wywołuje degradację CCL20. W celu sprawdzenia tej hipotezy, *P. gingivalis* o różnym mianie inkubowano z r-CCL20 w pożywce hodowlanej. Za pomocą testu ELISA zmierzono poziom CCL20 w pożywce. Zaobserwowano, że im większe miano *P. gingivalis* tym silniejsza degradacja w porównaniu z kontrolą. Odnotowano także, że poziom CCL20 był niższy po 24h inkubacji w obecności bakterii w porównaniu z 2h (Ryc. 21). Otrzymane wyniki pokazują, że CCL20 ulega degradacji przez *P. gingivalis*, dlatego prawdopodobnie podwyższone ilości CCL20 po traktowaniu GFs decytabiną nie będą wywierać bezpośredniego bakteriostatycznego działania względem bakterii. Nie wyklucza to

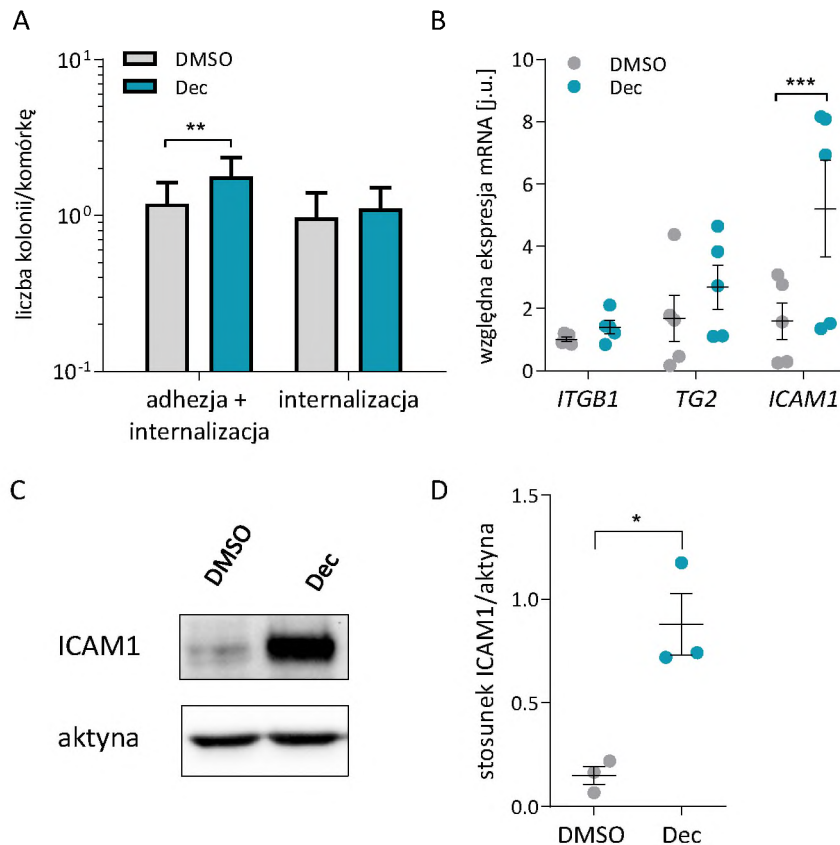
jednak prozapalnego działania chemokiny na komórki układu immunologicznego w obszarach tkanki dziąsła, w których nie będzie ona poddana proteolitycznej aktywności *P. gingivalis*.



Rycina 21. Wpływ *P. gingivalis* na degradację CCL20. *P. gingivalis* wraz z r-CCL20 (200 ng/ml) inkubowano przez 2h lub 24h w pożywce komórkowej w temperaturze 37°C i atmosferze zawierającej 5% CO₂ (n=4). Następnie za pomocą testu ELISA zmierzono stężenie CCL20, a wynik przedstawiono jako średnią + SEM wyrażoną jako % kontroli. Kontrolę stanowiła pożywka z r-CCL20 w danym punkcie czasowym. Na wykresie zaznaczono istotność statystyczną policzoną względem kontroli dla każdego punktu czasowego. **p<0,01; ***p<0,001

8.2.6 Decytabina ułatwia adhezję *P. gingivalis* do GFs

W celu zweryfikowania czy zakres działania decytabiny wykracza poza regulację ekspresji mediatorów stanu zapalnego, GFs infekowano *P. gingivalis* i sprawdzano wpływ inhibitora na adhezję i internalizację bakterii. Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że decytabina nie wpływa na internalizację *P. gingivalis*, ale ułatwia adhezję bakterii do GFs (Ryc. 22A). Chcąc sprawdzić, która z molekuł związanych z adhezją *P. gingivalis* w GFs może być odpowiedzialna za obserwowany efekt, przeprowadzono analizę qPCR ekspresji *ITGB1*, *TG2* i *ICAM1*. Odnotowano zwiększenie poziomu ekspresji *ICAM1* w komórkach traktowanych decytabiną, bez wpływu na ekspresję pozostałych genów (Ryc. 22B). Zwiększoną produkcję ICAM1 potwierdzono także na poziomie białka za pomocą metody western blot (Ryc. 22C, D). Podsumowując, przeprowadzone doświadczenia pokazały, że decytabina nie tylko reguluje aktywację zapalną GFs, ale również wpływa na interakcję komórek z bakteriami najprawdopodobniej poprzez indukcję białka ICAM1 ułatwiającego adhezję patogenu do GFs.



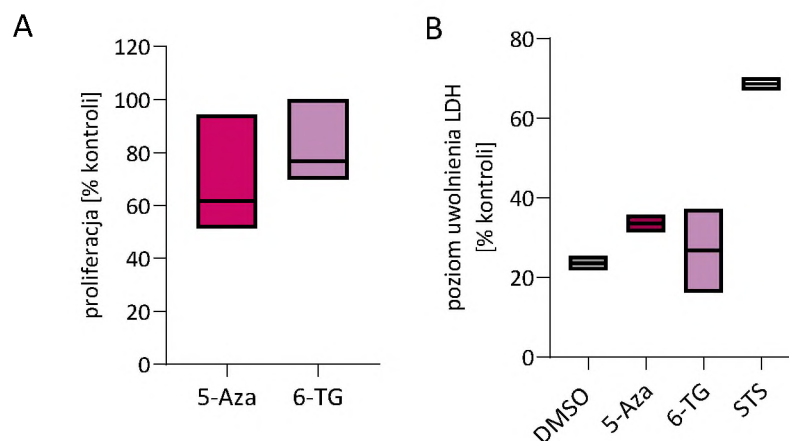
Rycina 22. Wpływ decytabiny na internalizację *P. gingivalis* i ekspresję molekuł adhezyjnych. GFs hodowano w obecności DMSO lub decytabiny (Dec; 5 μ M) przez 12 dni po czym komórki rozsiewano i infekowano *P. gingivalis*. (A) Komórki infekowano *P. gingivalis* (MOI 100) przez godzinę, po czym bakterie odpłukiwano i hodowano w świeżej pożywce z antybiotykami (internalizacja) lub bez (adhezja + internalizacja) przez kolejną godzinę (n=8). Dane zaprezentowane jako średnia liczba kolonii bakteryjnych w przeliczeniu na jedną komórkę +SEM. (B) Analiza qPCR ekspresji genów kodujących molekuły adhezyjne (n=5). Wynik przedstawiono jako średnią względną ekspresję mRNA + SEM wraz z poszczególnymi wartościami policzoną względem genu referencyjnego (*RPLP0*). (C, D) Analiza western blot ekspresji ICAM1. (C) Na rycinie zaprezentowano jedno z 3 reprezentatywnych powtórzeń (n=3). (D) Analiza densytometryczna intensywności sygnału dla ICAM1 oraz aktyny, wyrażona jako średni stosunek ICAM1/aktyna wraz z wartościami uzyskanymi dla kolejnych powtórzeń (n=3). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

8.2.7 Decytabina osłabia proliferację GFs oraz wykazuje działanie cytotoksyczne

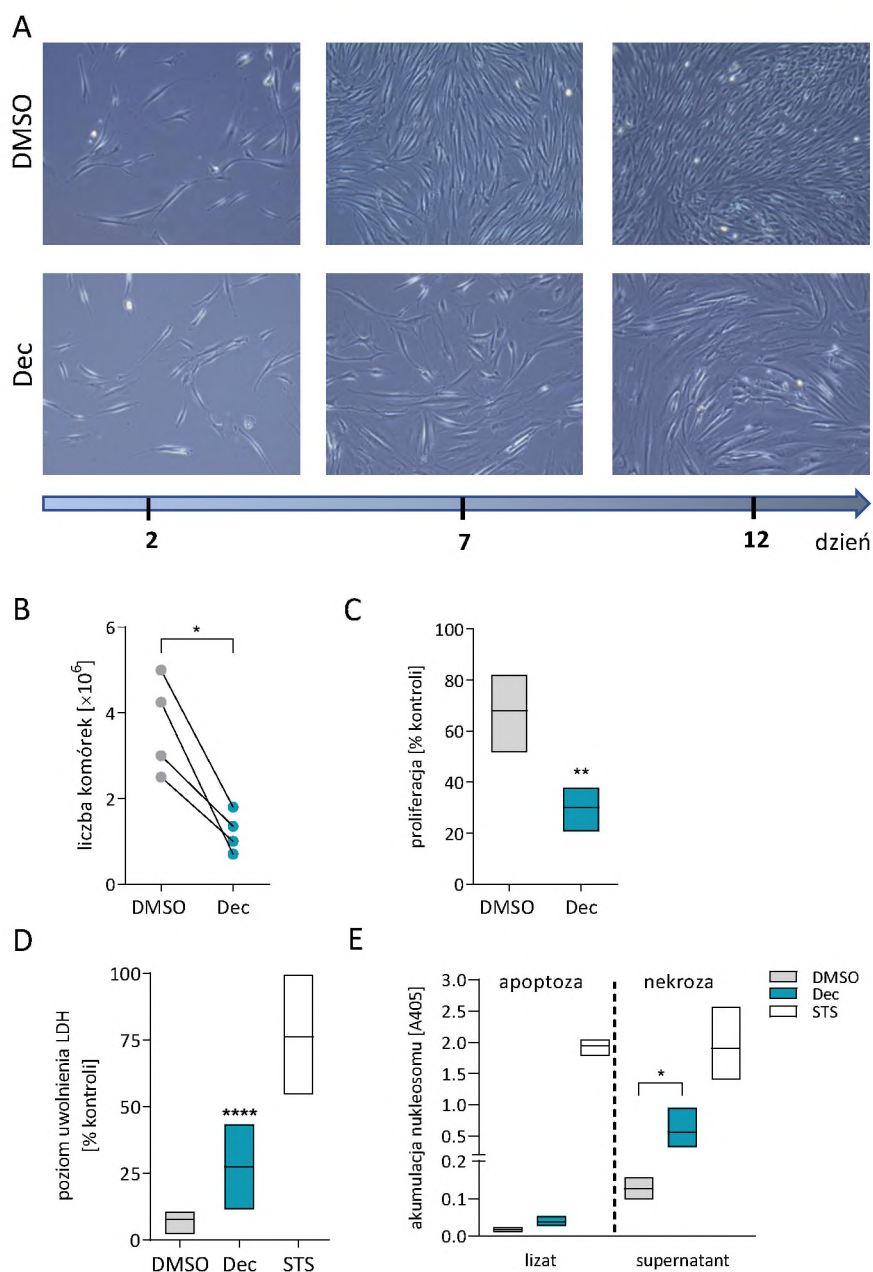
Analiza transkryptomyczna wykazała podwyższoną ekspresję genów kodujących inhibitory kinaz zależnych od cyklin (*CDKN1A*, *CDKN2A*) w komórkach traktowanych decytabiną. Ponieważ kodowane przez te geny białka p21 i p16 są istotnymi regulatorami podziałów komórkowych, w kolejnym etapie doświadczeń sprawdzono wpływ związku na proliferację oraz żywotność GFs. Zaobserwowano, że decytabina wyraźnie obniżała tempo wzrostu i całkowitą liczbę komórek po 12-dniowej hodowli w obecności inhibitora (Ryc. 23A, B). Test na inkorporację BrdU potwierdził, że decytabina zmniejsza proliferację GFs o ok. 65% (Ryc.

23C). Z kolei test LDH wskazał na cytotoksyczność decytabiny w użytym stężeniu (Ryc. 23D). Przeprowadzona analiza obecności kompleksów DNA-histony we frakcjach cytozolowych komórek oraz w pożywce hodowlanej pozwoliła stwierdzić, że decytabina indukuje nekrotyczną śmierć GFs, nie wpływając przy tym na apoptozę (Ryc. 23E). Dla porównania sprawdzono także wpływ 5-azacytydyny i 6-tioguaniny na tempo wzrostu komórek oraz zbadano cytotoksyczność tych związków. 5-azacytydyna silniej niż 6-tioguanina (choć w stopniu, który nie uzyskał istotności statystycznej) hamowała proliferację GFs (Ryc. 24A), jak również wykazywała silniejszy efekt cytotoksyczny (Ryc. 24B). Wynik taki nie jest zaskakujący, biorąc pod uwagę podobieństwo strukturalne 5-azacytydyny i decytabiny.

Podsumowując, wyniki te wskazują na niekorzystne działanie decytabiny na proliferację i żywotność GFs oraz sugerują, że obserwowane efekty mogą wynikać z cytotoksycznego działania decytabiny.



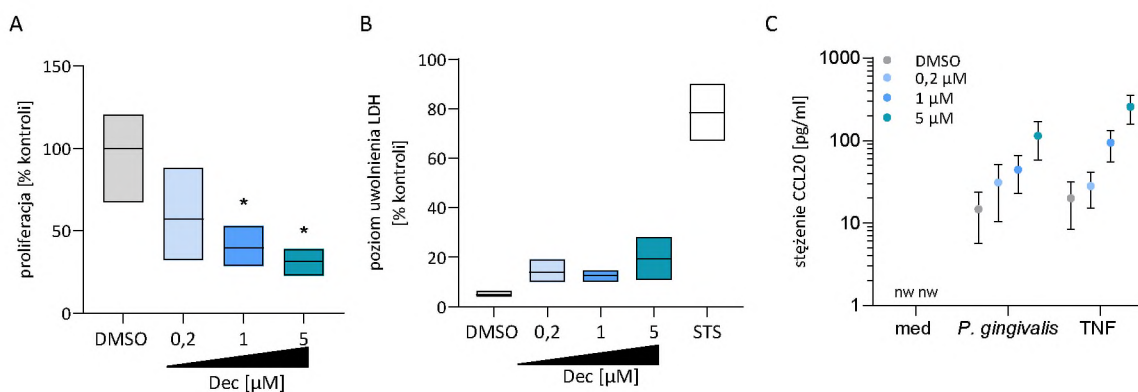
Rycina 24. Wpływ 5-azacytydyny i 6-tioguaniny na proliferację i żywotność GFs. Komórki hodowano w obecności inhibitorów przez 12 dni, co 4 dni wymieniając pożywkę ze świeżą porcją związków. (A) Proliferacja zmierzona za pomocą testu na inkorporację BrdU (n=3). Dane przedstawione jako średni % kontroli +SEM, którą stanowiły komórki hodowane w obecności DMSO. (B) Cytotoksyczność związków zmierzona jako poziom uwolnienia LDH do pożywki (n=2). Jako kontroli pozytywnej użyto komórek traktowanych staurosporyną (STS, 1 μ M) przez 24h. (A, B) Dane przedstawione w formie wykresów pudełkowych ze średnią i zakresem.



Rycina 23. Wpływ decytabiny na proliferację i żywotność GF. Komórki hodowano w obecności DMSO lub decytabiny (Dec; $5\mu\text{M}$) przez 12 dni. (A) Mikrografie przedstawiające komórki w drugim, siódmym i dwunastym dniu eksperymentu wykonane w kontraście faz przy powiększeniu 100x. (B) Całkowita liczba komórek ($n=4$) oraz (C) szybkość proliferacji wyrażona jako % kontroli ($n=6$). (D) Cytotoksyczność zmierzona za pomocą testu LDH, wyniki przedstawione jako średni poziom uwolnienia LDH do pożywki policzony względem kontroli, którą stanowiły komórki do których dodano buforu lizującego ($n=7$). (E) Poziom akumulacji kompleksów DNA-histony we frakcjach cytozolowych lub w pożywce hodowlanej zebranej z nad komórek wyrażony jako sygnał absorbancji zmierzony przy 405 nm ($n=3-4$). (B-E) Wyniki zaprezentowane w formie wykresów pudełkowych z zaznaczoną średnią wraz z zakresem. * $p<0,05$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$

8.2.8 Efekty działania decytabiny są zależne od dawki

Wykorzystane w powyższych doświadczeniach stężenie decytabiny (5 μM) zostało wybrane w oparciu o dostępne dane literaturowe [143], [145], [156] oraz wyniki pomiarów stężenia inhibitora w osoczu krwi pacjentów onkologicznych poddawanych terapii decytabiną [157], [158]. Ze względu jednak na niekorzystne efekty decytabiny na żywotność GFs, trafność wyboru dawki inhibitora wymaga pogłębionej weryfikacji. Dlatego też w kolejnym kroku sprawdzono w jaki sposób niższe stężenia decytabiny (0,2 μM i 1 μM) wpływają na funkcje biologiczne GFs i ich odpowiedź na infekcję *P. gingivalis* oraz stymulację TNF. Zaobserwowano dawko-zależną redukcję proliferacji GFs (Ryc. 25A), jak również wzrost cytotoksyczności związku (Ryc. 25B). Dla wyższych stężeń decytabiny (1 μM , 5 μM) zanotowano także wzrost produkcji CCL20 w odpowiedzi na *P. gingivalis* lub TNF (Ryc. 25C). Efekt podwyższonej produkcji CCL20 przez GFs w najniższym zastosowanym stężeniu decytabiny (0,2 μM) był jednak zbyt słaby, aby umożliwić precyzyjne badanie regulacji aktywacji zapalnej komórek przy relatywnie niższym poziomie cytotoksyczności. Z tego względu warunki doświadczalne wybrane na podstawie literatury zostały wykorzystane do dalszych analiz.



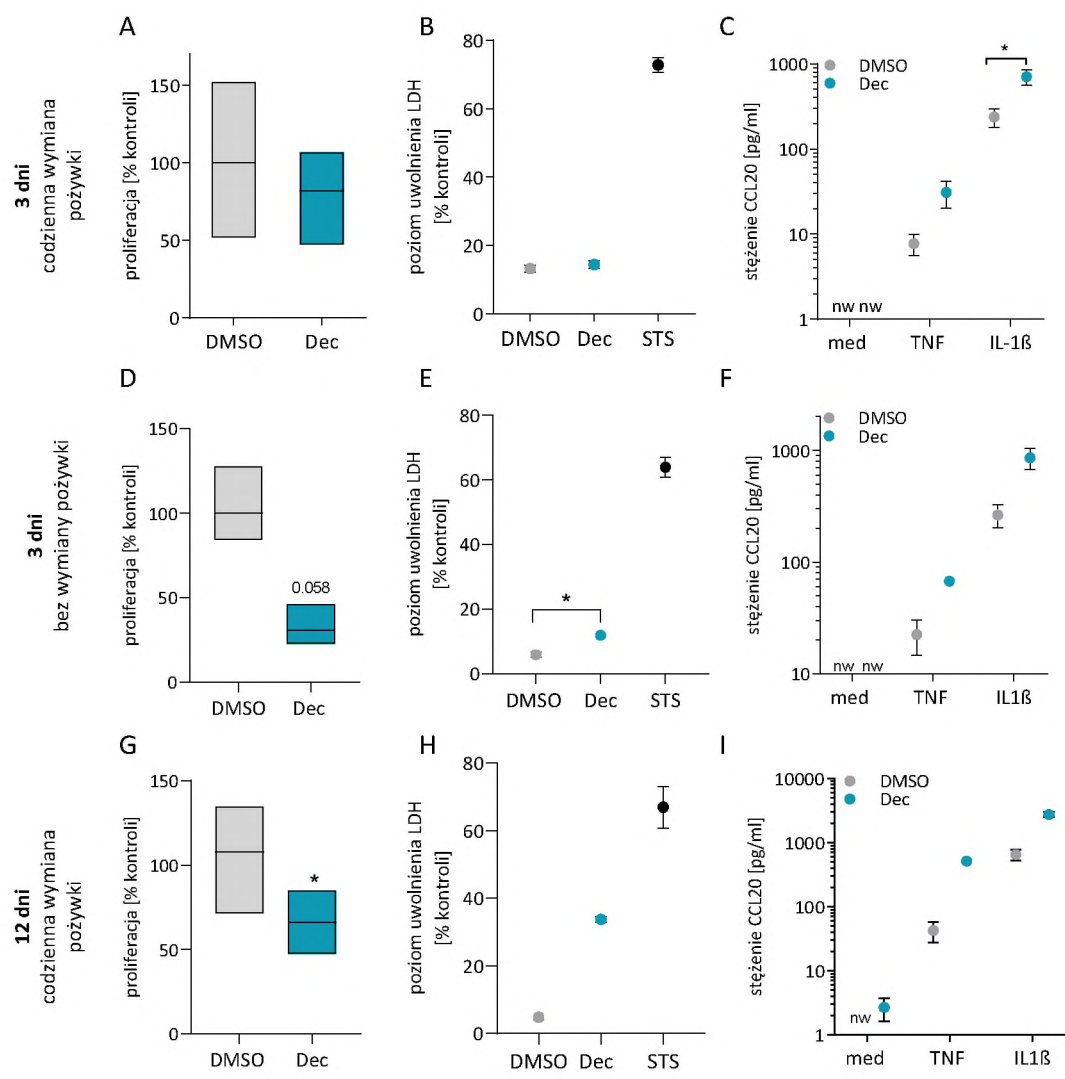
Rycina 25. Wpływ niższych dawek decytabiny na funkcje biologiczne GFs oraz ich odpowiedź zapalną.

GFs traktowano DMSO lub decytabiną (Dec; 0,2 μM , 1 μM lub 5 μM) przez 12 dni, co 4 dni wymieniając pożywkę i dodając świeżą porcję inhibitora. (A) Poziom proliferacji zmierzony za pomocą testu na inkorporację BrdU (n=5) oraz (B) poziom uwolnienia LDH jako wskaźnik cytotoksyczności związku wyrażone jako % kontroli (n=5). Kontrolę do testu LDH stanowiły komórki, do których dodano buforu lizującego, natomiast GFs traktowane staurosporyną (STS; 1 μM) stanowiły kontrolę pozytywną. (A, B) Wyniki zaprezentowane jako wykresy pudełkowe z zaznaczoną średnią wraz zakresem. (C) Poziom produkcji CCL20 zmierzony za pomocą testu ELISA (n=2-5). Dane przedstawione jako średnia \pm SEM. nw – niewykrywalny poziom białka

8.2.9 Produkty rozpadu decytabiny mają znikomy wpływ na efekty jej działania na funkcje GFs

Przedstawione powyżej dane sugerują, że niekorzystny wpływ decytabiny na funkcje biologiczne GFs może być konsekwencją jej cytotoksycznego działania. Istnieją dane literaturowe pokazujące, że czas połowicznego rozpadu decytabiny w warunkach fizjologicznych wynosi 11h, a niektóre z produktów rozpadu inhibitora mogą wykazywać działanie toksyczne [159]. W wykorzystanym w powyższych doświadczeniach modelu, świeża porcja inhibitora była dodawana co 4 dni, co pozwalało na nagromadzenie się produktów jego rozpadu w pożywce. W celu zweryfikowania czy toksyczne produkty rozpadu decytabiny są odpowiedzialne za jej cytotoksyczne działanie na hodowle GFs, przetestowano alternatywne schematy doświadczalne, w których pożywkę wymieniało się codziennie przez 3 i 12 dni, za każdym razem dodając świeżą porcję inhibitora. Codzienna wymiana pożywki ze świeżą porcją inhibitora przez 3 dni nie wpłynęła w sposób znaczący na proliferację (Ryc. 26A) oraz żywotność GFs (Ryc. 26B). Dla porównania – 3-dniowa hodowla GFs w obecności decytabiny bez wymiany pożywki spowodowała obniżenie proliferacji komórek (Ryc. 26D) oraz wywoływała efekt cytotoksyczny (Ryc. 26E). W obu modelach odnotowano także zwiększoną produkcję CCL20 (Ryc. 26C, F). Sprawdzone również czy codzienna wymiana pożywki podczas 12-dniowej hodowli komórek w obecności decytabiny moduluje efekty działania decytabiny na proliferację i żywotność GFs oraz produkcję CCL20. W modelu tym decytabina hamowała proliferację GFs o ok. 70% (Ryc. 26G), jak również wywołała silny efekt cytotoksyczny (Ryc. 21H). Utrzymała się również tendencja do zwiększonej produkcji CCL20 (Ryc. 26I). Efekty te były zatem bardzo zbliżone do modelu wyjściowego (Ryc. 23 C, D, Ryc. 18C).

Przedstawione dane sugerują, że o ile cytotoksyczny efekt decytabiny może zostać wyeliminowany podczas krótkiej inkubacji komórek z inhibitorem, o tyle podczas dłuższej hodowli, pomimo codziennej wymiany pożywki, efekt cytotoksyczny oraz antyproliferacyjny jest nadal obserwowany. Wyniki te sugerują zatem, że wpływ decytabiny na żywotność GFs przynajmniej częściowo jest konsekwencją specyficznej aktywności inhibitora i jego cytotoksyczne działanie nie może zostać oddzielone od efektów związanych z aktywacją zapalną komórek. Niezależnie od użytego modelu produkcja CCL20 była podwyższona. Wynik ten sugeruje, że zwiększony poziom CCL20 jest bezpośrednim wynikiem hipometylującego działania decytabiny, a udział produktów rozpadu inhibitora w tym przypadku może zostać pominięty.

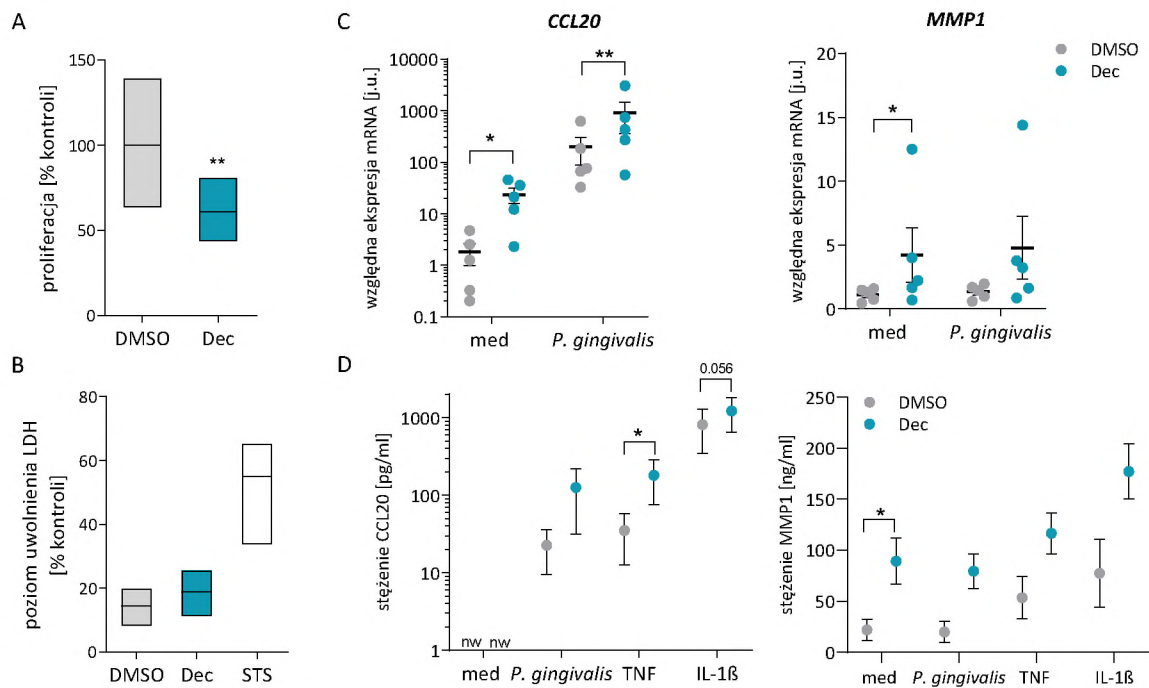


Rycina 26. Wpływ produktów rozpadu decytabiny na funkcje biologiczne GFs oraz produkcję CCL20.

Komórki hodowano w obecności decytabiny i DMSO przez 3 dni (A-C) codziennie wymieniając pożywkę i dodając świeżą porcję związków lub (D-F) bez wymiany pożywki w międzyczasie. (G-I) Prowadzono również hodowlę GFs w obecności decytabiny i DMSO przez 12 dni, podczas których pożywka wraz ze związkami była wymieniana codziennie. (A, D, G) Poziom proliferacji GFs wyrażony jako % kontroli, którą stanowiły komórki hodowane w obecności DMSO (n=3-4). Na wykresach przedstawiono średnie wraz z zakresami. (B, E, H) Poziom uwolnienia LDH policzony w stosunku do kontroli, którą stanowił lisat komórkowy. Jako kontroli pozytywnej użyto staurosporyny (STS; 1 μ M). (n=3-4). (C,F, I) Poziom CCL20 w pożywce komórkowej po 24-godzinnej stymulacji GFs TNF lub IL-1 β (oba w stężeniach 10 ng/ml) (n=2-3). (B,C, E, F, H, I) Wyniki przedstawione jako średnia \pm SEM. *p<0,05; ****p<0,0001; nw – niewykrywalny poziom białka

8.2.10 Decytabina niekorzystnie wpływa na funkcje biologiczne PDLFs oraz na ich odpowiedź zapalną

W celu sprawdzenia czy niekorzystne działanie decytabiny jest specyficzne tylko dla GFs, przeprowadzono analogiczne doświadczenia na PDLFs. Podobnie jak w przypadku GFs, decytabina obniżała proliferację PDLFs (Ryc. 27A), jednak jej wpływ na żywotność był już mniej widoczny (Ryc. 27B). Z kolei analiza qPCR wykazała indukcję ekspresji *CCL20* zarówno w komórkach nieinfekowanych, jak i infekowanych *P. gingivalis* (Ryc. 27C), chociaż na poziomie białka wynik ten nie osiągnął istotności statystycznej, wykazując jedynie trend w kierunku podwyższonej produkcji *CCL20* (Ryc. 27D). Z kolei bazalna ekspresja mRNA i białka MMP1 była znacznie podwyższona w obecności decytabiny (Ryc. 27.C, D). Zaobserwowano także, że decytabina podwyższa produkcję *CCL20* i MMP1 w PDLFs stymulowanych cytokinami prozapalnymi, jednak tylko dla *CCL20* efekt ten osiągnął istotność statystyczną (Ryc. 27D). Powyższe obserwacje pokazują zatem, że prozapalne i antyproliferacyjne efekty działania decytabiny nie są specyficzne jedynie dla GFs i dotyczą również innych populacji fibroblastów. Wyniki te sugerują, że decytabina działa niekorzystnie na komórki strukturalne dziąsła, które w obecności inhibitora przybierają bardziej zapalny fenotyp, co mocno ogranicza jego potencjał terapeutyczny. Przedstawione w tej części pracy wyniki pokazują natomiast, że decytabina jest dobrym narzędziem do badania wpływu metylacji DNA na funkcje biologiczne komórek dziąsła w PZP.



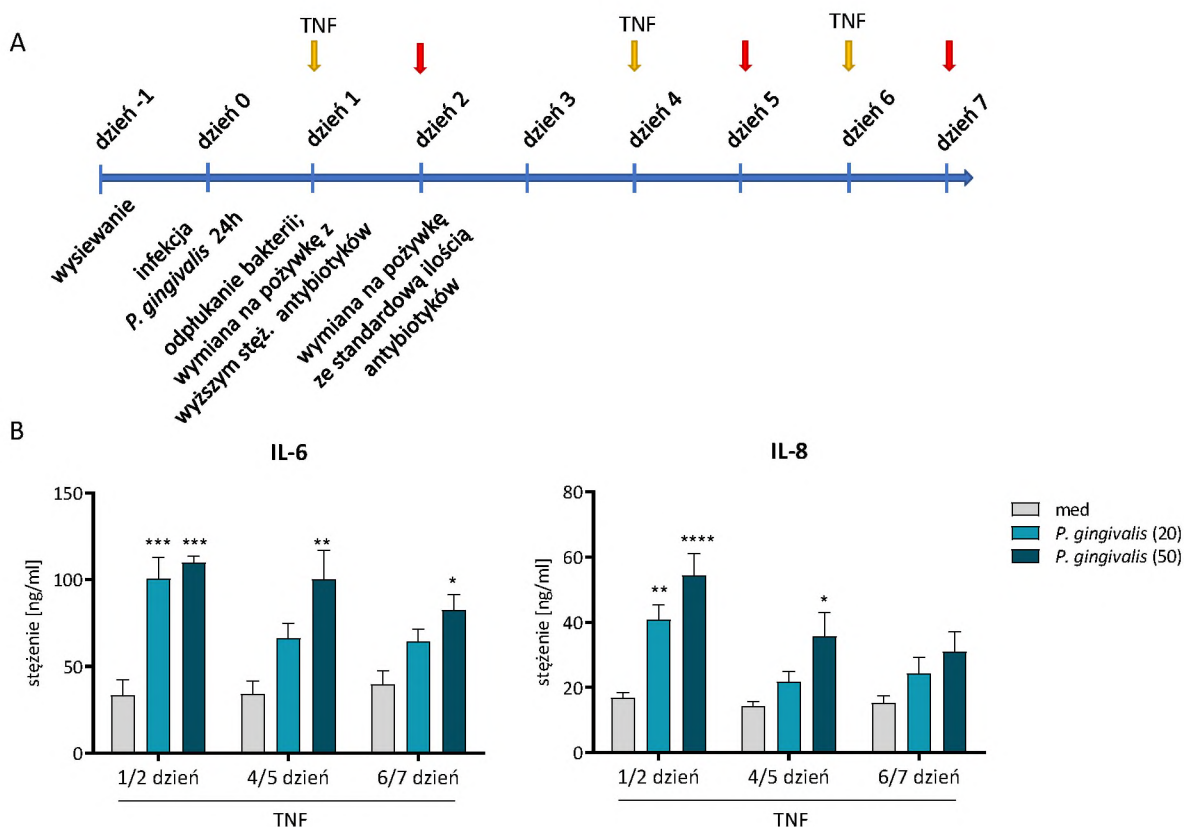
Rycina 27. Wpływ decytabiny na funkcje biologiczne i odpowiedź zapalną PDLFs. PDLFs hodowano w obecności DMSO lub decytabiny (Dec; 5 μ M) przez 12 dni. (A) Proliferaacja komórek wyrażona jako % kontroli zmierzona za pomocą testu na inkorporację BrdU (n=4). (B) Poziom uwolnienia LDH jako wskaźnik cytotoxyczności związku przedstawiony jako % kontroli, którą były komórki zawieszony w buforze lizującym. Kontrolę pozytywną stanowiły komórki inkubowane przez 24h ze stuarosporyną (STS; 1 μ M)(n=5). (A, B) Dane zaprezentowane jako średnie wraz z zakresem. (C) Analiza qPCR ekspresji *CCL20* i *MMP1* po 4-godzinnej infekcji *P. gingivalis* (MOI 20) (n=5). Wyniki pokazane jako średnia względna ekspresja mRNA \pm SEM wraz z poszczególnymi punktami. Jako genu referencyjnego użyto *RPLPO*. (D) Poziom produkcji *CCL20* i *MMP1* w PDLFs infekowanych przez godzinę *P. gingivalis* (MOI 50), odptukanii bakterii i dalszej hodowli przez 23 h w pożywce z gentamycyną (0,25 mg/ml) i metronidazolem (0,2 mg/ml) lub stymulowanych TNF lub IL-1 β (oba w stężeniu 10 ng/ml) przez 24h (n=3-4). Wyniki zaprezentowano jako średnia \pm SEM. *p<0,05; **p<0,01; nw – niewykrywalny poziom białka

8.3 Badanie długotrwałych skutków infekcji *P. gingivalis* na aktywację zapalną GFs

8.3.1 *P. gingivalis* wywołuje długotrwałe efekty na aktywację zapalną GFs

Celem przedstawionych w tej części eksperymentów było zoptymalizowanie modelu, który pozwoliłby na określenie długofalowych skutków infekcji *P. gingivalis* w GFs i zweryfikowanie potencjalnej roli mechanizmów epigenetycznych w tym procesie. Aby uzyskać warunki zbliżone do (pato)fizjologicznych, w których komórki wystawione są zarówno na działanie mikroflory bakteryjnej, jak i środowiska zapalnego, GFs pre-infekowano *P. gingivalis*, następnie bakterie usuwano z hodowli, zaś komórki poddawano stymulacji TNF w różnych odstępach czasowych, aż do siódmego dnia po infekcji.

Wstępna optymalizacja modelu przedłużonej infekcji polegała na pre-infekcji GFs *P. gingivalis* MOI 20 lub 50 przez 24h. Następnie bakterie odpłukiwano, a komórki stymulowano TNF przez 24 h natychmiast po usunięciu bakterii (dzień 1), w czwartym lub szóstym dniu od infekcji wg schematu zamieszczonego na Ryc. 28A. Zaobserwowano synergistyczne podwyższenie poziomu produkcji cytokin prozapalnych – IL-6 oraz IL-8 w komórkach poddanych stymulacji TNF zaraz po infekcji. Efekt taki utrzymywał się również w GFs stymulowanych za pomocą TNF w piątym i siódmym dniu po infekcji, przy czym tylko dla warunku, gdzie komórki były pre-infekowane *P. gingivalis* MOI 50 osiągnął on istotność statystyczną (Ryc. 28B). Ponieważ założeniem eksperymentu było zbadanie długotrwałych efektów infekcji na aktywację zapalną GFs, do dalszych doświadczeń wybrano warunki, w których komórki były hodowane możliwie najdłużej, by efekt był widoczny, a więc do siódmego dnia po infekcji.



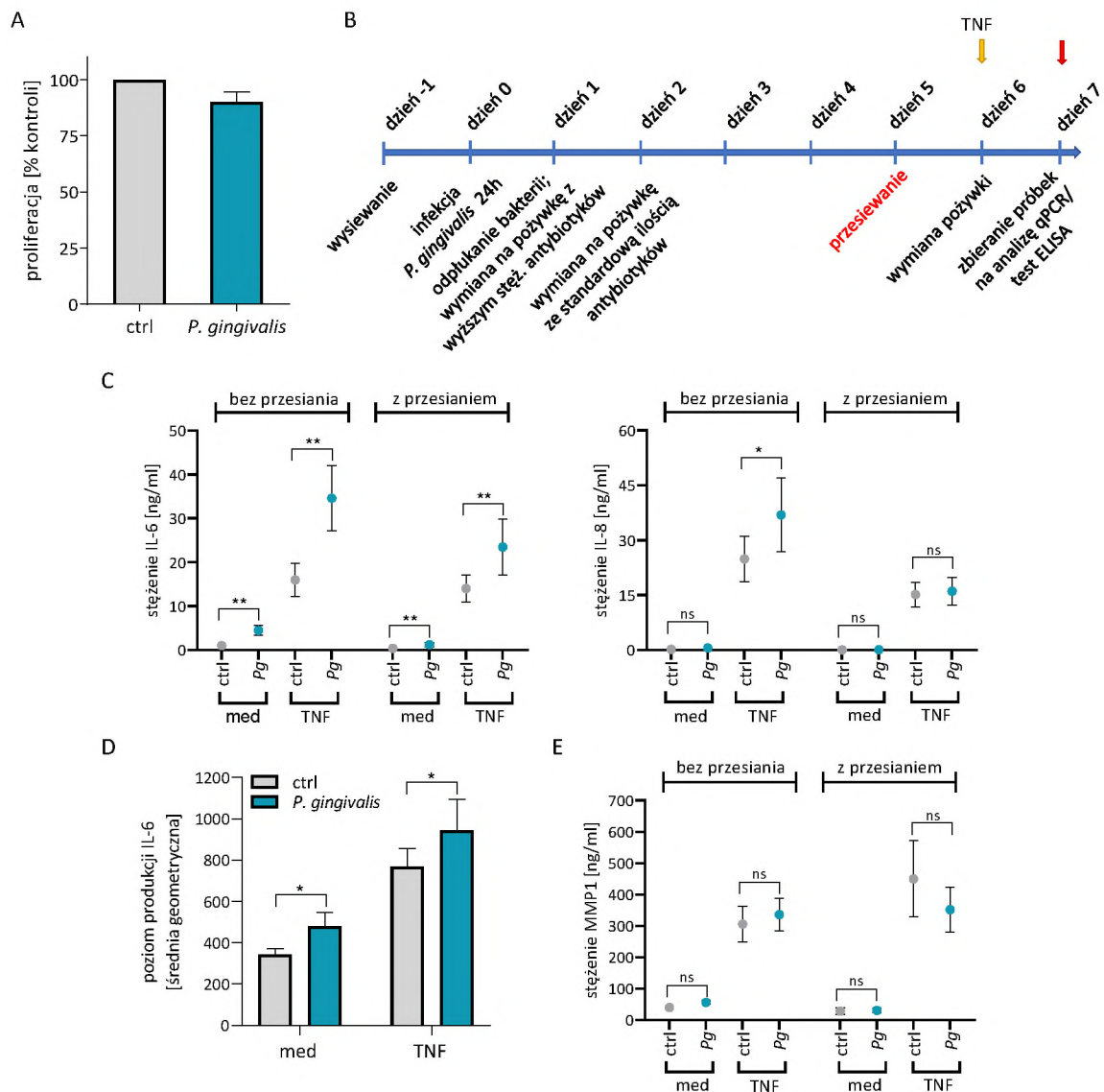
Rycina 28. Poziom produkcji cytokin prozapalnych w GFs infekowanych *P. gingivalis* i stymulowanych TNF w różnych odstępach po infekcji. (A) Komórki infekowano *P. gingivalis* MOI 20 lub 50 przez 24h, po czym bakterie odpłukiwano i do jednego z warunków dodano TNF na kolejne 24h, a do pozostałych komórek dodano pożywkę z metonidazolem (0,25 mg/ml) i gentamycyną (0,2 mg/ml) w celu pozbycia się zewnątrzkomórkowych bakterii. Po kolejnych 24h pożywkę wymieniono na zawierającą standardową ilość antybiotyków (penicylina/streptomycyna i gentamycyna) i w takich warunkach komórki hodowano do dnia czwartego lub szóstego, gdy pożywkę wymieniano na świeżą i komórki stymulowano TNF przez 24h. W każdym punkcie czasowym do stymulacji TNF używano pożywki zawierającej 2% FBS i pozbawionej antybiotyków. Żółtymi strzałkami zaznaczono punkty czasowe, w których do GFs dodawano TNF, natomiast czerwonymi zaznaczono dni, w których zbierano pożywkę z komórek. (B) Poziom produkcji IL-6 oraz IL-8 określony za pomocą testu ELISA. Na wykresach zaznaczono średnie stężenie cytokin +SEM (n=3-4). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001

8.3.2 Długotrwałe efekty infekcji są niezależne od proliferacji GFs

W kolejnym kroku przeprowadzono eksperymenty, które miały na celu weryfikację czy podwyższony poziom produkcji cytokin prozapalnych może wynikać ze zwiększonej proliferacji infekowanych komórek. W pierwszym etapie badań sprawdzono wpływ *P. gingivalis* na proliferację GFs. Test na inkorporację BrdU nie pokazał jednak istotnych zmian w tempie wzrostu pre-infekowanych komórek w porównaniu do komórek kontrolnych (Ryc. 29A). Aby potwierdzić brak wpływu tempa proliferacji komórek na obserwowane efekty zaprojektowano eksperyment, w którym część komórek wysiewano w standardowym formacie

na test ELISA, a część hodowano wg protokołu pokazanego na Ryc. XA do piątego dnia, kiedy były trypsynizowane, liczone i ponownie wysiewane w równych ilościach na płytki 96-dołkowe stosowane do testu ELISA. Następnie oba zestawy komórek poddawano 24-godzinnej stymulacji TNF w dniu szóstym (Ryc. 29B). Dodatkowy krok uwzględniający ponowne przeliczenie komórek pozwalał wyeliminować ewentualne rozbieżności w ilościach komórek w poszczególnych dołkach w momencie stymulacji TNF. Wykonano test ELISA, który pokazał, że niezależnie od dodatkowego kroku z przesiewaniem komórek, poziom produkcji IL-6 był podwyższony po uprzedniej infekcji GFs *P. gingivalis* (Ryc. 29C). Trendu takiego nie zanotowano natomiast dla IL-8 (Ryc. 29C). Warto również dodać, że niższy poziom produkcji cytokin prozapalnych w warunkach, gdzie komórki były przesiewane wynika z mniejszej ilości komórek na dołku. W celu ostatecznego potwierdzenia, że obserwowana amplifikacja produkcji IL-6 przez GFs poddane wcześniejszej infekcji jest niezależna od ilości i tempa proliferacji komórek wykonano pomiar wewnątrzkomórkowego poziomu IL-6 za pomocą cytometrii przepływowej. Metoda ta pozwala na określenie produkcji badanej cytokiny na poziomie pojedynczej komórki. Analiza ujawniła, że pre-infekowane GFs wykazują podwyższony poziom produkcji IL-6 w porównaniu z kontrolą, zarówno w komórkach stymulowanych TNF po sześciu dniach od infekcji, jak i w warunkach, gdzie komórki nie były stymulowane TNF (Ryc. 29D). Dodatkowo sprawdzono czy długofalowy wpływ *P. gingivalis* na aktywację zapalną jest specyficzny w stosunku do odpowiedzi GFs związanej z produkcją cytokin czy zmiany są widoczne również na poziomie innych mediatorów stanu zapalnego, jak MMPs, które są zdolne do degradacji ECM. Wyniki testu ELISA nie pokazały istotnych zmian w poziomie produkcji MMP1 pomiędzy infekowanymi a nieinfekowanymi GFs, zarówno w warunkach bez przesiewania, jak i z przesiewaniem komórek (Ryc. 29E). Wynik ten sugeruje pewną specyficzność wpływu odpowiedzi GFs w kierunku cytokin prozapalnych, ale należałoby przeprowadzić więcej badań, by zbadać profil odpowiedzi zapalnej na infekcję.

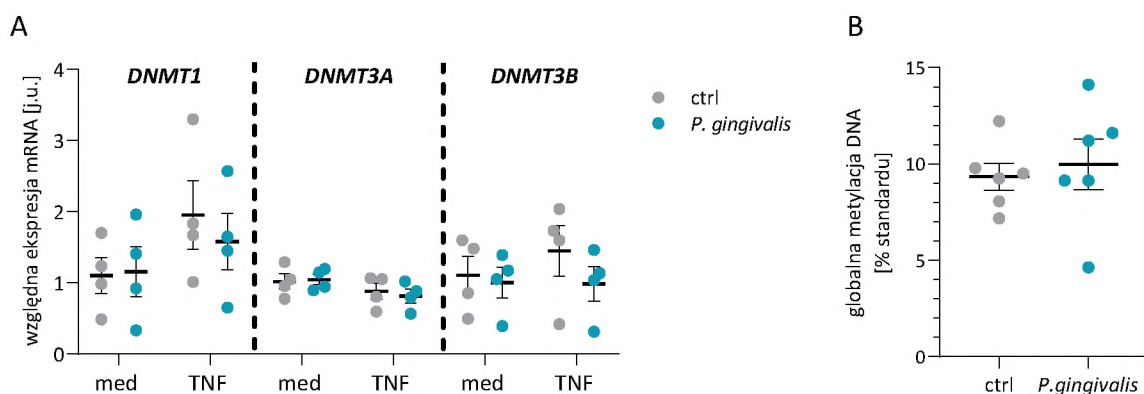
Podsumowując, opisane eksperymenty pokazały, że pre-infekcja komórek *P. gingivalis* nie wpływa na proliferację GFs, a więc sugerują, że u podstaw amplifikacji aktywacji zapalnej wywołanej wcześniejszą ekspozycją komórek na bakterie, w szczególności zwiększonej produkcji IL-6, leżą inne mechanizmy.



Rycina 29. Badanie wpływu proliferacji GFs na długotrwałe efekty infekcji komórek *P. gingivalis*. (A) Tempo proliferacji GFs infekowanych *P. gingivalis* oraz nieinfekowanej kontroli zmierzone po siedmiu dniach od infekcji. (B) Komórki infekowano *P. gingivalis* (MOI 50) przez 24h, po czym bakterie odpłukiwano, a do komórek dodawano pożywkę zawierającą 2% FBS, metonidazol (0,25 mg/ml) i gentamycynę (0,2 mg/ml). Po kolejnych 24h pożywkę wymieniono na zawierającą 5-10% FBS oraz standardową ilość antybiotyków (penicylina/streptomycyna i gentamycyna) i w takich warunkach komórki hodowano do piątego dnia, kiedy komórki przesiewano. W dniu szóstym GFs stymulowano TNF (10 ng/ml) (żółta strzałka) przez 24h (czerwona strzałka – moment zebrania próbek). Komórki nieprzesiewane hodowano wg protokołu opisanego dla głównego modelu. (C, E) Poziom produkcji mediatorów stanu zapalnego w GFs hodowanych i poddanych aktywacji zapalnej opisanych dla modelu głównego i modelu z przesiewaniem komórek zmierzony za pomocą testu ELISA. Dane zaprezentowane jako średnia \pm SEM (n=4-5). (D) Pomiar poziomu wewnątrzkomórkowej produkcji IL-6 w GFs stymulowanych TNF przez 24h w szóstym dniu eksperymentu lub w niestymulowanej kontroli (n=6). Dane wyrażone jako średnia geometryczna i zaprezentowane jako średnia \pm SEM. (C-E) Wykonana analiza statystyczna: sparowany test-t. *p<0,05; **p<0,01; ctrl -kontrola; *Pg* – *P. gingivalis*

8.3.3 Długofalowe efekty *P. gingivalis* nie są związane ze zmianami w poziomie globalnej metylacji DNA

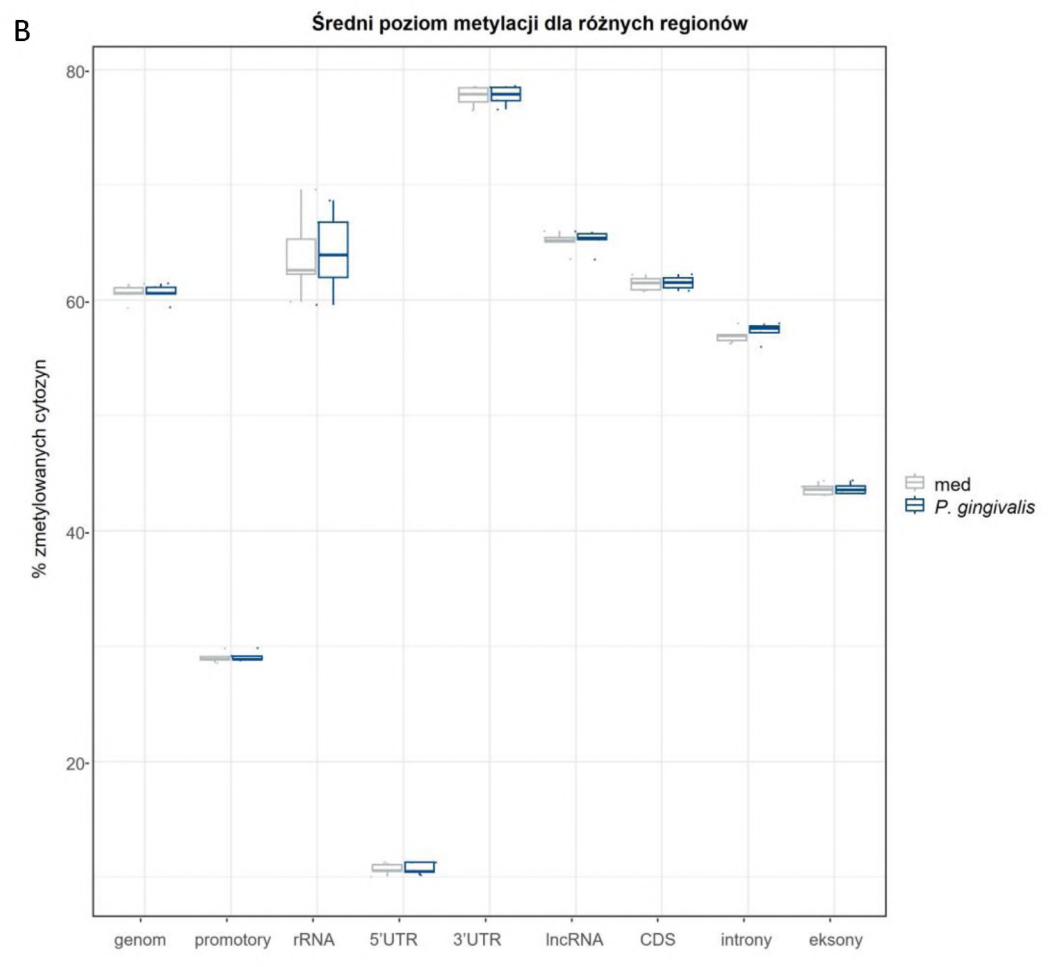
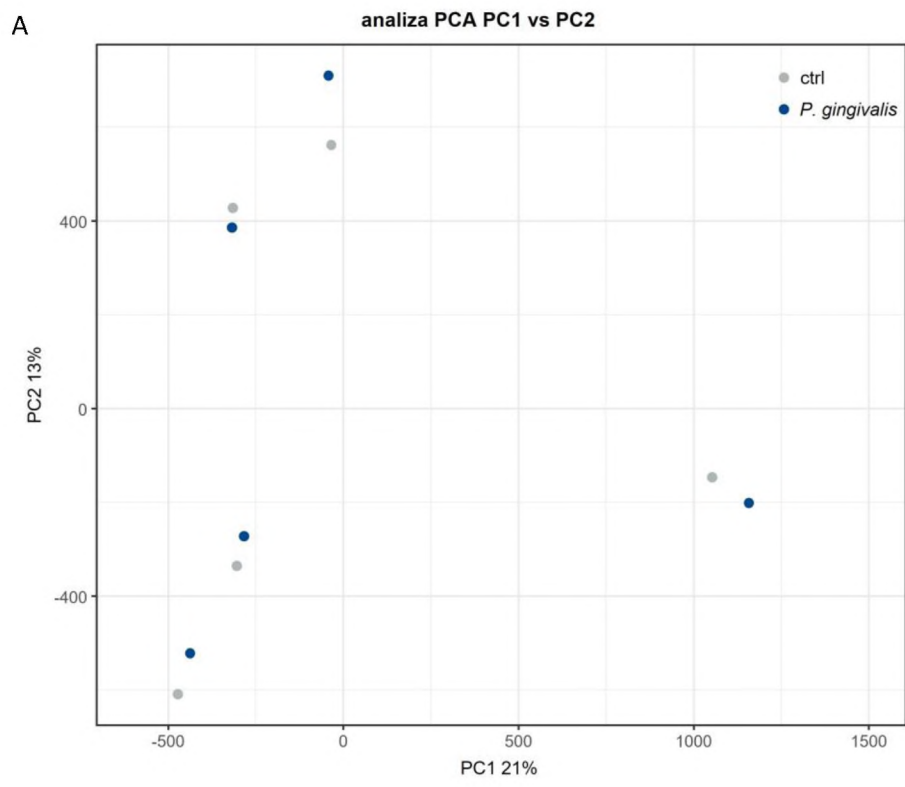
Badania pokazują, że zarówno komórki immunologiczne będące elementem odpowiedzi wrodzonej, jak i komórki stromy, wykazują zjawisko tzw. „pamięci immunologicznej” [160]. Polega ona na zmienionej odpowiedzi komórek wskutek ponownej stymulacji zapalnej, a u podstaw tego zjawiska mogą leżeć zmiany epigenetyczne, w tym metylacja DNA [140], [142]. Aby zbadać czy za obserwowane efekty mogą odpowiadać zmiany w profilu metylacji DNA, w pierwszej kolejności sprawdzono poziom ekspresji DNMTs i zmierzono poziom globalnej metylacji DNA. Analiza qPCR nie wykazała istotnych różnic pomiędzy GFs infekowanymi *P. gingivalis* a nieinfekowaną kontrolą, zarówno w komórkach stymulowanych TNF w szóstym dniu po infekcji, jak i niestymulowanych (Ryc. 30A). Infekcja *P. gingivalis* nie wywołała również zmian w poziomie globalnej metylacji DNA po siedmiu dniach od infekcji (Ryc. 30B). Taki wynik sugeruje, że *P. gingivalis* nie wpływa na metylację DNA w GFs lub indukuje jedynie zmiany lokalne na promotorach konkretnych genów, które nie są wykrywane w pomiarach globalnej metylacji DNA opartych na określeniu metylacji sekwencji LINE-1. Ta druga możliwość została zweryfikowana w kolejnej części pracy.

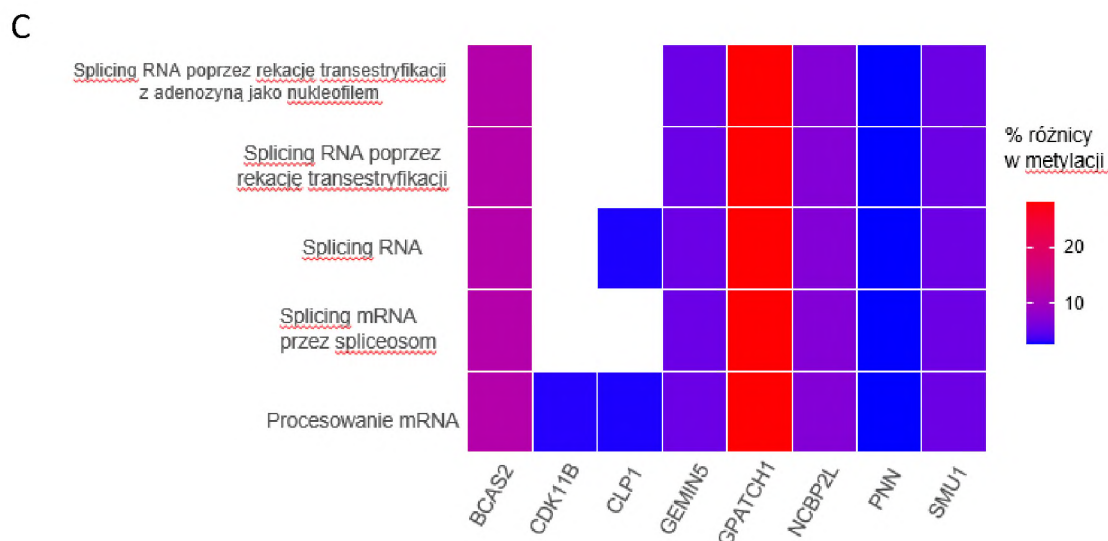


Rycina 30. Wpływ *P. gingivalis* na globalny poziom metylacji DNA w GFs. Komórki hodowano wg protokołu opisanego dla głównego modelu. (A) Analiza qPCR ekspresji mRNA DNMTs w komórkach stymulowanych TNF (10 ng/ml; 24h) szóstego dnia eksperymentu lub w niestymulowanej kontroli (n=4). Dane zaprezentowane jako względna ekspresja mRNA. (B) Poziom globalnej metylacji zmierzony w komórkach kontrolnych i infekowanych *P. gingivalis* (MOI 50) przez 24h, zmierzony 7 dni po infekcji. Dane wraz z % zmetylowanego standardu. (A, B) Wyniki przedstawione jako średnia \pm SEM wraz z poszczególnymi punktami.

8.3.4 Infekcja *P. gingivalis* nie powoduje lokalnych zmian poziomu metylacji DNA w genomie GFs

Ponieważ infekcja *P. gingivalis* nie wpływała na metylację DNA na poziomie globalnym, wykonano analizę RRBS, która pozwala na wykrycie zmian w profilu metylacji DNA na poszczególnych promotorach genów, jak również w innych regionach genomu. W pierwszym kroku wykonano analizę głównych składowych PCA (ang. *principal component analysis*), której celem było zmniejszenie liczby zmiennych opisujących rozrzut danych oraz określenie korelacji pomiędzy danymi. W dużym uproszczeniu – ułożenie punktów parami (ctrl – *P. gingivalis*) blisko siebie oznacza, że nie wykryto istotnych różnic pomiędzy tymi warunkami dla poszczególnych linii GFs (Ryc. 31A), zaś głównym źródłem zmienności są różnice w profilach metylacji DNA między liniami GFs pochodzącymi od różnych dawców. W kolejnym kroku wykonano analizę zmian w profilu metylacji w różnych regionach genomu. Globalny poziom metylacji DNA wg danych z analizy RRBS wynosił ok. 60% dla obu warunków. Uzyskane dane pokazały również, że poziom metylacji na promotorach genów pomiędzy próbkami nie różni się znacząco, nie zaobserwowano także zmian w metylacji pozostałych regionów wyszczególnionych na Ryc. 31B. Wykonano również analizę zmian w profilu metylacji poszczególnych genów. Analiza ta ujawniła zwiększoną metylację genów związanych ze splicingiem, takich jak: *BCAS2*, *CDK11B*, *CLP1*, *GEMIN5*, *GPATCH1*, *NCBP2L*, *PNN* oraz *SMUI* (Ryc. 31C), nie wykryto jednak statystycznie istotnych zmian w poziomie metylacji genów związanych z patofizjologią PZP. Chociaż zaobserwowane różnice w profilu metylacji genów związanych ze splicingiem mogą stanowić przedmiot dalszych badań, to jednak nie wykazują one bezpośredniego związku z aktywacją zapalną GFs. Uzyskane dane pokazują zatem, że mechanizmy epigenetyczne związane z metylacją DNA najprawdopodobniej nie są zaangażowane w obserwowany efekt utrzymującej się silniejszej odpowiedzi zapalnej GFs po infekcji *P. gingivalis*.

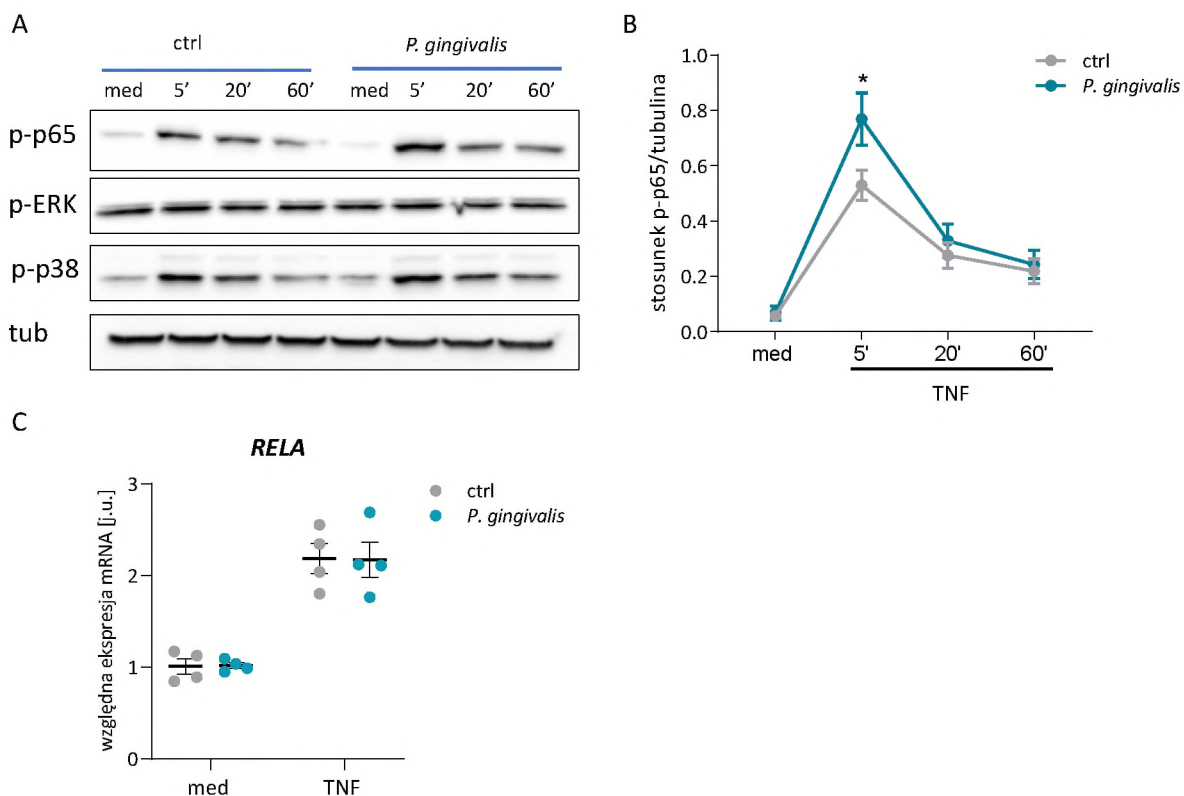




Rycina 31. Wpływ infekcji *P. gingivalis* na lokalne zmiany w metylacji DNA genomu GFs. Komórki infekowano *P. gingivalis* (MOI 50) przez 24h i hodowano do siódmego dnia wg protokołu dla modelu głównego. Po tym czasie zbierano próbki do izolacji DNA, w celu wykonania analizy RRBS. (A) Analiza głównych składowych PCA. (B) Poziom metylacji w różnych regionach genomu: cało-genomowy, w sekwencjach promotorowych, 3'- i 5'-UTR, sekwencjach kodujących (CDS), intronach, eksonach, rRNA i lncRNA. Dane zaprezentowane w formie % zmetylowanych cytozyn. (C) Mapa cieplna przedstawiająca geny o istotnie wyższym poziomie metylacji DNA

8.3.5 Za utrzymującą się silniejszą odpowiedź zapalną GFs po infekcji mogą odpowiadać zmiany w szlaku sygnałowym NFκB

Ponieważ w dotychczasowych eksperymentach nie wykryto zmian epigenetycznych, które mogłyby wywołać zwiększoną podatność GFs na aktywację zapalną, celem kolejnego eksperymentu było sprawdzenie czy za obserwowany efekt mogą być odpowiedzialne zmiany w ścieżkach sygnałowych związanych z aktywacją zapalną komórki. Wykonano analizę western blot białek szlaków sygnałowych MAPK (p-38, p-ERK) oraz NFκB (p-p65). Zaobserwowano, że komórki hodowane do 6 dnia od infekcji i następnie poddawana stymulacji TNF wykazują wyższy poziom fosforylacji p65 niż komórki nieinfekowane, natomiast kinetyka aktywacji białek szlaku MAPK nie jest zmieniona przez *P. gingivalis* (Ryc. 32A, B). Sprawdzone także poziom ekspresji mRNA *RELA*, jednak analiza qPCR wykazała brak różnic pomiędzy komórkami pre-infekowanymi *P. gingivalis* a komórkami kontrolnymi (Ryc. 32C). Wyniki takie sugerują, że u podłoża obserwowanych zmian mogą leżeć zmiany w przekazie sygnału szlaku NFκB, a silniejsza aktywacja p65 spowodowana infekcją *P. gingivalis* nie jest efektem zmian w ekspresji mRNA. Należy podkreślić, że uzyskane wyniki jedynie sugerują możliwy udział p65 w badanym modelu i należałoby przeprowadzić więcej badań, by potwierdzić tę hipotezę.



Rycina 32. Wpływ pre-infekcji *P. gingivalis* na aktywację zapalną GFs stymulowanych TNF. Komórki hodowano tak jak opisywano wcześniej (główny model), (A, B) szóstego dnia eksperymentu GFs stymulowano TNF (10 ng/ml) przez 5, 60 i 60 min i zebrano lizaty białkowe. Wykonano analizę western blot p-p38, p-ERK, p-p65, p65, a jako kontroli użyto tubuliny. Na rycinie przedstawiono jedno z 4 reprezentatywnych powtórzeń eksperymentu. (B) Analiza densytometryczna (n=4). (C) Analiza qPCR poziomu ekspresji *RELA* (p65) w GFs poddanych 24-godzinnej stymulacji TNF (dzień 6/7) (n=4). Wynik przedstawiony jako średnia względna ekspresja mRNA \pm SEM wraz poszczególnymi punktami. (B, C) Zastosowana analiza statystyczna: sparowany t-test. * $p < 0,05$

9 Dyskusja

PZP jest jedną z najczęstszych chorób chronicznych na świecie i wiąże się z przewlekłym stanem zapalnym wywołanym zaburzeniem równowagi mikrobiologicznej w tkance przyzębia [161]. Dodatkowo, PZP zwiększa ryzyko zachorowania na inne choroby ogólnoustrojowe, jak RZS, cukrzyca czy nowotwory [35], dlatego tak ważne jest znalezienie nowych strategii terapeutycznych skutecznie redukujących stan zapalny. Leczenie PZP ogranicza się głównie do mechanicznego usunięcia płytki nazębnej, co jednak w przypadku znacznego odsetka pacjentów jest niewystarczające by przywrócić równowagę mikrobiologiczną w tkance przyzębia i na stałe złagodzić stan zapalny. Dlatego też w ostatnich latach jako wsparcie do konwencjonalnego leczenia coraz popularniejsze stają się terapie modulujące odpowiedź zapalną gospodarza, których celem jest osłabienie niekontrolowanej aktywacji układu odpornościowego oraz zahamowanie resorpcji kości. Badania pokazują, że terapie skierowane na procesy epigenetyczne mogłyby przynosić obiecujące efekty w leczeniu PZP. W niniejszej pracy połączono badania o charakterze farmakologicznym, mające na celu zweryfikowanie potencjału przeciwzapalnego inhibitorów enzymów regulujących procesy epigenetyczne w GFs, z doświadczeniami mechanistycznymi, które pozwoliły na bardziej dogłębne zrozumienie roli procesów epigenetycznych w biologii GFs. W pierwszej części badań wykazano potencjał przeciwzapalny pan-HDACi oraz zidentyfikowano HDAC3 jako kluczowy regulator odpowiedzi zapalnej GFs. Wynik taki sugeruje, że terapie skierowane na aktywność HDACs, w szczególności zastosowanie specyficznych inhibitorów HDAC3 jako przeciwzapalnych związków modulujących odpowiedź gospodarza, mogłyby przynieść pozytywne skutki w leczeniu PZP. W kolejnej części pracy zbadano wpływ DNMTi, w szczególności decytabiny, na aktywację zapalną oraz inne aspekty biologii GFs. W zastosowanym modelu wpływ decytabiny na wiele funkcji biologicznych GFs był niekorzystny z perspektywy terapeutycznej, w szczególności ze względu na jego prozapalne i antyproliferacyjne działanie. Badania te pozwoliły jednak na zidentyfikowanie wielu procesów zależnych od metylacji DNA w GFs, znacznie rozszerzając wiedzę na temat roli mechanizmów epigenetycznych w tych komórkach. W ostatniej części pracy zbadano długofalowe konsekwencje infekcji *P. gingivalis* w GFs oraz rolę mechanizmów epigenetycznych związanych z metylacją DNA w tym procesie. W prezentowanych badaniach wykorzystano model oparty na stymulacji zapalnej GFs poddanych wcześniejszej infekcji *P. gingivalis*. Pokazano, że wcześniejsza infekcja GFs nasila produkcję IL-6 przez te komórki, jednak nie udało się potwierdzić zaangażowania w ten proces mechanizmów epigenetycznych. Wykazano natomiast, że u podstaw zwiększonej wrażliwości

GFs na stymulację zapalną po wcześniejszej ekspozycji na *P. gingivalis* mogą leżeć zmiany w aktywacji ścieżki sygnałowej NFκB.

9.1 Badanie wpływu HDACi na aktywację zapalną GFs

Zaburzenia systemu acetylacji opisano w przypadku wielu chorób o podłożu zapalnym, a wykorzystanie HDACi do farmakologicznej modulacji tych zmian wykazuje korzystne działanie terapeutyczne. W PZP pokazano, że HDACi wykazują działanie przeciwzapalne oraz zapobiegają resorpcji kości wyrostka zębodołowego [95]. Przedstawione w niniejszej pracy badania po raz pierwszy pokazują, że aktywność HDACs jest konieczna w indukcji genów prozapalnych, w tym cytokin, chemokin oraz MMPs w GFs pobranych zarówno od zdrowych dawców, jak i od pacjentów z PZP. Infekcja *P. gingivalis* lub stymulacja mediatorami stanu zapalnego (TNF, IL-1β) powodowały podwyższenie ekspresji mRNA *IL6*, *IL8*, *IL1B*, *COX2*, *CCL2*, *CCL5*, *CXCL10* oraz *MMP3*, a zahamowanie aktywności HDACs obniżało poziom ekspresji większości z wymienionych genów. Mediatorzy te zostały wybrane w oparciu o dane pokazujące, że wiele z nich znajduje się w dużych ilościach w płynie kieszonkowym lub ulega zwiększonej ekspresji w tkankach dziąsła pobranych od pacjentów [162]. IL-6 i IL-1β przyczyniają się do migracji komórek układu odpornościowego oraz zaangażowane są w proces osteoklastogenezy [163]. IL-8, CXCL10, CCL2 i CCL5 to chemoatraktanty przyciągające komórki układu immunologicznego, natomiast COX-2 stanowi składnik szlaku PGE2 zaangażowanego w osteoklastogenezę. Z kolei MMP3 wraz z innymi MMPs bierze udział w degradacji ECM i przyczynia się do destrukcji tkanki dziąsłowej [162], [164]. Jak pokazano, mediatorzy stanu zapalnego w znacznym stopniu przyczyniają się do rozwoju PZP, w tym do napędzania stanu zapalnego oraz resorpcji kości wyrostka zębodołowego. Obniżenie poziomu mediatorów stanu zapalnego przyczyniłoby się zatem do znacznej poprawy stanu pacjentów cierpiących na PZP [165]. Zaprezentowane tutaj wyniki pokazują, że terapie celujące w aktywność HDACs, w szczególności HDAC3, mogłyby być korzystne z klinicznego punktu widzenia.

Zmiany w systemie acetylacji białek potwierdzono w chorobach zapalnych, autoimmunologicznych czy nowotworach. Dla przykładu, w RZS opisano pozytywną korelację pomiędzy podwyższoną ekspresją HDAC1, a ekspresją TNF w błonie maziowej pacjentów, a HDAC5 został zidentyfikowany jako negatywny regulator stanu zapalnego w stawach pacjentów [166]. W płucach i makrofagach pęcherzykowych pacjentów z POChP (przewlekła obturacyjna choroba płuc) obserwuje się natomiast obniżenie ekspresji HDAC2, HDAC4 i HDAC8, a w

makrofagach pęcherzykowych pacjentów z astmą obniżeniu ulega ekspresja HDAC1 [167]. Z kolei w dziąsłach osób z PZP odnotowano podwyższenie ekspresji *HDAC1*, *5*, *8* i *9* [117], natomiast w ślinie ekspresja *HDAC3*, *HDAC4*, *HDAC8* i *HDAC9* jest obniżona [118]. W badaniu tym zasugerowano również, że HDAC4, 8 i 9 mogą stanowić biomarkery PZP, jednakże nie wskazano na rolę HDAC3 [118]. Zaprezentowane przeze mnie w pracy magisterskiej badania także nie wskazały na zmiany w ekspresji *HDAC3* w GFs infekowanych *P. gingivalis* lub stymulowanych mediatorami stanu zapalnego [122]. Odnotowano natomiast zmiany w ekspresji m. in. *HDAC1*, *HDAC2* i *HDAC6* [122], jednak użycie HDAC6i oraz MS-275, inhibitora HDACs klasy I, wykazującego szczególną specyficzną w kierunku HDAC1 nie spowodowało obniżenia transkrypcji i wydzielania mediatorów stanu zapalnego badanych w niniejszej pracy. Taka obserwacja wskazuje, że pomimo zmian w ekspresji tych HDACs, nie odgrywają one znaczącej roli jako regulatory transkrypcji genów związanych z regulacją stanu zapalnego w GFs. Niemniej jednak, pomimo braku regulacji ekspresji *HDAC3* przez *P. gingivalis* i cytokiny prozapalne (TNF, IL-1 β), to właśnie zablokowanie ekspresji lub aktywności tego enzymu okazało się być kluczowe w regulacji odpowiedzi zapalnej GFs na infekcję i stymulację cytokinami. Należy jednak pamiętać, że HDACs biorą udział w procesie acetylacji nie tylko histonów, lecz również innych białek niehistonowych [94] i podwyższona ekspresja innych HDACs może wpływać na inne procesy, które nie zostały zbadane w ramach tego projektu doktorskiego. By uzyskać pełny obraz zmian krajobrazu transkrypcyjnego komórek wywołanych przez inhibicję poszczególnych HDACs należałoby wykonać sekwencjonowanie nowej generacji. Z kolei w celu zidentyfikowania białek niehistonowych, których acetylacja ulega zmianie pod wpływem HDACi w GFs, konieczne byłoby zbadanie acetylomu za pomocą technik spektrometrii masowej.

Liczne badania pokazują, że poszczególne białka z rodziny HDACs odgrywają istotne role w procesach immunologicznych, a wyciszenie ich ekspresji lub zablokowanie aktywności ma pozytywne skutki. Np. wyciszenie ekspresji *HDAC1* w makrofagach powoduje zmniejszenie ilości bakterii w komórkach, chroni przed ich międzykomórkowym rozprzestrzenianiem oraz przywraca odpowiedź immunologiczną [168]. Również w makrofagach zauważono, że specyficzna inhibicja HDAC6 ułatwia eliminację *Salmonella enterica* serotyp Typhimurium poprzez produkcję ROS [169], a inhibicja HDAC8 przywraca odpowiedź immunologiczną podczas ekspozycji komórek na LeTx, główny czynnik wirulencji *Bacillus anthracis* [170]. Campo i wsp. pokazali także, że specyficzna inhibicja HDAC3 hamuje wzrost *Mycobacterium tuberculosis* w monocytach lub makrofagach pęcherzykowych oraz ich odpowiedź zapalną, nie

wskazali jednak mechanizmu leżącego u podstaw tego zjawiska [171]. Przytoczone przykłady odnoszą się do komórek immunologicznych, jednak przeprowadzone w ramach projektu doktorskiego badania pozwoliły na potwierdzenie roli HDAC3 w regulacji odpowiedzi zapalnej również w GFs. Co więcej, podobne wyniki pokazano dla fibroblastów błony maziowej stymulowanych IL-1 β , gdzie HDAC3/6i, ale nie HDAC6i powodował obniżenie ekspresji cytokin prozapalnych [172].

HDAC3 został niejednokrotnie opisany jako ważny regulator transkrypcji w wielu procesach patologicznych. W miażdżycy, na przykład, wyciszenie ekspresji *HDAC3* w makrofagach hamuje indukowaną przez LPS ekspresję genów zapalnych [173], [174]. Pokazano także, że selektywna inhibicja *HDAC3* redukuje produkcję cytokin przez jednojądrzaste komórki krwi obwodowej i FLS wyizolowane z tkanek pobranych od pacjentów z RZS [172], [175]. Zamieszczone w niniejszej pracy wyniki pokazują, że zarówno genetyczne wyciszenie ekspresji HDAC3, jak i zahamowanie aktywności HDAC3/6, ale nie HDAC6, powoduje obniżenie ekspresji genów prozapalnych indukowanych infekcją *P. gingivalis* lub stymulacją TNF/IL-1 β . Wynik taki sugeruje, że HDAC3 wykazuje funkcję regulatora transkrypcji w odpowiedzi zapalnej GFs. Angiolilli i wsp. zaprezentowali mechanizm mogący odpowiadać za przeciwzapalne efekty zahamowania HDAC3. Pokazali oni, że inhibicja HDAC3 powoduje zablokowanie fosforylacji STAT1, czyniąc go nieaktywnym i uniemożliwiając przyłączenie do DNA. Aktywacja STAT1 w stymulowanych cytokinami fibroblastach błony maziowej jest wynikiem autokrynej odpowiedzi komórek na produkowany przez nie IFN typu I. Obniżenie jego produkcji przez HDAC3/6i w konsekwencji prowadzi do zahamowania aktywności STAT1. Zaobserwowano też zależne od IFN typu I obniżenie ekspresji kilku chemokin, w tym *CXCL9* i *11* (ale nie *IL6* czy *IL8*) [172]. W niniejszej pracy uzyskano podobny wynik – HDAC3/6i obniżał ekspresję *CXCL10*, ale nie *IL8*, co sugeruje, że taki mechanizm rzeczywiście mógłby być odpowiedzialny za przeciwzapalne właściwości HDAC3/6i w GFs. Pomimo, iż przy tak ograniczonym zestawie przebadanych genów trudno doszukiwać się powiązań, jednak warto byłoby sprawdzić czy taki mechanizm działa także w GFs, szczególnie biorąc pod uwagę ostatnie doniesienia literaturowe o wpływie nadmiernej produkcji IFN typu I na resorpcję kości w PZP [176]. Potwierdzenie obecności takiego mechanizmu wskazywałoby, że inhibicja HDAC3 może wykazywać również działanie ochronne na kość wyrostka zębodołowego. Istnieją również inne badania, które potwierdzałyby taką hipotezę. Huynh i in. pokazali, że PDLFs, które mają zdolność do różnicowania w osteoblasty, wykazywały niską ekspresję HDAC3 w procesie różnicowania [123]. Zaobserwowano

również, że inhibicja HDAC3 hamowała fuzję preosteoklastów [96]. Z drugiej jednak strony pokazano, że HDAC3 jest negatywnym regulatorem osteogenezy, jej niedobór powodował bowiem nadmierną odpowiedź osteoklastów na RANKL, przyczyniając się do zwiększenia całkowitej liczby osteoklastów, a dodatkowo jej zahamowanie nasilało osteoklastogenezę [177], [178]. W celu określenia roli HDAC3 w procesach związanych z przebudową kości w PZP należałoby w pierwszym etapie określić wpływ inhibicji HDAC3 na ekspresję OPG/RANKL, a następnie przeprowadzić więcej badań (również *in vivo*), które pozwoliłyby na określenie potencjału regeneracyjnego specyficznego inhibitora HDAC3. W tym kontekście warto zwrócić uwagę, że zastosowanie globalnych HDACi w mysim modelu PZP spowodowało znaczące obniżenie resorpcji kości, nie wpływając równocześnie na akumulację komórek immunologicznych w tkance [125].

W niniejszej pracy sprawdzono również czy acetylacja kontroluje proces internalizacji i wewnątrzkomórkowego przeżywania *P. gingivalis*. Badania z użyciem HDACi nie wskazały jednak na istnienie różnic w ilości internalizowanych bakterii, nie pokazano także, by HDACi wpływały na eliminację bakterii. Badania te wskazują zatem, że procesy związane z wnikaniem bakterii do GFs nie są regulowane przez zmiany w poziomie acetylacji histonów. Nie jest to zaskakujące biorąc pod uwagę fakt, że fagocytoza bakterii nie jest głównym zadaniem GFs, a komórki te nie są też głównym celem dla *P. gingivalis* [19].

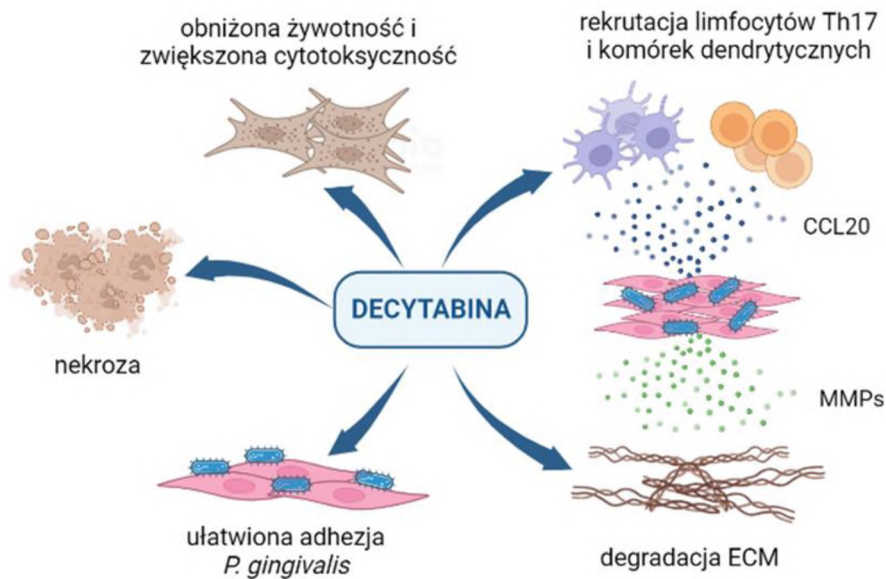
Przedstawione w niniejszej rozprawie wyniki pokazują obniżenie ekspresji genów prozapalnych pod wpływem inhibicji HDACs. Efekt ten może wydawać się zaskakujący biorąc pod uwagę fakt, że acetylacja histonów jest ściśle związana z inicjacją transkrypcji. Warto jednak podkreślić, że system acetylacji i deacetylacji jest bardziej złożony i sama acetylacja nie jest wystarczająca do uruchomienia transkrypcji. Istnieją badania pokazujące, że HDACi wpływają na ekspresję jedynie 5-20% genów, z których ekspresja połowy ulega obniżeniu. Podobnie delecja *Hdac3* w mysich makrofagach oprócz hiperacetylacji wywołuje też hipoacetylację wielu regionów genomu [173]. Dlatego często podkreśla się, że tylko część obserwowanych efektów działania HDACi można bezpośrednio powiązać z hiperacetylacją histonów (np. indukcję inhibitorów cyklu komórkowego i innych genów supresorowych w nowotworach) [179], pozostałe zaś są wynikiem zaburzeń precyzyjnie regulowanych sekwencji acetylacji i deacetylacji zachodzących na poziomie poszczególnych genów i/lub wpływu HDACi na inne procesy [180]. Z tego względu w pracy sprawdzano czy obserwowane przeciwzapalne efekty HDACi mogą wynikać z nieepigenetycznych mechanizmów

kontrolujących ekspresję genów. Wiadomo bowiem, że HATs/HDACs poza histonami kontrolują acetylację białek niehistonowych, jak np. czynniki transkrypcyjne i białka szlaków sygnałowych [101]. Literatura podaje przykłady acetylacji białek należących do szlaku sygnałowego kinaz MAP – aktywacja fosfatazy 1 powoduje zahamowanie przekazu sygnału przez p38 [150], a acetylacja reszt lizyny w podjednostkach p65 i p50 wpływa na zdolność wiązania się do DNA i aktywność transkrypcyjną NFκB [149]. Pokazano także, że aktywność tych białek jest regulowana w FLS pod wpływem inhibicji HDACs [172]. Przedstawione w niniejszej pracy wyniki nie wskazywały na fosforylację p38 i ERK, nie odnotowano także wpływu na degradację IκBα oraz fosforylację podjednostki p65 NFκB. Wyniki takie wskazują zatem na brak regulacji badanych ścieżek sygnałowych przez HDACs oraz sugerują, że modulacja aktywacji zapalnej GFs prawdopodobnie są wynikiem bezpośredniego działania HDACi na strukturę chromatyny. W ramach prezentowanej pracy sprawdzono także wpływ HDACi na syntezę negatywnych regulatorów transkrypcji, jako potencjalnego mechanizmu, który mógłby powodować osłabienie aktywacji zapalnej GFs, a który jest znanym pośrednim mechanizmem działania HDACi [151]. Użycie CHX, który blokuje syntezę białek *de novo* pozwoliło na pokazanie, że mechanizm ten nie wpływa na supresję ekspresji genów prozapalnych przez HDACi, co wskazuje, że obniżenie ekspresji genów prozapalnych przez HDACi nie jest skutkiem indukcji białek represorowych. Aby jednak w pełni zrozumieć mechanizm molekularny leżący u podstaw przeciwwzapalnych właściwości HDACi należałoby zweryfikować lokalne zmiany w profilu acetylacji histonów na promotorach genów podlegających regulacji. Istnieją także badania pokazujące, że efekty przeciwwzapalne HDACi mogą wynikać z potranskrypcyjnych mechanizmów regulujących, takich jak zmiany w stabilności mRNA. Należałoby rozważyć także inne potencjalne niespecyficzne działania HDACi – pokazano bowiem, że HDACi mogą także być wiązane przez inne Zn-zależne enzymy z podobną jak w HDACs kieszenią wiążącą ligand [181].

Pomimo, że efekty działania HDACi na aktywację zapalną GFs wymagają dalszych badań i potwierdzenia w pozostałych typach komórek strukturalnych przyzębia, jak GECs i PDLFs, to przedstawione w niniejszej pracy badania stanowią mocny dowód na to, że HDAC3 działa jako kluczowy regulator odpowiedzi zapalnej GFs. Zaprezentowane wyniki sugerują, że inhibicja HDACs, w szczególności HDAC3, może osłabić nadmierną odpowiedź zapalną komórek dziąsła na patogeny jamy ustnej oraz środowisko zapalne, a zastosowanie specyficznych HDACi może być korzystne jako terapia uzupełniająca do konwencjonalnego leczenia PZP.

9.2 Określenie wpływu inhibicji DNMT1 na aktywację zapalną i inne funkcje biologiczne komórek strukturalnych dziąsła

Celem kolejnej części przeprowadzonych badań było określenie wpływu DNMTi na odpowiedź GFs na infekcję i stymulację prozapalną. Główna część badań została przeprowadzona z wykorzystaniem decytabiny, inhibitora DNMT1, który używany jest w leczeniu zespołów mielodysplastycznych oraz ostrej białaczki szpikowej [112]. GFs hodowano w obecności inhibitora przez 12 dni, co było wystarczającym czasem by zaindukować w populacji komórek zmieniony wzór metylacji DNA. Pomimo, iż wybrany model posiada pewne ograniczenia związane ze zmniejszoną żywotnością komórek, podwyższoną cytotoksycznością oraz indukcją cytokin prozapalnych (pełny zakres skutków działania decytabiny na GFs przedstawiony na Ryc. 33), to wykonano serię doświadczeń, które pozwoliły potwierdzić, że efekty te najprawdopodobniej są związane z hipometylującym działaniem inhibitora, natomiast wpływ produktów rozpadu decytabiny jest zaniedbywalny. Przeprowadzone doświadczenia pokazały zatem, że decytabina indukuje fenotyp prozapalny w GFs i PDLFs. Pomimo, że Tanaka i in. pokazali, że decytabina w mysim modelu PZP wykazuje potencjał terapeutyczny to istnieją też prace, gdzie otrzymano wyniki pokazujące, że traktowanie zdrowych komórek DNMTi indukuje fenotyp zapalny. Dla przykładu hodowanie fibroblastów błony maziowej w obecności 5-azacytdyny powodowało, że komórki przybierały zaktywowany fenotyp podobny do komórek pobranych od pacjentów z RSZ [182]. Z kolei podtypy limfocytów T inkubowanych z 5-azacytydyną wykazywały podwyższoną ekspresję IL-4, IL-6, IL-10 oraz IL-13, których podwyższony poziom jest charakterystyczny dla pacjentów z układowym toczeniem rumieniowatym (SLE) [183], [184]. Zatem w opisywanych przypadkach 5-azacytydyna posłużyła jako narzędzie do wywołania hipometylacji DNA obserwowanej w trakcie choroby. Podobnie decytabina w komórkach strukturalnych dziąsła może służyć jako narzędzie do badania biologicznych konsekwencji hipometylacji DNA. Natomiast jej potencjał terapeutyczny w PZP może być znacząco ograniczony ze względu na prozapalne i antyproliferacyjne działanie na kluczowe populacje komórek strukturalnych przyzębia – GFs i PDLFs.



Rycina 33. Efekty działania decytabiny na GFs. Rycina stworzona z pomocą BioRender.com.

W pierwszym etapie badań sprawdzono globalne zmiany w transkryptomie spowodowane wywołaniem hipometylacji w GFs. Analiza wykazała, że komórki traktowane decytabiną i infekowane *P. gingivalis* charakteryzują się podwyższoną ekspresją genów kodujących cytokiny i chemokiny prozapalne, jak *CCL20*, *CCL5*, *CCL8*, *CCL13*, *TNF*, *IL1A*, *IL18*, *IL33* i *CSF3*. Wiele z tych mediatorów stanu zapalnego zostało wykrytych w płynie kieszonkowym oraz w tkankach pacjentów z PZP, a ich aktywność korelowała ze stopniem zaawansowania choroby oraz resorpcją kości wyrostka zębodołowego. Dodatkowo białka kodowane przez wymienione geny w dużej mierze przyczyniają się do rekrutacji komórek układu immunologicznego w miejsce toczącego się stanu zapalnego. Przykładowo Souto i in. pokazali, że ekspresja *CCL5* oraz *CCL20* jest podwyższona w próbkach od pacjentów z PZP [185]. Pokazano również, że infekcja *A. actinomycetemcomitans* powodowała indukcję ekspresji *CCL5* w mysim modelu PZP, co było związane z silną reakcją zapalną oraz resorpcją kości, za co odpowiadały leukocyty wykazujące ekspresję *CCR5*, receptora *CCL5* [186]. Pokazano także, że w zwierzęcych modelach PZP chemokina *CCL8* bierze udział w aktywacji leukocytów, przyciąganiu limfocytów T oraz jest związana z nasileniem choroby [187], [188], natomiast *CCL13* odpowiada za chemotaksję makrofagów [187]. Zaobserwowano także, że poziom *IL-33* i *G-CSF* (kodowanego przez gen *CSF3*) jest podniesiony w tkankach myszy, w których eksperymentalnie indukowano PZP oraz w GECs pochodzących od pacjentów z PZP. Eksperymenty *in vivo* potwierdziły rolę tych cytokin w patofizjologii PZP – traktowanie myszy *IL-33* nasilało resorpcję kości, podczas gdy neutralizacja *G-CSF* z wykorzystaniem przeciwciał

osłabiała ten proces. Wykonana w ramach przeprowadzonych w tej części doświadczeń analiza transkryptomyczna pokazała również, że decytabina podnosi ekspresję genów związanych z przebudową ECM, takich jak *MMP11*, *MMP13* czy *CSTL* (katepsyna L). CtsL i MMP13 są częścią szlaku zaangażowanego w degradację kolagenu w GFs, zatem pośrednio przyczyniają się do tego procesu [189]. CtsL może być również zaangażowana w różnicowanie limfocytów Th 17 [190], których patologiczna rola została pokazana w PZP [191]. Pomimo, że przedstawione w niniejszej rozprawie badania nie są zgodne z wynikami przedstawionymi przez Tanaka i wsp., którzy pokazali immunomodulujące efekty decytabiny [145], należy pamiętać, że wpływ DNMTi na procesy zapalne jest wysoce specyficzny dla danej choroby i typu komórek. Z jednej strony obserwowano przeciwzapalne efekty decytabiny w mysich modelach miażdżycy [116], zapaleniu stawów [192] czy zespole ostrej niewydolności oddechowej [114]. Z drugiej strony istnieją prace pokazujące, że decytabina indukuje efekty prozapalne, np. powoduje podwyższenie poziomu produkcji cytokin w ludzkich komórkach miazgi zęba [193] czy komórkach nabłonkowych oskrzeli [194] oraz aktywuje ścieżki prozapalne w komórkach epitelialnych raka piersi [195].

W niniejszej pracy zastosowano podejście, w którym połączono badania transkryptomiczne z funkcjonalnymi, co pozwoliło na identyfikację różnych aspektów biologii GFs (innych niż aktywacja zapalna), które regulowane są przez metylację DNA. Wykonano analizę ścieżek, które były zmienione przez decytabinę. Analiza ta wskazała, że decytabina indukuje ścieżki związane z odpowiedzią zapalną oraz, co ciekawe, z odpowiedzią przeciwwirusową, natomiast hamowała szlaki związane z organizacją włókien kolagenowych oraz przebudową ECM. Chociaż analiza ścieżek nie ujawniła klastra genów zaangażowanych w procesy związane z przeżywaniem komórki, to decytabina w znacznym stopniu indukowała ekspresję genów kodujących cyklinozależne inhibitory kinaz *CDKN1A*, *CDKN2A* oraz *CDKN2B* będące ważnymi regulatorami proliferacji komórek. Indukcja wymienionych inhibitorów cyklu komórkowego związana jest z nieprawidłową produkcją ECM oraz senescencją GFs, która objawiała się m. in. powiększeniem rozmiaru komórek [196], [197], co również było obserwowalne podczas hodowli komórek w obecności decytabiny. Nieco zaskakującym wynikiem jest podwyższenie ekspresji genów związanych z odpowiedzią przeciwwirusową oraz z interferonowym przekazem sygnału. W celu weryfikacji uzyskanych wyników należałoby przeprowadzić badania funkcjonalne, natomiast warto podkreślić, że stymulacja GFs bakteryjnymi cyklicznymi dinukleotydami skutkowała indukcją podobnego klastra efektorów interferonowych (*ISG15*, *MXI* oraz *IFIT1*) [198]. Tak jak wspomniano wcześniej,

IFN typu I może też być zaangażowany w resorpcję kości [176], i pomimo że decytabina w przeprowadzonej analizie nie wykryto indukcji ekspresji samego *IFN*, warto byłoby sprawdzić wpływ decytabiny na osteoklastogenezę. W tym miejscu należy również dodać, że decytabina indukuje ekspresję kilku genów, których ekspresja pokrywa się z profilem transkrypcji obserwowanym w próbkach ściągniętych od pacjentów z PZP [199]. Spośród 20 najsilniej regulowanych genów w tkankach od pacjentów w porównaniu z tkankami pochodzącymi od zdrowych dawców, 5 pokrywało się z danymi uzyskanymi z przeprowadzonych analiz transkryptomicznych (*CSF3*, *GLDC*, *SAA1*, *SAA2*, *GDF15*), co pokazuje, że inhibicja DNMT powoduje indukcję kilku genów, które są związane z patologią PZP.

Przeprowadzone badania funkcjonalne pozwoliły na identyfikację dodatkowych genów, których ekspresja była silnie regulowana przez decytabinę, m.in. *CCL20*, *ICAMI* czy *MMP1*. Jedną z metod pozwalającą na określenie statusu metylacji promotorów genów jest analiza krzywych topnienia produktów PCR w wysokiej rozdzielczości (ang. *high resolution melting qPCR*). W trakcie trwania projektu doktorskiego podjęto pierwsze próby optymalizacji tej metody dla promotorów *CCL20* i *ICAMI*, jednak jak dotąd nie udało się zoptymalizować warunków reakcji qPCR i wymagana jest dalsza optymalizacja. W literaturze istnieją natomiast dane pokazujące, że geny te są regulowane przez zmiany w metylacji ich regionów promotorowych oraz że są one wrażliwe na związki hipometylujące. Nadekspresję *CCL20* zaobserwowano w raku przetyku, gdzie była związana również z nabyciem przez komórki nowotworowe zdolności do metastazy. Badania *in vivo* pozwoliły natomiast na pokazanie, że nadekspresja *Ccl20* była związana z hipometylacją promotora oraz że równowaga pomiędzy komórkami wykazującymi ekspresję *Ccr6* – limfocytami Th17 i Treg była zaburzona [200]. Zróżnicowana metylacja promotora *CCL20* była pokazana również w podtypach limfocytów T [201] oraz w próbkach raka wątrobowo-komórkowego [202], korelując z poziomem ekspresji mRNA. Podobnie jak w GFs lub PDLFs, decytabina powodowała nadekspresję *CCL20* [202] oraz *ICAMI* w liniach nowotworowych [203]. Ekspresja genów kodujących MMPs również jest regulowana przez zmiany w profilu metylacji regionów promotorowych [204]. Z kolei w włókniakomięsaku DNMTi regulują ekspresję MMP1 niezależnie od zmian metylacji DNA poprzez rekrutację czynnika transkrypcyjnego Sp1 [205]. Takie wyniki sugerują, że poza bezpośrednim wpływem DNMTi na metylację DNA, za zmiany w ekspresji *MMPs* mogą być też odpowiedzialne inne mechanizmy działania związków hipometylujących.

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki wskazują na bardzo silną indukcję ekspresji oraz produkcji *CCL20* w GFs hodowanych w obecności decytabiny, oraz nieco słabszą w przypadku

pozostałych DNMTi – 5-azacytydyny oraz 6-tioguaniny. Wysoki poziom CCL20 obserwowany był także w przypadku inkubacji PDLFs z decytabiną. Liczne doniesienia literaturowe wskazują na podwójną rolę tej cząsteczki – z jednej strony jest to chemokina dla komórek układu immunologicznego [154], a z drugiej pokazano, że CCL20 wykazuje właściwości antybakteryjne zarówno w stosunku do bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych [206], a działanie CCL20 polega na wzmacnianiu wrodzonej odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko patogenom. Wykonane w ramach projektu doktorskiego doświadczenia pozwoliły na weryfikację 1) czy CCL20 wykazuje właściwości antybakteryjne w stosunku do *P. gingivalis* oraz 2) czy w związku z wysoką aktywnością proteolityczną *P. gingivalis* może degradować CCL20. Przeprowadzone badania pokazały, że CCL20, nawet w dawkach znacznie przekraczających ilości produkowane przez GFs w obecności decytabiny, nie wpływa na wzrost *P. gingivalis*. Natomiast zaprezentowano również wyniki doświadczeń pokazujących, że *P. gingivalis* degraduje CCL20 w warunkach odpowiadających tym, które stosowano podczas infekcji komórek *in vitro*. Można zatem wykluczyć hipotezę, że lokalna akumulacja CCL20 wywołana działaniem inhibitorów DNMT mogłaby hamować wzrost *P. gingivalis*. Należy również podkreślić, że poza CCL20, istnieje więcej chemokin wykazujących właściwości antybakteryjne, jak CXCL9, 10 czy 11 [206], a ponieważ *P. gingivalis* jest zdolny do degradacji różnych cytokin i chemokin [207], więc i te molekuły mogą być celem dla gingipain.

CCL20 to również chemokina odpowiedzialna za rekrutację leukocytów do miejsca infekcji. Ilości CCL20 wydzielane przez GFs traktowane decytabiną w odpowiedzi na infekcję *P. gingivalis* lub stymulację TNF są natomiast wystarczające by zadziałać immunomodulacyjnie na komórki wykazujące ekspresję CCR6, receptora CCL20, a więc na limfocyty B, Th 17 i komórki dendrytyczne. Istnieją prace pokazujące, że obecność tych komórek przyczynia się do podtrzymania stanu zapalnego, wskazano również na rolę komórek Th17 w procesie osteoklastogenezy [208]. Aby jednak eksperymentalnie potwierdzić wpływ decytabiny na rekrutację komórek układu odpornościowego należałoby wykonać barwienie immunohisto-chemiczne działów pobranych od myszy z indukowanym eksperymentalnie PZP i traktowanych decytabiną.

Podsumowując, zaprezentowane badania wskazały, że decytabina oraz inne związki hipometylujące są przydatnym narzędziem do identyfikacji genów oraz procesów regulowanych przez metylację DNA w komórkach zaangażowanych w patogenezę PZP. W celu pełniejszej oceny wpływu decytabiny na ekspresję genów należałoby przeprowadzić globalne epigenomiczne badania, które pozwoliłyby na uzyskanie wyników pokazujących profil

metylacji na poszczególnych promotorach genów. Jednakże obserwowane niekorzystne efekty DNMTi na żywotność i proliferację GFs i PDLFs, jak również na aktywację ścieżek prozapalnych ograniczają ich potencjał terapeutyczny w PZP.

9.3 Badanie długotrwałych skutków infekcji *P. gingivalis* na aktywację zapalną GFs

W literaturze dotyczącej chronicznych stanów zapalnych można znaleźć badania wykorzystujące modele długotrwałej stymulacji zapalnej. Badania takie są bardzo cenne, gdyż oddają warunki panujące w tkance, gdzie komórki narażone są na ciągłą i/lub powtarzającą się ekspozycję na mediatory stanu zapalnego. Takie chroniczne modele można wykorzystać np. do badań nad osteoklastogenezą [81], [209] lub pamięcią wrodzonej odporności (ang. *innate immune memory*), np. w makrofagach [210]. Chociaż pojęcie pamięci immunologicznej kojarzy się głównie z odpornością nabytą i limfocytami, to badania pokazują, że komórki będące składnikami wrodzonej odpowiedzi immunologicznej również zapamiętują ekspozycję na dany czynnik. Istnieje dużo badań opisujących modele wykorzystujące makrofagi, których używa się do badania tolerancji na ponowną stymulację zapalną. Takim czynnikiem często opisywanym w literaturze jest np. LPS. Pokazano, że ekspozycja makrofagów na pojedynczą dawkę LPS-u powoduje przeprogramowanie ich reakcji na drugą dawkę, co skutkuje obniżoną ekspresją mediatorów stanu zapalnego [211]. Taki mechanizm pozwala na modulowanie nadmiernej reakcji układu immunologicznego na obecność czynników wywołujących stan zapalny. Ostatnie badania pokazują, że komórki stromy również wykazują zjawisko pamięci na stymulację zapalną/tolerancji, a pierwsze badania pochodzą z lat 90. i dotyczą GFs [160]. GFs pre-stymulowane INF wykazywały wyższą produkcję IL-8 po dodatkowej stymulacji LPS [212]. Natomiast w przypadku ponownej ekspozycji na LPS, GFs utrzymują silniejszą odpowiedź zapalną (zwiększona produkcja IL-6, IL-8), co pokazuje, że GFs nie wykazują tolerancji na LPS [213].

Przeprowadzone w ramach niniejszego projektu doktorskiego badania pokazały wpływ TNF na podwyższoną produkcję niektórych mediatorów stanu zapalnego, głównie IL-6, w GFs pre-infekowanych *P. gingivalis*. IL-6 w PZP wykazuje działanie plejotropowe na aktywację limfocytów (szczególnie limfocytów B i Th17) i destrukcję tkanki, indukuje również resorpcję kości [32], [163]. Ostatnie badania pokazują, że terapie skierowane na zahamowanie produkcji IL-6 mogą przynosić pozytywne skutki w leczeniu PZP. Wykorzystanie inhibitora receptora IL-6 (tocilizumabu) zahamowało bowiem resorpcję kości i utratę przyczepu łącznotkankowego w mysim modelu PZP oraz obniżyło ekspresję cytokin związanych z limfocytami Th17 i RANKL [214].

Badaniami wyjściowymi do przedstawionego w tej części pracy modelu przedłużonej infekcji GFs, były badania na FLS, które poddano dwukrotnej stymulacji cytokinami prozapalnymi (TNF, IL-1 β), a następnie w różnych odstępach czasowych mierzono efekt takiej stymulacji. Pokazano, że wcześniejsza ekspozycja FLS na cytokiny zwiększa ich wrażliwość na powtórna aktywację zapalną [210]. Pokazano również, że GFs poddawane codziennej stymulacji *Pg*-LPS utrzymują silną odpowiedź zapalną, choć po 7 dniach jest ona delikatnie obniżona w porównaniu do początku eksperymentu [213]. Z kolei Scheres i Crielaard zbadali wpływ podwójnej infekcji *P. gingivalis* na odpowiedź GFs. Ich badania pokazały, że GFs poddane ponownej infekcji odpowiadają obniżoną produkcją i ekspresją kilku cytokin w porównaniu z komórkami, które nie miały wcześniej kontaktu z *P. gingivalis* [215]. Tutaj należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że osłabiona odpowiedź komórek niekoniecznie jest konsekwencją regulacji wewnątrzkomórkowych procesów związanych z aktywacją zapalną. Użyte w tych badaniach ilości *P. gingivalis* były bowiem bardzo wysokie, co (jak opisywano już w poprzedniej części) może powodować degradację cytokin/chemokin prozapalnych [207].

W zaprezentowanym w niniejszej pracy modelu połączono oba czynniki odpowiadające za rozwój PZP – bakterie oraz cytokiny prozapalne. Wyniki badań ujawniły, że GFs pre-infekowane *P. gingivalis* utrzymują silniejszą aktywację zapalną (w postaci zwiększonej produkcji IL-6 i IL-8) co najmniej do 7 dnia od infekcji. Kolejne doświadczenia mające na celu oddzielenie efektu proliferacji od zwiększonej produkcji cytokin prozapalnych potwierdziły indukcję IL-6, natomiast doświadczenie z dodatkowym krokiem uwzględniającym trypsynizację i liczenie komórek zniwelowało efekt podwyższonej produkcji IL-8. Również poziom MMP1 nie ulegał istotnym zmianom w pre-infekowanych GFs stymulowanych TNF (zarówno w warunkach bez przesiewania, jak i z przesiewaniem komórek). Brak różnic w produkcji MMP1 może wydawać się nieco zaskakujący, biorąc pod uwagę, że GFs wystawione na dwukrotne działanie LPS odpowiadają zwiększoną produkcją MMP1 [216]. Należy jednak podkreślić, że układ eksperymentalny przedstawiony w publikacji różnił się od opisywanego w niniejszej pracy nie tylko czynnikiem wywołującym aktywację zapalną, lecz i czasem, po którym następowała kolejna stymulacja. Różnice te mogą więc wpływać na zróżnicowaną odpowiedź komórek. Chociaż na podstawie uzyskanych wyników trudno jest wyciągnąć bardziej ogólne wnioski, to na tym etapie można zaobserwować pewną specyficzność pre-infekowanych GFs w kierunku zwiększonej produkcji cytokin prozapalnych, szczególnie IL-6. Oczywiście konieczne jest przeprowadzenie bardziej rozbudowanych testów (np. multiplex ELISA), które pozwoliłyby na zbadanie szerszego profilu regulowanych mediatorów

zapalnych. Istnieją jednak prace pokazujące, że efekt ponownej stymulacji zapalnej komórek może wykazywać specyficzność względem konkretnych genów. Tak jest np. w przypadku FLS oraz fibroblastów skórnych stymulowanych LPS, w których IL-6, IL-8, MMP1 czy MMP3 wykazują tolerancję na kolejną stymulację, natomiast w przypadku CXCL10 nie zaobserwowano tego zjawiska [216]. Produkcja CXCL10 była również obniżona w FLS, gdy komórki te były wystawione najpierw na działanie TNF, a następnie na IFN [217].

Pamięć komórki o wcześniejszej ekspozycji na czynniki zapalne jest regulowana przez mechanizmy metaboliczne lub epigenetyczne [160]. W przypadku mechanizmów epigenetycznych dużo badań opisuje zmiany w modyfikacjach histonów [216], [217]. Natomiast w przypadku PZP istnieją dwie prace pokazujące zaangażowanie metylacji DNA w modulację odpowiedzi komórek na czynniki zapalne. W jednym z nich wskazano na rolę hipermetylacji promotora *TLR2* w obniżeniu odpowiedzi zapalnej GECs dwukrotnie infekowanych niskimi dawkami *P. gingivalis* [140]. Z kolei Takai i in. pokazali, że miesięczna ekspozycja PDLFs na *Pg*-LPS powoduje hipermetylację, a co za tym idzie obniżoną ekspresję genów związanych z przebudową ECM [142]. Z tego względu zdecydowano się na zbadanie mechanizmów związanych z metylacją DNA. Jest to wystarczający czas by ewentualne zmiany w profilu metylacji wywołane przez *P. gingivalis* mogły zostać przepisane i utrwalone wraz z podziałami komórek. Testy na globalną metylację DNA nie ujawniły jednak istotnych zmian pomiędzy nieinfekowanymi i infekowanymi komórkami, co potwierdzono zarówno za pomocą analizy RRBS, jak i komercyjnie dostępnym zestawem opierającym się na wykrywaniu metylacji w sekwencjach LINE-1. Nie odnotowano także zmian w ekspresji DNMTs, co pokazuje, że bakterie nie wpływają na poziom metylacji DNA poprzez modulację ekspresji tych genów. Przedstawione wyniki pokazały, że wcześniejsza ekspozycja komórek na *P. gingivalis* nie wpływa na globalną metylację DNA. Uzyskany wynik nie wyklucza jednak możliwej roli lokalnych zmian poziomu metylacji DNA zlokalizowanych w konkretnych miejscach w genomie, których określenie możliwe jest dzięki analizie RRBS. Zmiany w profilu metylacji DNA na poszczególnych promotorach zostały zidentyfikowane w wielu schorzeniach związanych z chronicznym stanem zapalnym, jak również w infekcjach bakteryjnych [218], [219]. Co więcej, zaburzenia w profilu metylacji DNA mogą występować także w innych regionach genomu, np. w regionie 3'-UTR, gdzie zwiększona metylacja korelowała z ekspresją punktu kontrolnego związanego z aktywacją limfocytów T w nowotworach [220]. Przeprowadzona w ramach opisywanych w tej pracy badań analiza RRBS nie wykazała jednak istotnych zmian w metylacji promotorów, regionów 3'- i 5'-UTR, CDS, eksonów, intronów,

rRNA i lncRNA. Nie zidentyfikowano również zmian w poziomie metylacji genów bezpośrednio związanych z patofizjologią PZP. Analiza ujawniła natomiast zwiększoną metylację genów związanych z processingiem RNA i splicingiem. Choć istotność biologiczna tych zmian powinna zostać określona w dalszych badaniach, wydaje się mało prawdopodobne aby zmiany w metylacji genów związanych z tymi procesami były odpowiedzialne za amplifikację aktywacji zapalnej GFs w wyniku wcześniejszej infekcji *P. gingivalis*. Zaprezentowane dane z analizy RRBS sugerują zatem brak zaangażowania metylacji DNA w regulację długotrwałych efektów infekcji *P. gingivalis* na aktywację zapalną GFs.

Innym mechanizmem, który nie został zweryfikowany w ramach projektu doktorskiego, ale może stanowić potencjalny kierunek w dalszych badaniach jest określenie zmian związanych z modyfikacją histonów. W trakcie projektu podjęto natomiast próbę sprawdzenia, czy istnieją mechanizmy inne niż epigenetyczne, które mogą odpowiadać za różnice w aktywacji zapalnej GFs pre-infekowanych *P. gingivalis*. Zbadano aktywację białek związanych ze szlakiem MAPK oraz NFκB. Infekcja GFs 7 dni przed stymulacją komórek TNF nie powodowała zmian w aktywacji białek związanych ze szlakiem MAPK, natomiast wywoływała zwiększoną fosforylację podjednostki p65. Warto dodać, że podobne zwiększenie poziomu aktywacji podjednostki p65 czynnika transkrypcyjnego NFκB zaobserwowano w FLS poddanych dwukrotnej stymulacji TNF [210]. Wyniki analizy qPCR pokazały, że obserwowany efekt nie jest powiązany ze zmianami w poziomie ekspresji mRNA *RELA*. Taki wynik sugeruje, że za zwiększoną aktywację p65 mogą odpowiadać zmiany w aktywacji i/lub ekspresji białek uczestniczących w przekazaniu sygnału od receptora TNF, zaangażowanych w kanoniczną ścieżkę aktywacji szlaku NFκB [221]. Wcześniejsza ekspozycja komórek na *P. gingivalis* może również powodować indukcję ekspresji receptora TNF, tak więc gdy dochodzi do aktywacji zapalnej przez TNF, sygnał jest nasilony, co przekłada się na zwiększoną aktywność p65.

Należy również podkreślić, że uzyskane wyniki jedynie sugerują rolę p65 w utrzymującej się po infekcji *P. gingivalis* aktywacji zapalnej i wynik ten należałoby potwierdzić kolejnymi badaniami. Jedną z możliwości może być sprawdzenie translokacji jądrowej NFκB, za pomocą immunofluorescencji lub wykorzystanie systemu reporterowego opierającego się na wprowadzeniu do komórek konstruktów z lucyferazą do zmierzenia aktywności transkrypcyjnej NFκB. To właśnie aktywność/lokalizacja jądrowa będzie sugerować udział p65 w regulacji transkrypcji genów kodujących mediatory stanu zapalnego. Użycie inhibitora NFκB również byłoby pomocne w określeniu roli p65 w aktywacji zapalnej GFs. Warto także pamiętać, że

również inne szlaki są zaangażowane w aktywację zapalną GFs, dlatego należałoby przeprowadzić badania sprawdzające szerszy panel możliwych ścieżek sygnałowych regulowanych przez *P. gingivalis*.

Przedstawione w tej części badania można potraktować jako wyniki wstępne do przeprowadzenia bardziej dogłębnych analiz i dalszej optymalizacji przedstawionego modelu. Uzyskane wyniki pokazują efekty dla TNF, warto byłoby jednak sprawdzić czy są one specyficzne dla tej cytokiny, czy też stymulacja innym czynnikiem zapalnym, np. IL-1 β również będzie powodować podobne efekty. Kolejnym interesującym kierunkiem badań byłoby sprawdzenie odpowiedzi na podwójną infekcję *P. gingivalis* lub wykorzystanie innego patogenu (np. *T. forsythia*) i zbadanie odpowiedzi komórek na aktywację zapalną wywołaną cytokinami prozapalnymi. Zastosowanie takich modeli pozwoli na określenie roli poszczególnych bakterii/ cytokin w regulacji długotrwałych efektów infekcji patogenami jamy ustnej na odpowiedź zapalną GFs. Jednak, jeśli model miałby być jak najbardziej zbliżony do warunków fizjologicznych, to ciekawym doświadczeniem byłoby wykorzystanie do infekcji biofilmu bakteryjnego składającego się z jedenastu gatunków periodontopatogenów hodowanych razem [222] oraz koktajlu cytokinowego. Aby nadać takiemu modelowi pewien stopień chroniczności, to podobnie jak w pracy Takai i in. [142], komórki mogłyby być hodowane w obecności czynnika stymulującego przez wydłużony czas (ok. miesiąca). Wybrane modele można by także poddać weryfikacji na innym typie komórek, np. makrofagach czy innych komórkach strukturalnych dziąsła.

Podsumowując, opisane badania pokazują, że infekcja *P. gingivalis* wywiera długotrwały wpływ na aktywację GFs, czego wynikiem jest zwiększona produkcja IL-6 w odpowiedzi na kolejny bodziec zapalny. Co ciekawe, uzyskane wyniki sugerują, że zaobserwowana „pamięć immunologiczna” GFs nie jest regulowana przez mechanizmy epigenetyczne związane z metylacją DNA. Określenie pełnej skali i konsekwencji tego zjawiska, jak również potwierdzenie roli ścieżki NF κ B, wymaga jednak dalszych badań.

10 Bibliografia

- [1] N. J. Kassebaum, E. Bernabé, M. Dahiya, B. Bhandari, C. J. L. Murray, and W. Marcenes, “Global burden of severe periodontitis in 1990–2010: a systematic review and meta-regression.,” *J. Dent. Res.*, vol. 93, no. 11, pp. 1045–53, Nov. 2014.
- [2] WHO, “dane WHO,” *who.int*. [Online]. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/oral-health>. [Accessed: 09-Jun-2023].
- [3] R. P. Darveau, “Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis.,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 8, no. 7, pp. 481–490, 2010.
- [4] A. Stabholz, W. A. Soskolne, and L. Shapira, “Genetic and environmental risk factors for chronic periodontitis and aggressive periodontitis.,” *Periodontol. 2000*, vol. 53, pp. 138–53, Jun. 2010.
- [5] P. I. Eke, B. A. Dye, L. Wei, G. O. Thornton-Evans, R. J. Genco, and R. P. (University of W. CDC Periodontal Disease Surveillance workgroup: James Beck (University of North Carolina, Chapel Hill, USA), Gordon Douglass (Past President, American Academy of Periodontology), “Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010.,” *J. Dent. Res.*, vol. 91, no. 10, pp. 914–20, Oct. 2012.
- [6] S. Ji, Y. S. Choi, and Y. Choi, “Bacterial invasion and persistence: Critical events in the pathogenesis of periodontitis?,” *J. Periodontal Res.*, vol. 50, no. 5, pp. 570–585, 2015.
- [7] S. Shepherd, “Alcohol consumption a risk factor for periodontal disease.,” *Evid. Based. Dent.*, vol. 12, no. 3, p. 76, 2011.
- [8] G. Hajishengallis and R. J. Lamont, “Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology.,” *Mol. Oral Microbiol.*, vol. 27, no. 6, pp. 409–19, Dec. 2012.
- [9] G. Hajishengallis *et al.*, “Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement.,” *Cell Host Microbe*, vol. 10, no. 5, pp. 497–506, Nov. 2011.
- [10] G. Hajishengallis, “Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation.,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 15, no. 1, pp. 30–44, 2014.
- [11] M. L. Laine, W. Crielaard, and B. G. Loos, “Genetic susceptibility to periodontitis.,” *Periodontol. 2000*, vol. 58, no. 1, pp. 37–68, Feb. 2012.
- [12] S. E. Whitmore and R. J. Lamont, “The pathogenic persona of community-associated oral streptococci.,” *Mol. Microbiol.*, vol. 81, no. 2, pp. 305–14, Jul. 2011.
- [13] C. A. Daep, E. A. Novak, R. J. Lamont, and D. R. Demuth, “Structural dissection and in vivo effectiveness of a peptide inhibitor of Porphyromonas gingivalis adherence to Streptococcus gordonii.,” *Infect. Immun.*, vol. 79, no. 1, pp. 67–74, Jan. 2011.
- [14] Y. W. Han, “Fusobacterium nucleatum: a commensal-turned pathogen.,” *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 23, pp. 141–7, Feb. 2015.
- [15] C. A. Brennan and W. S. Garrett, “Fusobacterium nucleatum - symbiont, opportunist and oncobacterium.,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 17, no. 3, pp. 156–166, Mar. 2019.
- [16] N. Bostanci and G. N. Belibasakis, “Porphyromonas gingivalis: An invasive and evasive opportunistic oral pathogen,” *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 333, no. 1, pp. 1–9, 2012.
- [17] G. Hajishengallis and R. J. Lamont, “Breaking bad: Manipulation of the host response by Porphyromonas gingivalis,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 44, no. 2, pp. 328–338, 2014.

- [18] A. Sakanaka, H. Takeuchi, M. Kuboniwa, and A. Amano, "Dual lifestyle of *Porphyromonas gingivalis* in biofilm and gingival cells," *Microb. Pathog.*, vol. 94, pp. 42–47, 2016.
- [19] J. Y. Jang, K. J. Baek, Y. Choi, and S. Ji, "Relatively low invasive capacity of *Porphyromonas gingivalis* strains into human gingival fibroblasts in vitro.," *Arch. Oral Biol.*, vol. 83, no. August, pp. 265–271, Nov. 2017.
- [20] K. Y. How, K. P. Song, and K. G. Chan, "Porphyromonas gingivalis: An Overview of Periodontopathic Pathogen below the Gum Line.," *Front. Microbiol.*, vol. 7, p. 53, 2016.
- [21] W. Xu, W. Zhou, H. Wang, and S. Liang, "Roles of *Porphyromonas gingivalis* and its virulence factors in periodontitis.," *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.*, vol. 120, pp. 45–84, 2020.
- [22] A. Amano, "Molecular interaction of *Porphyromonas gingivalis* with host cells: implication for the microbial pathogenesis of periodontal disease.," *J. Periodontol.*, vol. 74, no. 1, pp. 90–6, Jan. 2003.
- [23] I. de Diego *et al.*, "Structure and mechanism of cysteine peptidase gingipain K (Kgp), a major virulence factor of *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis.," *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 46, pp. 32291–32302, Nov. 2014.
- [24] J. Brunner *et al.*, "The capsule of *Porphyromonas gingivalis* reduces the immune response of human gingival fibroblasts.," *BMC Microbiol.*, vol. 10, p. 5, Jan. 2010.
- [25] M. L. Laine, B. J. Appelmelk, and A. J. van Winkelhoff, "Prevalence and distribution of six capsular serotypes of *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis patients.," *J. Dent. Res.*, vol. 76, no. 12, pp. 1840–4, Dec. 1997.
- [26] C. O. Igboin, K. P. Tordoff, M. L. Moeschberger, A. L. Griffen, and E. J. Leys, "Porphyromonas gingivalis-host interactions in a *Drosophila melanogaster* model.," *Infect. Immun.*, vol. 79, no. 1, pp. 449–58, Jan. 2011.
- [27] C. Zenobia and G. Hajishengallis, "Porphyromonas gingivalis virulence factors involved in subversion of leukocytes and microbial dysbiosis.," *Virulence*, vol. 6, no. 3, pp. 236–43, 2015.
- [28] R. P. Darveau, C. M. Belton, R. A. Reife, and R. J. Lamont, "Local chemokine paralysis, a novel pathogenic mechanism for *Porphyromonas gingivalis*.," *Infect. Immun.*, vol. 66, no. 4, pp. 1660–5, Apr. 1998.
- [29] H. R. Zein Elabdeen, M. Mustafa, R. Ali, and A. I. Bolstad, "Cytokine profile in gingival crevicular fluid and plasma of patients with aggressive periodontitis," *Acta Odontol. Scand.*, vol. 75, no. 8, pp. 616–622, Nov. 2017.
- [30] A. F. Stadler, P. D. M. Angst, R. M. Arce, S. C. Gomes, R. V Oppermann, and C. Susin, "Gingival crevicular fluid levels of cytokines/chemokines in chronic periodontitis: a meta-analysis.," *J. Clin. Periodontol.*, vol. 43, no. 9, pp. 727–45, Sep. 2016.
- [31] G. Plemmenos, E. Evangelidou, N. Polizogopoulos, A. Chalazias, M. Deligianni, and C. Piperi, "Central Regulatory Role of Cytokines in Periodontitis and Targeting Options.," *Curr. Med. Chem.*, vol. 28, no. 15, pp. 3032–3058, 2021.
- [32] W. Pan, Q. Wang, and Q. Chen, "The cytokine network involved in the host immune response to periodontitis.," *Int. J. Oral Sci.*, vol. 11, no. 3, p. 30, Nov. 2019.
- [33] G. P. Garlet, "Critical reviews in oral biology & medicine: Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: A re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints," *J. Dent. Res.*, vol. 89, no. 12, pp. 1349–1363, 2010.
- [34] E. M. Cardoso, C. Reis, and M. C. Manzanares-Céspedes, "Chronic periodontitis, inflammatory cytokines, and interrelationship with other chronic diseases," *Postgrad. Med.*, vol. 130, no. 1, pp. 98–104, 2018.

- [35] F. Q. Bui *et al.*, “Association between periodontal pathogens and systemic disease.,” *Biomed. J.*, vol. 42, no. 1, pp. 27–35, Feb. 2019.
- [36] R. S. de Molon, C. Rossa, R. M. Thurlings, J. A. Cirelli, and M. I. Koenders, “Linkage of Periodontitis and Rheumatoid Arthritis: Current Evidence and Potential Biological Interactions.,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 18, Sep. 2019.
- [37] P. M. Preshaw *et al.*, “Periodontitis and diabetes: a two-way relationship.,” *Diabetologia*, vol. 55, no. 1, pp. 21–31, Jan. 2012.
- [38] S. S. Dominy *et al.*, “Porphyromonas gingivalis in Alzheimer’s disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors,” *Sci. Adv.*, vol. 5, no. 1, pp. 1–21, 2019.
- [39] D. S. Michaud, Z. Fu, J. Shi, and M. Chung, “Periodontal disease, tooth loss, and cancer risk,” *Epidemiol. Rev.*, vol. 39, no. 1, pp. 49–58, 2017.
- [40] A. Wielento, K. B. Lagosz-Cwik, J. Potempa, and A. M. Grabiec, “The Role of Gingival Fibroblasts in the Pathogenesis of Periodontitis.,” *J. Dent. Res.*, p. 220345231151921, Mar. 2023.
- [41] S. Davidson *et al.*, “Fibroblasts as immune regulators in infection, inflammation and cancer.,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 21, no. 11, pp. 704–717, Nov. 2021.
- [42] A. P. Croft *et al.*, “Distinct fibroblast subsets drive inflammation and damage in arthritis,” *Nature*, vol. 570, no. 7760, pp. 246–251, 2019.
- [43] E. Valenzi *et al.*, “Single-cell analysis reveals fibroblast heterogeneity and myofibroblasts in systemic sclerosis-associated interstitial lung disease.,” *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 78, no. 10, pp. 1379–1387, Oct. 2019.
- [44] S. Su *et al.*, “CD10+GPR77+ Cancer-Associated Fibroblasts Promote Cancer Formation and Chemoresistance by Sustaining Cancer Stemness.,” *Cell*, vol. 172, no. 4, pp. 841–856.e16, Feb. 2018.
- [45] K. Naruishi, “Biological Roles of Fibroblasts in Periodontal Diseases.,” *Cells*, vol. 11, no. 21, Oct. 2022.
- [46] E. Palm, I. Demirel, T. Bengtsson, and H. Khalaf, “The role of toll-like and protease-activated receptors in the expression of cytokines by gingival fibroblasts stimulated with the periodontal pathogen Porphyromonas gingivalis.,” *Cytokine*, vol. 76, no. 2, pp. 424–432, Dec. 2015.
- [47] A. Uehara and H. Takada, “Functional TLRs and NODs in Human Gingival Fibroblasts,” *J. Dent. Res.*, vol. 86, no. 3, pp. 249–254, Mar. 2007.
- [48] D. W. Williams *et al.*, “Human oral mucosa cell atlas reveals a stromal-neutrophil axis regulating tissue immunity.,” *Cell*, vol. 184, no. 15, pp. 4090–4104.e15, Jul. 2021.
- [49] T. Yucel-Lindberg and T. Båge, “Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis.,” *Expert Rev. Mol. Med.*, vol. 15, p. e7, Aug. 2013.
- [50] K. B. Lagosz-Cwik *et al.*, “hTERT-immortalized gingival fibroblasts respond to cytokines but fail to mimic primary cell responses to Porphyromonas gingivalis.,” *Sci. Rep.*, vol. 11, no. 1, p. 10770, 2021.
- [51] D. F. Lappin, S. Sherrabeh, and C. Erridge, “Stimulants of Toll-like receptors 2 and 4 are elevated in saliva of periodontitis patients compared with healthy subjects.,” *J. Clin. Periodontol.*, vol. 38, no. 4, pp. 318–25, Apr. 2011.
- [52] P.-L. Wang *et al.*, “DNA microarray analysis of human gingival fibroblasts from healthy and inflammatory gingival tissues.,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 305, no. 4, pp. 970–3,

Jun. 2003.

- [53] S. Sumedha, V. S. Kotrashetti, R. S. Nayak, A. Nayak, and A. Raikar, "Immunohistochemical localization of TLR2 and CD14 in gingival tissue of healthy individuals and patients with chronic periodontitis," *Biotech. Histochem.*, vol. 92, no. 7, pp. 487–497, 2017.
- [54] A. C. F. Morandini *et al.*, "Toll-like receptor 2 knockdown modulates interleukin (IL)-6 and IL-8 but not stromal derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) in human periodontal ligament and gingival fibroblasts.," *J. Periodontol.*, vol. 84, no. 4, pp. 535–44, Apr. 2013.
- [55] B. Nativel *et al.*, "Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharides act exclusively through TLR4 with a resilience between mouse and human.," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 15789, Nov. 2017.
- [56] Y.-L. Tsai *et al.*, "Stimulation of prostanoids and IL-8 production in human gingival fibroblasts by Porphyromonas gingivalis LPS is associated with MEK/ERK signaling," *J. Dent. Sci.*, vol. 9, no. 1, pp. 78–84, Mar. 2014.
- [57] C. W. Brinson, Z. Lu, Y. Li, M. F. Lopes-Virella, and Y. Huang, "Lipopolysaccharide and IL-1 β coordinate a synergy on cytokine production by upregulating MyD88 expression in human gingival fibroblasts.," *Mol. Immunol.*, vol. 79, no. 3, pp. 47–54, Nov. 2016.
- [58] T. D. K. Herath *et al.*, "Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide lipid A heterogeneity differentially modulates the expression of IL-6 and IL-8 in human gingival fibroblasts.," *J. Clin. Periodontol.*, vol. 38, no. 8, pp. 694–701, Aug. 2011.
- [59] A. Wielento *et al.*, "TLR2 Activation by Porphyromonas gingivalis Requires Both PPAD Activity and Fimbriae.," *Front. Immunol.*, vol. 13, no. April, p. 823685, 2022.
- [60] H.-J. Yoo and S.-H. Lee, "Virulence of Filifactor alocis lipoteichoic acid on human gingival fibroblast.," *Arch. Oral Biol.*, vol. 135, p. 105370, Mar. 2022.
- [61] S. I. Tanabe, C. Bodet, and D. Grenier, "Treponema denticola lipooligosaccharide activates gingival fibroblasts and upregulates inflammatory mediator production," *J. Cell. Physiol.*, vol. 216, no. 3, pp. 727–731, 2008.
- [62] G. N. Belibasakis, K. Bao, and N. Bostanci, "Transcriptional profiling of human gingival fibroblasts in response to multi-species in vitro subgingival biofilms," *Mol. Oral Microbiol.*, vol. 29, no. 4, pp. 174–183, 2014.
- [63] H. Davanian *et al.*, "Signaling pathways involved in the regulation of TNF α -induced toll-like receptor 2 expression in human gingival fibroblasts.," *Cytokine*, vol. 57, no. 3, pp. 406–16, Mar. 2012.
- [64] T. Båge, J. Lindberg, J. Lundeberg, T. Mod er, and T. Yucel-Lindberg, "Signal pathways JNK and NF-kappaB, identified by global gene expression profiling, are involved in regulation of TNFalpha-induced mPGES-1 and COX-2 expression in gingival fibroblasts.," *BMC Genomics*, vol. 11, no. 1, p. 241, Apr. 2010.
- [65] A. Maksylewicz *et al.*, "BET Bromodomain Inhibitors Suppress Inflammatory Activation of Gingival Fibroblasts and Epithelial Cells From Periodontitis Patients.," *Front. Immunol.*, vol. 10, no. April, p. 933, Apr. 2019.
- [66] D. Y. Ha, J. Jung, G. H. Choi, and S. Ji, "Polarization of human gingival fibroblasts by Th1-, Th2-, Th17-, and Treg-derived cytokines.," *J. Periodontal Res.*, vol. 57, no. 3, pp. 487–501, Jun. 2022.
- [67] Z. Metzger, J. Blasbalg, M. Dotan, and E. I. Weiss, "Enhanced attachment of Porphyromonas gingivalis to human fibroblasts mediated by Fusobacterium nucleatum.," *J. Endod.*, vol. 35, no. 1, pp. 82–5, Jan. 2009.
- [68] R. Tamai, M. Sugamata, and Y. Kiyoura, "Candida albicans enhances invasion of human

- gingival epithelial cells and gingival fibroblasts by *Porphyromonas gingivalis*,” *Microb. Pathog.*, vol. 51, no. 4, pp. 250–4, Oct. 2011.
- [69] K. Gawron *et al.*, “Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* contributes to infection of gingival fibroblasts and induction of prostaglandin E2 -signaling pathway,” *Mol. Oral Microbiol.*, vol. 29, no. 6, pp. 321–32, Dec. 2014.
- [70] M. Irshad, W. A. van der Reijden, W. Crielaard, and M. L. Laine, “In vitro invasion and survival of *Porphyromonas gingivalis* in gingival fibroblasts; role of the capsule,” *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, vol. 60, no. 6, pp. 469–76, Dec. 2012.
- [71] C. K. Mantri *et al.*, “Fimbriae-mediated outer membrane vesicle production and invasion of *Porphyromonas gingivalis*,” *Microbiologyopen*, vol. 4, no. 1, pp. 53–65, Feb. 2015.
- [72] C. G. J. Moonen *et al.*, “Survival, Retention, and Selective Proliferation of Lymphocytes Is Mediated by Gingival Fibroblasts,” *Front. Immunol.*, vol. 9, p. 1725, 2018.
- [73] N. Scheres, T. J. de Vries, J. Brunner, W. Crielaard, M. L. Laine, and V. Everts, “Diverse effects of *Porphyromonas gingivalis* on human osteoclast formation,” *Microb. Pathog.*, vol. 51, no. 3, pp. 149–55, Sep. 2011.
- [74] E. Ruppeka-Rupeika, J. Hogervorst, F. Wouters, T. Schoenmaker, T. Forouzanfar, and T. J. de Vries, “Osteogenic and osteoclastogenic potential of jaw bone-derived cells-A case study,” *J. Cell. Biochem.*, vol. 119, no. 7, pp. 5391–5401, 2018.
- [75] J. Costa-Rodrigues and M. H. Fernandes, “Paracrine-mediated differentiation and activation of human haematopoietic osteoclast precursor cells by skin and gingival fibroblasts,” *Cell Prolif.*, vol. 44, no. 3, pp. 264–73, Jun. 2011.
- [76] Y. Ujiie, T. Karakida, Y. Yamakoshi, T. Ohshima, K. Gomi, and S. Oida, “Interleukin-4 released from human gingival fibroblasts reduces osteoclastogenesis,” *Arch. Oral Biol.*, vol. 72, pp. 187–193, Dec. 2016.
- [77] T. J. de Vries *et al.*, “Gingival fibroblasts are better at inhibiting osteoclast formation than periodontal ligament fibroblasts,” *J. Cell. Biochem.*, vol. 98, no. 2, pp. 370–382, May 2006.
- [78] G. N. Belibasakis *et al.*, “Regulation of RANKL and OPG gene expression in human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells by *Porphyromonas gingivalis*: a putative role of the Arg-gingipains,” *Microb. Pathog.*, vol. 43, no. 1, pp. 46–53, Jul. 2007.
- [79] G. N. Belibasakis, A. Meier, B. Guggenheim, and N. Bostanci, “The RANKL-OPG system is differentially regulated by supragingival and subgingival biofilm supernatants,” *Cytokine*, vol. 55, no. 1, pp. 98–103, 2011.
- [80] I. Binderman, N. Gadban, and A. Yaffe, “Extracellular ATP is a key modulator of alveolar bone loss in periodontitis,” *Arch. Oral Biol.*, vol. 81, pp. 131–135, 2017.
- [81] G. D. Karlis *et al.*, “Chronic Exposure of Gingival Fibroblasts to TLR2 or TLR4 Agonist Inhibits Osteoclastogenesis but Does Not Affect Osteogenesis,” *Front. Immunol.*, vol. 11, p. 1693, 2020.
- [82] D. Hormdee *et al.*, “Protein kinase-A-dependent osteoprotegerin production on interleukin-1 stimulation in human gingival fibroblasts is distinct from periodontal ligament fibroblasts,” *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 142, no. 3, pp. 490–7, Dec. 2005.
- [83] D. A. Tipton, B. A. Seshul, and M. K. Dabbous, “Effect of bisphosphonates on human gingival fibroblast production of mediators of osteoclastogenesis: RANKL, osteoprotegerin and interleukin-6,” *J. Periodontal Res.*, vol. 46, no. 1, pp. 39–47, Feb. 2011.
- [84] S. B. Bozkurt, S. S. Hakki, E. E. Hakki, Y. Durak, and A. Kantarci, “*Porphyromonas gingivalis* Lipopolysaccharide Induces a Pro-inflammatory Human Gingival Fibroblast Phenotype,”

- Inflammation*, vol. 40, no. 1, pp. 144–153, 2017.
- [85] M. Nokhbehsaim *et al.*, “Regulation of matrix metalloproteinase-1 by Filifactor alocis in human gingival and monocytic cells,” *Clin. Oral Investig.*, vol. 24, no. 6, pp. 1987–1995, Jun. 2020.
- [86] K. Naruishi and T. Nagata, “Biological effects of interleukin-6 on Gingival Fibroblasts: Cytokine regulation in periodontitis,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 233, no. 9, pp. 6393–6400, 2018.
- [87] Y. Yamaguchi *et al.*, “Targeting hepatocyte growth factor in epithelial-stromal interactions in an in vitro experimental model of human periodontitis,” *Odontology*, vol. 109, no. 4, pp. 912–920, Oct. 2021.
- [88] C. H. Waddington, “The epigenotype. 1942.,” *Int. J. Epidemiol.*, vol. 41, no. 1, pp. 10–3, Feb. 2012.
- [89] S. L. Berger, T. Kouzarides, R. Shiekhattar, and A. Shilatifard, “An operational definition of epigenetics,” *Genes Dev.*, vol. 23, no. 7, pp. 781–3, Apr. 2009.
- [90] E. Popova and C. J. Barnstable, “Epigenetics rules,” *J. Ocul. Biol. Dis. Infor.*, vol. 4, no. 3, pp. 93–94, 2011.
- [91] S. Spange, T. Wagner, T. Heinzl, and O. H. Krämer, “Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels,” *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 41, no. 1, pp. 185–198, 2009.
- [92] T. Narita, B. T. Weinert, and C. Choudhary, “Author Correction: Functions and mechanisms of non-histone protein acetylation,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 20, no. 8, p. 508, Aug. 2019.
- [93] C. Choudhary *et al.*, “Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions,” *Science (80-.)*, vol. 325, no. 5942, pp. 834–840, 2009.
- [94] I. Ali, R. J. Conrad, E. Verdin, and M. Ott, “Lysine Acetylation Goes Global: From Epigenetics to Metabolism and Therapeutics,” *Chem. Rev.*, vol. 118, no. 3, pp. 1216–1252, 2018.
- [95] K. T. Jurdziński, J. Potempa, and A. M. Grabiec, “Epigenetic regulation of inflammation in periodontitis: cellular mechanisms and therapeutic potential,” *Clin. Epigenetics*, vol. 12, no. 1, p. 186, Nov. 2020.
- [96] M. Shvedunova and A. Akhtar, “Modulation of cellular processes by histone and non-histone protein acetylation,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 23, no. 5, pp. 329–349, May 2022.
- [97] E. Seto and M. Yoshida, “Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 6, no. 4, p. a018713, Apr. 2014.
- [98] H. Chen, C. Xie, Q. Chen, and S. Zhuang, “HDAC11, an emerging therapeutic target for metabolic disorders,” *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, vol. 13, no. October, p. 989305, 2022.
- [99] A. D. Bondarev, M. M. Attwood, J. Jonsson, V. N. Chubarev, V. V Tarasov, and H. B. Schiöth, “Recent developments of HDAC inhibitors: Emerging indications and novel molecules,” *Br. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 87, no. 12, pp. 4577–4597, Dec. 2021.
- [100] T. C. S. Ho, A. H. Y. Chan, and A. Ganesan, “Thirty Years of HDAC Inhibitors: 2020 Insight and Hindsight,” *J. Med. Chem.*, vol. 63, no. 21, pp. 12460–12484, Nov. 2020.
- [101] A. M. Grabiec, P. P. Tak, and K. A. Reedquist, “Function of histone deacetylase inhibitors in inflammation,” *Crit. Rev. Immunol.*, vol. 31, no. 3, pp. 233–63, Jan. 2011.
- [102] L. Zhang, S. Jin, C. Wang, R. Jiang, and J. Wan, “Histone deacetylase inhibitors attenuate acute lung injury during cecal ligation and puncture-induced polymicrobial sepsis,” *World J. Surg.*, vol. 34, no. 7, pp. 1676–83, Jul. 2010.

- [103] Y. Li *et al.*, “Inhibition of histone deacetylase 6 improves long-term survival in a lethal septic model.,” *J. Trauma Acute Care Surg.*, vol. 78, no. 2, pp. 378–85, Feb. 2015.
- [104] T. Zhao, Y. Li, R. T. Bronson, B. Liu, G. C. Velmahos, and H. B. Alam, “Selective histone deacetylase-6 inhibition attenuates stress responses and prevents immune organ atrophy in a lethal septic model.,” *Surgery*, vol. 156, no. 2, pp. 235–42, Aug. 2014.
- [105] A. Portela and M. Esteller, “Epigenetic modifications and human disease.,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 28, no. 10, pp. 1057–68, Oct. 2010.
- [106] R. Lister *et al.*, “Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences.,” *Nature*, vol. 462, no. 7271, pp. 315–22, Nov. 2009.
- [107] B. H. Ramsahoye, D. Biniszkiwicz, F. Lyko, V. Clark, A. P. Bird, and R. Jaenisch, “Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, no. 10, pp. 5237–42, May 2000.
- [108] J. B. Margot, A. E. Ehrenhofer-Murray, and H. Leonhardt, “Interactions within the mammalian DNA methyltransferase family.,” *BMC Mol. Biol.*, vol. 4, p. 7, May 2003.
- [109] A. Jeltsch *et al.*, “Mechanism and biological role of Dnmt2 in Nucleic Acid Methylation.,” *RNA Biol.*, vol. 14, no. 9, pp. 1108–1123, Sep. 2017.
- [110] C.-W. J. Lio and A. Rao, “TET Enzymes and 5hmC in Adaptive and Innate Immune Systems.,” *Front. Immunol.*, vol. 10, p. 210, 2019.
- [111] L. D. Moore, T. Le, and G. Fan, “DNA methylation and its basic function.,” *Neuropsychopharmacology*, vol. 38, no. 1, pp. 23–38, Jan. 2013.
- [112] C. Gros *et al.*, “DNA methylation inhibitors in cancer: recent and future approaches.,” *Biochimie*, vol. 94, no. 11, pp. 2280–96, Nov. 2012.
- [113] J.-P. J. Raynal, N. J.-M., & Issa, “DNA Methyltransferase Inhibitors,” *Drug Discov. Cancer Epigenetics*, pp. 169–190, 2016.
- [114] X. Huang *et al.*, “Decitabine and 5-azacitidine both alleviate LPS induced ARDS through anti-inflammatory/antioxidant activity and protection of glycocalyx and inhibition of MAPK pathways in mice.,” *Biomed. Pharmacother.*, vol. 84, pp. 447–453, Dec. 2016.
- [115] K. Mangano *et al.*, “Hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (DAC) ameliorates multiple sclerosis in mouse models.,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 229, no. 12, pp. 1918–25, Dec. 2014.
- [116] Q. Cao *et al.*, “Inhibiting DNA Methylation by 5-Aza-2'-deoxycytidine ameliorates atherosclerosis through suppressing macrophage inflammation.,” *Endocrinology*, vol. 155, no. 12, pp. 4925–38, Dec. 2014.
- [117] M. D. Cantley, A. A. S. S. K. Dharmapatni, K. Algate, T. N. Crotti, P. M. Bartold, and D. R. Haynes, “Class I and II histone deacetylase expression in human chronic periodontitis gingival tissue,” *J. Periodontal Res.*, vol. 51, no. 2, pp. 143–151, Apr. 2016.
- [118] A. Liaw, C. Liu, M. Bartold, S. Ivanovski, and P. Han, “Salivary histone deacetylase in periodontal disease: A cross-sectional pilot study.,” *J. Periodontal Res.*, vol. 58, no. 2, pp. 433–443, Apr. 2023.
- [119] L. Yin and W. O. Chung, “Epigenetic regulation of human β -defensin 2 and CC chemokine ligand 20 expression in gingival epithelial cells in response to oral bacteria,” *Mucosal Immunol.*, vol. 4, no. 4, pp. 409–419, Jul. 2011.
- [120] I. M. Ateia *et al.*, “*Treponema denticola* increases MMP-2 expression and activation in the periodontium via reversible DNA and histone modifications.,” *Cell. Microbiol.*, vol. 20, no. 4,

pp. 100–106, 2018.

- [121] M. D. Martins *et al.*, “Epigenetic Modifications of Histones in Periodontal Disease,” *J. Dent. Res.*, vol. 95, no. 2, pp. 215–222, 2016.
- [122] Łagosz Katarzyna, “Regulacja ekspresji i aktywności deacetylaz histonów przez *Porphyromonas gingivalis* i cytokiny prozapalne w ludzkich fibroblastach dziąsłowych,” 2018.
- [123] N. C.-N. Huynh, V. Everts, P. Pavasant, and R. S. Ampornaramveth, “Inhibition of Histone Deacetylases Enhances the Osteogenic Differentiation of Human Periodontal Ligament Cells.,” *J. Cell. Biochem.*, vol. 117, no. 6, pp. 1384–95, Jun. 2016.
- [124] T.-I. Kim, J.-E. Han, H.-M. Jung, J.-H. Oh, and K. M. Woo, “Analysis of histone deacetylase inhibitor-induced responses in human periodontal ligament fibroblasts,” *Biotechnol. Lett.*, vol. 35, no. 1, pp. 129–33, Jan. 2013.
- [125] M. D. Cantley *et al.*, “Histone deacetylase inhibitors and periodontal bone loss.,” *J. Periodontol.*, vol. 46, no. 6, pp. 697–703, Dec. 2011.
- [126] Q. Li *et al.*, “Epigenetic modifier trichostatin A enhanced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by inhibiting NF- κ B (p65) DNA binding and promoted periodontal repair in rats.,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 235, no. 12, pp. 9691–9701, Dec. 2020.
- [127] G. de Camargo Pereira *et al.*, “*Porphyromonas gingivalis* LPS stimulation downregulates DNMT1, DNMT3a, and JMJD3 gene expression levels in human HaCaT keratinocytes.,” *Clin. Oral Investig.*, vol. 17, no. 4, pp. 1279–85, May 2013.
- [128] L. Larsson, S. Thorbert-Mros, A. Lopez-Lago, J. Kalm, A. Shikhan, and T. Berglundh, “Expression of TET2 enzyme indicates enhanced epigenetic modification of cells in periodontitis.,” *Eur. J. Oral Sci.*, vol. 124, no. 4, pp. 329–33, Aug. 2016.
- [129] F. Diomedea *et al.*, “*Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide stimulation in human periodontal ligament stem cells: role of epigenetic modifications to the inflammation.,” *Eur. J. Histochem.*, vol. 61, no. 3, p. 2826, Aug. 2017.
- [130] S. Seutter *et al.*, “Interleukin 1 β and Prostaglandin E2 affect expression of DNA methylating and demethylating enzymes in human gingival fibroblasts,” *Int. Immunopharmacol.*, vol. 78, no. September 2019, 2020.
- [131] A. P. De Souza, A. C. Planello, M. R. Marques, D. D. De Carvalho, and S. R. P. Line, “High-throughput DNA analysis shows the importance of methylation in the control of immune inflammatory gene transcription in chronic periodontitis.,” *Clin. Epigenetics*, vol. 6, no. 1, p. 15, 2014.
- [132] S. P. Barros and S. Offenbacher, “Modifiable risk factors in periodontal disease: epigenetic regulation of gene expression in the inflammatory response.,” *Periodontol. 2000*, vol. 64, no. 1, pp. 95–110, Feb. 2014.
- [133] S. Zhang *et al.*, “Epigenetic regulation of TNFA expression in periodontal disease.,” *J. Periodontol.*, vol. 84, no. 11, pp. 1606–16, Nov. 2013.
- [134] S. Zhang, A. Crivello, S. Offenbacher, A. Moretti, D. W. Paquette, and S. P. Barros, “Interferon-gamma promoter hypomethylation and increased expression in chronic periodontitis.,” *J. Clin. Periodontol.*, vol. 37, no. 11, pp. 953–61, Nov. 2010.
- [135] S. A. de Faria Amormino *et al.*, “Hypermethylation and low transcription of TLR2 gene in chronic periodontitis.,” *Hum. Immunol.*, vol. 74, no. 9, pp. 1231–6, Sep. 2013.
- [136] N. F. P. De Oliveira *et al.*, “TLR2 and TLR4 gene promoter methylation status during chronic periodontitis.,” *J. Clin. Periodontol.*, vol. 38, no. 11, pp. 975–83, Nov. 2011.

- [137] A. Kojima, T. Kobayashi, S. Ito, A. Murasawa, K. Nakazono, and H. Yoshie, "Tumor necrosis factor-alpha gene promoter methylation in Japanese adults with chronic periodontitis and rheumatoid arthritis.," *J. Periodontal Res.*, vol. 51, no. 3, pp. 350–8, Jun. 2016.
- [138] K. Ishida *et al.*, "Interleukin-6 gene promoter methylation in rheumatoid arthritis and chronic periodontitis.," *J. Periodontol.*, vol. 83, no. 7, pp. 917–25, Jul. 2012.
- [139] T. Kobayashi, K. Ishida, and H. Yoshie, "Increased expression of interleukin-6 (IL-6) gene transcript in relation to IL-6 promoter hypomethylation in gingival tissue from patients with chronic periodontitis.," *Arch. Oral Biol.*, vol. 69, pp. 89–94, Sep. 2016.
- [140] M. Benakanakere, M. Abdolhosseini, K. Hosur, L. S. Finoti, and D. F. Kinane, "TLR2 promoter hypermethylation creates innate immune dysbiosis.," *J. Dent. Res.*, vol. 94, no. 1, pp. 183–91, Jan. 2015.
- [141] S. P. Barros, E. Hefni, F. Fahimipour, S. Kim, and P. Arora, "Maintaining barrier function of infected gingival epithelial cells by inhibition of DNA methylation.," *J. Periodontol.*, vol. 91 Suppl 1, pp. S68–S78, Oct. 2020.
- [142] R. Takai *et al.*, "DNA hypermethylation of extracellular matrix-related genes in human periodontal fibroblasts induced by stimulation for a prolonged period with lipopolysaccharide derived from *Porphyromonas gingivalis*.," *J. Periodontal Res.*, vol. 51, no. 4, pp. 508–17, Aug. 2016.
- [143] J. L. Drury and W. O. Chung, "DNA methylation differentially regulates cytokine secretion in gingival epithelia in response to bacterial challenges.," *Pathog. Dis.*, vol. 73, no. 2, pp. 1–6, Mar. 2015.
- [144] Y. Cho *et al.*, "Direct Gingival Fibroblast/Osteoblast Transdifferentiation via Epigenetics.," *J. Dent. Res.*, vol. 96, no. 5, pp. 555–561, May 2017.
- [145] U. Tanaka, S. Kajioka, L. S. Finoti, D. B. Palioto, D. F. Kinane, and M. R. Benakanakere, "Decitabine Inhibits Bone Resorption in Periodontitis by Upregulating Anti-Inflammatory Cytokines and Suppressing Osteoclastogenesis.," *Biomedicines*, vol. 9, no. 2, Feb. 2021.
- [146] R. Loo-Kirana, M. Gilijamse, J. Hogervorst, T. Schoenmaker, and T. J. de Vries, "Although Anatomically Micrometers Apart: Human Periodontal Ligament Cells Are Slightly More Active in Bone Remodeling Than Alveolar Bone Derived Cells.," *Front. cell Dev. Biol.*, vol. 9, p. 709408, 2021.
- [147] F. Veillard, B. Potempa, M. Poreba, M. Drag, and J. Potempa, "Gingipain aminopeptidase activities in *Porphyromonas gingivalis*.," *Biol. Chem.*, vol. 393, no. 12, pp. 1471–6, Dec. 2012.
- [148] A. S. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas, N. Alpaslan, and A. Bozoglan, "Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1?? and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis.," *J. Periodontal Res.*, vol. 48, no. 1, pp. 44–51, 2013.
- [149] M. Ghizzoni, H. J. Haisma, H. Maarsingh, and F. J. Dekker, "Histone acetyltransferases are crucial regulators in NF-κB mediated inflammation.," *Drug Discov. Today*, vol. 16, no. 11–12, pp. 504–511, 2011.
- [150] W. Cao, C. Bao, E. Padalko, and C. J. Lowenstein, "Acetylation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 inhibits Toll-like receptor signaling.," *J. Exp. Med.*, vol. 205, no. 6, pp. 1491–503, Jun. 2008.
- [151] H. Tang and D. Goldman, "Activity-dependent gene regulation in skeletal muscle is mediated by a histone deacetylase (HDAC)-Dach2-myogenin signal transduction cascade.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 45, pp. 16977–82, Nov. 2006.

- [152] N. Scheres *et al.*, “Periodontal ligament and gingival fibroblasts from periodontitis patients are more active in interaction with *Porphyromonas gingivalis*,” *J. Periodontal Res.*, vol. 46, no. 4, pp. 407–416, 2011.
- [153] K. J. Baek, Y. Choi, and S. Ji, “Gingival fibroblasts from periodontitis patients exhibit inflammatory characteristics in vitro,” *Arch. Oral Biol.*, vol. 58, no. 10, pp. 1282–1292, 2013.
- [154] K. O. Osuala and B. F. Sloane, “Many Roles of CCL20: Emphasis on Breast Cancer.,” *Postdoc J. a J. Postdr. Res. Postdr. Aff.*, vol. 2, no. 3, pp. 7–16, Mar. 2014.
- [155] S. C. Yung and P. M. Murphy, “Antimicrobial chemokines.,” *Front. Immunol.*, vol. 3, p. 276, 2012.
- [156] Y. Cho *et al.*, “Direct Gingival Fibroblast/Osteoblast Transdifferentiation via Epigenetics.,” *J. Dent. Res.*, vol. 96, no. 5, pp. 555–561, May 2017.
- [157] R. L. Momparler, “Epigenetic therapy of non-small cell lung cancer using decitabine (5-aza-2'-deoxycytidine).,” *Front. Oncol.*, vol. 3, p. 188, 2013.
- [158] E. Atallah, H. Kantarjian, and G. Garcia-Manero, “The role of decitabine in the treatment of myelodysplastic syndromes.,” *Expert Opin. Pharmacother.*, vol. 8, no. 1, pp. 65–73, Jan. 2007.
- [159] D. K. Rogstad *et al.*, “Chemical decomposition of 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine): kinetic analyses and identification of products by NMR, HPLC, and mass spectrometry.,” *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 22, no. 6, pp. 1194–204, Jun. 2009.
- [160] T. Crowley, C. D. Buckley, and A. R. Clark, “Stroma: the forgotten cells of innate immune memory.,” *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 193, no. 1, pp. 24–36, Jul. 2018.
- [161] G. Hajishengallis, “Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response,” *Trends Immunol.*, vol. 35, no. 1, pp. 3–11, Jan. 2014.
- [162] T. Yucel-Lindberg and T. Båge, “Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis.,” *Expert Rev. Mol. Med.*, vol. 15, p. e7, Aug. 2013.
- [163] D. Graves, “Cytokines that promote periodontal tissue destruction.,” *J. Periodontol.*, vol. 79, no. 8 Suppl, pp. 1585–91, Aug. 2008.
- [164] D. E. Ramadan, N. Hariyani, R. Indrawati, R. D. Ridwan, and I. Diyatri, “Cytokines and Chemokines in Periodontitis.,” *Eur. J. Dent.*, vol. 14, no. 3, pp. 483–495, Jul. 2020.
- [165] P. M. Preshaw, “Host modulation therapy with anti-inflammatory agents,” *Periodontol. 2000*, vol. 76, no. 1, pp. 131–149, 2018.
- [166] C. Angiolilli *et al.*, “Inflammatory cytokines epigenetically regulate rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocyte activation by suppressing HDAC5 expression.,” *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 75, no. 2, pp. 430–8, Feb. 2016.
- [167] B. G. Cosío *et al.*, “Histone Acetylase and Deacetylase Activity in Alveolar Macrophages and Blood Mononocytes in Asthma,” *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 170, no. 2, pp. 141–147, 2004.
- [168] J. C. Garcia-Garcia, N. C. Barat, S. J. Trembley, and J. S. Dumler, “Epigenetic silencing of host cell defense genes enhances intracellular survival of the rickettsial pathogen *Anaplasma phagocytophilum*.,” *PLoS Pathog.*, vol. 5, no. 6, p. e1000488, Jun. 2009.
- [169] J. K. Ariffin *et al.*, “Histone Deacetylase Inhibitors Promote Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production and Bacterial Clearance by Human Macrophages.,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 60, no. 3, pp. 1521–9, Dec. 2015.
- [170] S.-D. Ha, C. Reid, S. Meshkibaf, and S. O. Kim, “Inhibition of Interleukin 1 β (IL-1 β)

- Expression by Anthrax Lethal Toxin (LeTx) Is Reversed by Histone Deacetylase 8 (HDAC8) Inhibition in Murine Macrophages.," *J. Biol. Chem.*, vol. 291, no. 16, pp. 8745–55, Apr. 2016.
- [171] M. Campo *et al.*, "HDAC3 inhibitor RGFP966 controls bacterial growth and modulates macrophage signaling during Mycobacterium tuberculosis infection.," *Tuberculosis (Edinb.)*, vol. 127, p. 102062, Mar. 2021.
- [172] C. Angiolilli *et al.*, "Histone deacetylase 3 regulates the inflammatory gene expression programme of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes.," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 76, no. 1, pp. 277–285, Jan. 2017.
- [173] X. Chen *et al.*, "Requirement for the histone deacetylase Hdac3 for the inflammatory gene expression program in macrophages.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 42, pp. E2865–74, Oct. 2012.
- [174] M. A. Hoeksema *et al.*, "Targeting macrophage Histone deacetylase 3 stabilizes atherosclerotic lesions.," *EMBO Mol. Med.*, vol. 6, no. 9, pp. 1124–32, Sep. 2014.
- [175] J. Gillespie *et al.*, "Histone deacetylases are dysregulated in rheumatoid arthritis and a novel histone deacetylase 3-selective inhibitor reduces interleukin-6 production by peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients.," *Arthritis Rheum.*, vol. 64, no. 2, pp. 418–22, Feb. 2012.
- [176] G. Mizraji *et al.*, "Porphyromonas gingivalis Promotes Unrestrained Type I Interferon Production by Dysregulating TAM Signaling via MYD88 Degradation.," *Cell Rep.*, vol. 18, no. 2, pp. 419–431, Jan. 2017.
- [177] D. H. H. Molstad, A. M. Mattson, D. L. Begun, J. J. Westendorf, and E. W. Bradley, "Hdac3 regulates bone modeling by suppressing osteoclast responsiveness to RANKL.," *J. Biol. Chem.*, vol. 295, no. 51, pp. 17713–17723, Dec. 2020.
- [178] D. F. Razidlo *et al.*, "Histone deacetylase 3 depletion in osteo/chondroprogenitor cells decreases bone density and increases marrow fat.," *PLoS One*, vol. 5, no. 7, p. e11492, Jul. 2010.
- [179] S. Ropero and M. Esteller, "The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer.," *Mol. Oncol.*, vol. 1, no. 1, pp. 19–25, Jun. 2007.
- [180] G. P. Delcuve, D. H. Khan, and J. R. Davie, "Roles of histone deacetylases in epigenetic regulation: emerging paradigms from studies with inhibitors.," *Clin. Epigenetics*, vol. 4, no. 1, p. 5, Mar. 2012.
- [181] M. Bantscheff *et al.*, "Chemoproteomics profiling of HDAC inhibitors reveals selective targeting of HDAC complexes.," *Nat. Biotechnol.*, vol. 29, no. 3, pp. 255–65, Mar. 2011.
- [182] E. Karouzakis, R. E. Gay, B. A. Michel, S. Gay, and M. Neidhart, "DNA hypomethylation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts.," *Arthritis Rheum.*, vol. 60, no. 12, pp. 3613–22, Dec. 2009.
- [183] X. Mi and F. Zeng, "Hypomethylation of interleukin-4 and -6 promoters in T cells from systemic lupus erythematosus patients.," *Acta Pharmacol. Sin.*, vol. 29, no. 1, pp. 105–12, Jan. 2008.
- [184] M. Zhao *et al.*, "Hypomethylation of IL10 and IL13 promoters in CD4+ T cells of patients with systemic lupus erythematosus.," *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2010, p. 931018, 2010.
- [185] G. R. Souto, C. M. Queiroz, F. O. Costa, and R. A. Mesquita, "Relationship between chemokines and dendritic cells in human chronic periodontitis.," *J. Periodontol.*, vol. 85, no. 10, pp. 1416–23, Oct. 2014.
- [186] C. E. Repeke *et al.*, "Evidences of the cooperative role of the chemokines CCL3, CCL4 and

- CCL5 and its receptors CCR1+ and CCR5+ in RANKL+ cell migration throughout experimental periodontitis in mice.,” *Bone*, vol. 46, no. 4, pp. 1122–30, Apr. 2010.
- [187] O. A. Gonzalez *et al.*, “Differential Gene Expression Profiles Reflecting Macrophage Polarization in Aging and Periodontitis Gingival Tissues.,” *Immunol. Invest.*, vol. 44, no. 7, pp. 643–64, 2015.
- [188] S. H. P. Oliveira *et al.*, “Aliskiren Attenuates the Inflammatory Response and Wound Healing Process in Diabetic Mice With Periodontal Disease.,” *Front. Pharmacol.*, vol. 10, p. 708, Jul. 2019.
- [189] S. W. Cox, B. M. Eley, M. Kiili, A. Asikainen, T. Tervahartiala, and T. Sorsa, “Collagen degradation by interleukin-1beta-stimulated gingival fibroblasts is accompanied by release and activation of multiple matrix metalloproteinases and cysteine proteinases.,” *Oral Dis.*, vol. 12, no. 1, pp. 34–40, Jan. 2006.
- [190] L. Hou *et al.*, “The protease cathepsin L regulates Th17 cell differentiation.,” *J. Autoimmun.*, vol. 65, pp. 56–63, Dec. 2015.
- [191] N. Dutzan, J. E. Konkel, T. Greenwell-Wild, and N. M. Moutsopoulos, “Characterization of the human immune cell network at the gingival barrier,” *Mucosal Immunol.*, vol. 9, no. 5, pp. 1163–1172, Sep. 2016.
- [192] M. C. Petralia *et al.*, “Effects of Treatment with the Hypomethylating Agent 5-aza-2’-deoxycytidine in Murine Type II Collagen-Induced Arthritis.,” *Pharmaceuticals (Basel)*, vol. 12, no. 4, Nov. 2019.
- [193] Z. Feng, M. Zhan, R. Meng, X. Wang, and Q. Xu, “5-Aza-2’-deoxycytidine enhances lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokine expression in human dental pulp cells by regulating TRAF6 methylation.,” *Bioengineered*, vol. 10, no. 1, pp. 197–206, Dec. 2019.
- [194] X.-L. Wu *et al.*, “Methylation status of ORMDL3 regulates cytokine production and p-ERK/MMP9 pathway expression.,” *Exp. Cell Res.*, vol. 372, no. 1, pp. 43–51, Nov. 2018.
- [195] Í. Salviano Soares de Amorim *et al.*, “5-Aza-2’-deoxycytidine induces a greater inflammatory change, at the molecular levels, in normoxic than hypoxic tumor microenvironment.,” *Mol. Biol. Rep.*, vol. 48, no. 2, pp. 1161–1169, Feb. 2021.
- [196] S. Atkuru, G. Muniraj, T. Sudhaharan, K.-H. Chiam, G. D. Wright, and G. Sriram, “Cellular ageing of oral fibroblasts differentially modulates extracellular matrix organization.,” *J. Periodontal Res.*, vol. 56, no. 1, pp. 108–120, Jan. 2021.
- [197] J. Páez *et al.*, “Uncoupled inflammatory, proliferative, and cytoskeletal responses in senescent human gingival fibroblasts.,” *J. Periodontal Res.*, vol. 55, no. 3, pp. 432–440, Jun. 2020.
- [198] K. I. Onyedibe, S. Elmanfi, U. K. Aryal, E. Könönen, U. K. Gürsoy, and H. O. Sintim, “Global proteomics of fibroblast cells treated with bacterial cyclic dinucleotides, c-di-GMP and c-di-AMP.,” *J. Oral Microbiol.*, vol. 14, no. 1, p. 2003617, 2022.
- [199] Y.-G. Kim *et al.*, “Transcriptome sequencing of gingival biopsies from chronic periodontitis patients reveals novel gene expression and splicing patterns.,” *Hum. Genomics*, vol. 10, no. 1, p. 28, Aug. 2016.
- [200] H. Nan *et al.*, “Epigenetically associated CCL20 upregulation correlates with esophageal cancer progression and immune disorder.,” *Pathol. Res. Pract.*, vol. 228, p. 153683, Dec. 2021.
- [201] W. Zhang *et al.*, “Effector CD4+ T cell expression signatures and immune-mediated disease associated genes.,” *PLoS One*, vol. 7, no. 6, p. e38510, 2012.
- [202] F. Gao *et al.*, “Global analysis of DNA methylation in hepatocellular carcinoma by a liquid hybridization capture-based bisulfite sequencing approach.,” *Clin. Epigenetics*, vol. 7, no. 1, p.

86, 2015.

- [203] D. K. Krishnadas, L. Bao, F. Bai, S. C. Chencheri, and K. Lucas, "Decitabine facilitates immune recognition of sarcoma cells by upregulating CT antigens, MHC molecules, and ICAM-1," *Tumour Biol.*, vol. 35, no. 6, pp. 5753–62, Jun. 2014.
- [204] H. I. Roach *et al.*, "Association between the abnormal expression of matrix-degrading enzymes by human osteoarthritic chondrocytes and demethylation of specific CpG sites in the promoter regions.," *Arthritis Rheum.*, vol. 52, no. 10, pp. 3110–24, Oct. 2005.
- [205] M. Poplineau *et al.*, "The DNA hypomethylating agent, 5-aza-2'-deoxycytidine, enhances tumor cell invasion through a transcription-dependent modulation of MMP-1 expression in human fibrosarcoma cells.," *Mol. Carcinog.*, vol. 54, no. 1, pp. 24–34, Jan. 2015.
- [206] M. Wolf and B. Moser, "Antimicrobial activities of chemokines: not just a side-effect?," *Front. Immunol.*, vol. 3, p. 213, 2012.
- [207] E. A. V. Moelants *et al.*, "Citruination and proteolytic processing of chemokines by *Porphyromonas gingivalis*.," *Infect. Immun.*, vol. 82, no. 6, pp. 2511–9, Jun. 2014.
- [208] N. Dutzan and L. Abusleme, "T Helper 17 Cells as Pathogenic Drivers of Periodontitis.," *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 1197, pp. 107–117, 2019.
- [209] N. Scheres, T. J. de Vries, J. Brunner, W. Crielaard, M. L. Laine, and V. Everts, "Diverse effects of *Porphyromonas gingivalis* on human osteoclast formation," *Microb. Pathog.*, vol. 51, no. 3, pp. 149–155, 2011.
- [210] T. Crowley *et al.*, "Priming in response to pro-inflammatory cytokines is a feature of adult synovial but not dermal fibroblasts.," *Arthritis Res. Ther.*, vol. 19, no. 1, p. 35, Feb. 2017.
- [211] S. L. Foster and R. Medzhitov, "Gene-specific control of the TLR-induced inflammatory response.," *Clin. Immunol.*, vol. 130, no. 1, pp. 7–15, Jan. 2009.
- [212] M. Tamura, M. Tokuda, S. Nagaoka, and H. Takada, "Lipopolysaccharides of *Bacteroides intermedius* (*Prevotella intermedia*) and *Bacteroides* (*Porphyromonas*) *gingivalis* induce interleukin-8 gene expression in human gingival fibroblast cultures.," *Infect. Immun.*, vol. 60, no. 11, pp. 4932–7, Nov. 1992.
- [213] T. Ara *et al.*, "Human gingival fibroblasts are critical in sustaining inflammation in periodontal disease.," *J. Periodontol. Res.*, vol. 44, no. 1, pp. 21–27, 2009.
- [214] G. H. Apolinário Vieira *et al.*, "Specific inhibition of IL-6 receptor attenuates inflammatory bone loss in experimental periodontitis.," *J. Periodontol.*, vol. 92, no. 10, pp. 1460–1469, Oct. 2021.
- [215] N. Scheres and W. Crielaard, "Gingival fibroblast responsiveness is differentially affected by *Porphyromonas gingivalis*: Implications for the pathogenesis of periodontitis," *Mol. Oral Microbiol.*, vol. 28, no. 3, pp. 204–218, 2013.
- [216] K. Klein *et al.*, "The epigenetic architecture at gene promoters determines cell type-specific LPS tolerance.," *J. Autoimmun.*, vol. 83, pp. 122–133, Sep. 2017.
- [217] C. Sohn, A. Lee, Y. Qiao, K. Loupasakis, L. B. Ivashkiv, and G. D. Kalliolias, "Prolonged tumor necrosis factor α primes fibroblast-like synoviocytes in a gene-specific manner by altering chromatin.," *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, N.J.)*, vol. 67, no. 1, pp. 86–95, Jan. 2015.
- [218] A. E. A. Surace and C. M. Hedrich, "The Role of Epigenetics in Autoimmune/Inflammatory Disease.," *Front. Immunol.*, vol. 10, p. 1525, 2019.
- [219] W. Qin, B. P. Scicluna, and T. van der Poll, "The Role of Host Cell DNA Methylation in the Immune Response to Bacterial Infection.," *Front. Immunol.*, vol. 12, p. 696280, 2021.

- [220] M. H. McGuire *et al.*, “Pan-cancer genomic analysis links 3’UTR DNA methylation with increased gene expression in T cells.,” *EBioMedicine*, vol. 43, pp. 127–137, May 2019.
- [221] T. Liu, L. Zhang, D. Joo, and S.-C. Sun, “NF- κ B signaling in inflammation.,” *Signal Transduct. Target. Ther.*, vol. 2, pp. 17023-, 2017.
- [222] U. Godlewska *et al.*, “Antimicrobial and Attractant Roles for Chemerin in the Oral Cavity during Inflammatory Gum Disease.,” *Front. Immunol.*, vol. 8, p. 353, 2017.