

## 1. Cel naukowy projektu

Podstawowym celem naukowym projektu jest poznanie funkcji biologicznej białka opieku czego ClpB patogennej bakterii *Leptospira interrogans*, odpowiedzialnej za wywoływanie gro nej dla ludzi i zwierz t choroby zwanej leptospiroz . Cel naukowy projektu obejmuje przede wszystkim okre lenie biochemicznych wła ciwo ci białka ClpB *L. interrogans* (ClpB<sub>Li</sub>) oraz poznanie jego specyficznej roli w prze ywalno ci patogennych bakterii w warunkach stresu rodowiskowego i podczas infekcji gospodarza. Zamierzamy udowodni , e specyficzna rola ClpB podczas infekcji powi zana jest z jego funkcj białka opieku czego a wobec tego zaanga owaniem ClpB w procesy dezagregacji i reaktywacji agregatów białkowych.

## 2. Badania podstawowe realizowane w ramach projektu

Aby wykaza udział białka ClpB<sub>Li</sub> w infekcjach wywoływanych przez patogenne gatunki *Leptospira* zamierzamy zbada , czy poziom ekspresji genu *clpB<sub>Li</sub>* w tkankach nerek jest podwy szony podczas infekcji zwierz t laboratoryjnych, oraz czy ClpB<sub>Li</sub> mo e aktywowa system odporno ciowy gospodarza. Znaczn cz projektu dotyczy biochemicznej charakterystyki ClpB<sub>Li</sub>. Wiadomo, e wła ciwo ci biochemiczne, struktura białka okre laj jego funkcj w komórce. Wła ciwo ci biochemiczne ClpB<sub>Li</sub> porównamy z wła ciwo ciami najlepiej poznanego do tej pory modelowego białka ClpB bakterii *Escherichia coli* oraz białka ClpB z saprofitycznego gatunku *Leptospira*, a mianowicie *L. biflexa*. Porównanie wła ciwo ci białek ClpB pochodz ych z ró nych gatunków bakterii wydaje si szczególnie interesuj cym aspektem naszych bada , poniewa mo e ujawni przyczyn wirulentnych wła ciwo ci ClpB<sub>Li</sub>. Ponadto planujemy zidentyfikowa białka *Leptospira* oddziału ce z ClpB<sub>Li</sub>. Identyfikacja białek *Leptospira* oddziału cych z ClpB<sub>Li</sub>, zwłazcza tych, które s niezbdne do prze ycia i namna ania si patogenu wewn trz komórek gospodarza powinna przyczyni si do poznania podstawowego mechanizmu działania ClpB jako czynnika wirulencji czy te białka zwi zanego z wirulencj *L. interrogans*. Oczekujemy, e na podstawie uzyskanych wyników b dzie mo na oceni , czy funkcja ClpB jest rzeczywi cie niezbdna aby patogen przystosował si do wewn trzkomórkowych warunków podczas infekcji gospodarza i wywołał objawy choroby czyli przeciwstawił si mechanizmom obronnym gospodarza..

## 3. Zasadno podj tych bada naukowych

W ci gu ostatnich kilku lat zgromadzono wiele dowodów wiadczy cych o udziale białka opieku czego ClpB w patogenezie niektórych chorób bakteryjnych, w tym leptospirozy (Kannan i wsp., 2008; Capestany i wsp., 2008; Chastanet i wsp., 2004; Meibom i wsp., 2008; Lourdault i wsp., 2011). Wykazano, e brak funkcjonalnego białka ClpB w komórkach *L. interrogans* jest przyczyn zahamowania wzrostu bakterii w warunkach stresu i całkowitej utraty ich wirulencji (Lourdault i wsp., 2011). Wła nie te obserwacje stanowi podstaw naszych zało e i bada naukowych. Rola stresu, odpowiedzi stresowej w oddziaływaniach gospodarz-patogen oraz udział w niej ClpB wyłaniaj nowy kierunek bada nad molekularnymi mechanizmami leptospirozy. *Leptospira* jest uwa ana za najbardziej rozpowszechnion na naszym globie bakteryjn chorob odzwierc (zoonoz ). Głównym ró dlem zaka enia s chore zwierz ta (tak e nosiciele), które wydalaj z moczem leptospiry. W krajach klimatu umiarkowanego, takich jak Polska, tak e rodowisko (zanieczyszczona leptospirami woda i gleba) mo e w szczerzeniu si zaka e , stanowi c jak najbardziej aktualny czynnik ryzyka w epidemiologii leptospirozy. Ka dego roku na całym wiecie odnotowuje si ponad milion przypadków ci kiej postaci leptospirozy ze wska nikiem miertelno ci od 5% do 20% (Adler i wsp., 2011). *Leptospira* zwierz t stanowi wci powa ny problem tak e w krajach UE, w tym w Polsce. Ka dego roku odnotowuje si ogromne straty ekonomiczne z powodu zaburze rozrodczo ci u bydła, owiec, wi i koni. Przebieg choroby u tych gatunków zwierz t ma zazwyczaj charakter utajony, chroniczny i jednym objawem mog by zaburzenia w rozrodzie oraz stany zapalne gałki ocznej u koni, co generuje ogromne straty ekonomiczne. Wiele bada serologicznych i mikrobiologicznych wskazuje na wysoki odsetek zaka e u zwierz t domowych (Ryan i wsp., 2012; Arent i K dzierska-Mieszkowska, 2013). Pomimo zagro e , jakie stwarzaj patogenne gatunki *Leptospira* i ich globalnego zasi gu, molekularny mechanizm patogenezy leptospirozy nie jest znany. Identyfikacja czynników wirulencji *Leptospira*, poznanie ich wła ciwo ci ma kluczowe znaczenie dla poznania mechanizmów indukcji choroby. ClpB jest wymieniany w ród potencjalnych czynników wirulencji *Leptospira*. W wietle powy szych danych, zasadny wydaje si cel niniejszego projektu, czyli zbadanie specyficznej roli oraz molekularnego mechanizmu funkcjonowania białka ClpB z bakterii *L. interrogans*.

Oczekujemy, e informacje uzyskane podczas realizacji tego projektu przyczyni si do lepszego zrozumienia roli ClpB w odpowiedzi stresowej bakterii *L. interrogans* oraz w wirulencji *Leptospira*. Uwzgl dniaj c fakt, e gen *clpB* nie wystpuje w komórkach ssacych, jego produkt, białko ClpB, mo e by wykorzystane w przyszło ci jako nowy cel terapeutyczny w leczeniu zaka e wywoływanych przez patogenne bakterie *Leptospira* spp. Leczenie leptospirozy zakłócaj ce funkcj genu *clpB* wyznacza nowy kierunek terapii anty-bakteryjnych, by mo e, bardziej skutecznych ni obecnie stosowane antybiotyki. Wyniki naszych bada mog równie przyczyni si do poznania ró nic w odpowiedzi serologicznej u zwierz t szczepionych i naturalnie zaka onych, co mo e mie du e znaczenie praktyczne w diagnostyce zaka e tymi bakteriami u zwierz t. Planowane badania przyczyni si tak e do uzupełnienia i wzbogacenia naszej wiedzy na temat biologicznej funkcji białek opieku czych w bakteriach patogennych, ich roli podczas infekcji gospodarza.

## 4. Literatura

- B. Adler**, M. Lo, T. Seemann, G.L. Murray (2011) Pathogenesis of leptospirosis: the influence of genomics. *Vet. Microbiol.* 153: 73-81.
- Z. Arent**, S. Kedzierska-Mieszkowska (2013) Seroprevalence study of leptospirosis in horses in northern Poland. *Vet. Rec.* 172: 269.
- C.A. Capestany**, G.D. Tribble, K. Maeda, D.R. Demuth, and R.J. Lamont (2008) Role of the Clp system in stress tolerance, biofilm formation, and intracellular invasion in *Porphyromonas gingivalis*. *J. Bacteriol.* 190: 1436-1446.
- A. Chastanet**, I. Derre, S. Nair, and T. Msadek (2004) *clpB*, a novel member of the *Listeria monocytogenes* CtsR regulon, is involved in virulence but not in general stress tolerance. *J. Bacteriol.* 186: 1165-1174.
- T.R. Kannan**, O. Musatovova, P. Gowda, and J.B. Baseman (2008) Characterization of a unique ClpB protein of *Mycoplasma pneumoniae* and its impact on growth. *Infect. Immun.* 76: 5082-5092
- K.L. Meibom**, et al. (2008) The heat-shock protein ClpB of *Francisella tularensis* is involved in stress tolerance and is required for multiplication in target organs of infected mice. *Mol. Microbiol.* 67: 1384-1401.

**K. Lourdault**, G.M. Cerqueira, E.A. Wunder Jr., and M. Picardeau (2011) Inactivation of *clpB* in the pathogen *Leptospira interrogans* reduces virulence and resistance to stress conditions. *Infect. Immun.* 79: 3711-3717.

**E.G. Ryan**, L. Nola, L. O'Grady, S.J. More and M.L. Doherty (2012) Seroprevalence of *Leptospira Hardjo* in the Irish suckler cattle population. *Ir. Vet. J.* 65: 8.