

Porphyromonas gingivalis (*Pg*) jest odpowiedzialny za rozwój paradontozy. Patogen ten zasiedla powierzchnię zębów poniżej linii dziąseł i z czasem prowadzi do przewlekłych stanów zapalnych przyzębia (ang. *chronic periodontitis*, CPD) - tkanek otaczających i unieruchamiających zęby. Co gorsze, coraz więcej badań wskazuje na silne powiązanie CPD z zagrażającymi życiu chorobami cywilizacyjnymi, takimi jak choroby sercowo-naczyniowe, w tym miażdżyca. Niewiele jednak wiadomo o podłożu przyczynowo-skutkowym tego patologicznego powiązania. Istotne wydaje się przedostawanie się bakterii się z jamy ustnej do krwioobiegu, migracji przez naczynia krwionośne i zasiedlanie odległych tkanek. Z drugiej strony, zapaleniu dziąseł często towarzyszy napływ komórek żernych, w tym makrofagów, komórek stanowiących pierwszą linię obrony gospodarza przed patogenami. Coraz więcej dowodów wskazuje na to, że *Pg* jest odporny na bakteriobójczą aktywność makrofagów, przeżywa fagocytozę i może następnie rozprzestrzeniać się w organizmie przenoszony przez makrofagi, np. z zakażonej tkanki przyzębia, do węzłów limfatycznych.

Chorobotwórczość *Pg* wynika z ich zdolności do produkcji wielu tzw. czynników wirulencji, czyli substancji, które nie tylko umożliwiają tym mikroorganizmom zdobywanie niezbędnych substancji odżywczych, ale także chronią je przed układem obronnym organizmu gospodarza. Do najważniejszych czynników wirulencji *Pg* należą proteazy (enzymy rozkładające białka) zwane gingipainami. Enzymy te wydzielane są poprzez unikatowy, zbudowany z wielu białek system sekrecji typu IX (T9SS). Ponieważ część białkowych składników T9SS występuje na powierzchni bakterii, jest możliwe, że nie tylko biorą one udział w wydzielaniu białek bakteryjnych, ale również pełnią dodatkowe funkcje w oddziaływaniu z komórkami gospodarza. Jednak ich rola w tym procesie nie jest poznana.

W pracy doktorskiej zajmuje się badaniem wpływu *Pg* na choroby systemowe poprzez analizę roli składników T9SS w patologicznym oddziaływaniu bakterii z komórkami śródbłonka naczyń krwionośnych oraz komórkami żernymi gospodarza. W badaniach wykorzystuję zarówno organizmy modelowe (**badania *in vivo***), jak i modele komórkowe (**badania *in vitro***).

Badania *in vivo* zostaną wykonane na modelu danio przegowanego (*Danio rerio*) zaadoptowanym przeze mnie w ramach współpracy z University of Sheffield do badania wirulencji *Pg*. Najczęściej stosowanymi organizmami do badania infekcji *Pg* są gryzonie, jednak jak każdy model zwierzęcy również i ten ma swoje istotne ograniczenia. Z tego względu, coraz częściej do badań oddziaływania między patogenami, a gospodarzem wykorzystuje się niższe kręgowce. *D. rerio* jest z powodzeniem stosowany do obrazowania rozwoju wielu ludzkich chorób infekcyjnych. Wykorzystanie całkowicie przezroczystych embrionów tego zwierzęcia umożliwia śledzenie procesu infekcji w czasie rzeczywistym stosując do tego celu nowoczesną mikroskopię trójwymiarową. W dotychczasowej pracy wykazałam na modelu *D. rerio*, że różne szczepy *Pg* mogą być mniej lub bardziej chorobotwórcze, a wirulencja zależy od ekspresji gingipain. Potwierdziłam w ten sposób wyniki uzyskane na modelach zwierzęcych i udowadniałam, że model *D. rerio* jest tak samo dobry do badania patogenności *Pg* jak gryzonie. W dodatku *D. rerio* jest podatny na manipulację genetyczną, dzięki czemu możliwe jest uzyskiwanie szczepów z fluorescencyjnie wyznakowanymi strukturami lub określonymi komórkami (tzw. linie transgeniczne). Wykorzystując właśnie takie embriony *D. rerio* z wyznakowanym układem krwionośnym, pokazałam w czasie rzeczywistym zdolność *Pg* do przekraczania bariery naczyń krwionośnych i powodowania uszkodzenia serca. Wyniki tych pionierskich doświadczeń potwierdziły bardzo duży potencjał modelu do badania chorób systemowych powodowanych przez *Pg*. W planowanych badaniach ten model posłuży mi do zbadania, w jaki sposób dochodzi do rozprzestrzeniania się bakterii. Przetestuję zdolność *Pg* do zaburzenia ciągłości bariery naczyń krwionośnych poprzez degradację białek adhezyjnych, które zapewniają ścisły kontakt między komórkami endotelium. Przebadam także oddziaływanie *Pg* z komórkami żernymi. Szczegółowej analizie poddana będzie potencjalna rola powierzchniowych białek T9SS w adhezji oraz fagocytozie *Pg* przez komórki żerne. Badania te zostaną wykonane przy użyciu szczepów bakterii pozbawionych określonych składników T9SS na drodze ukierunkowanej mutagenyzy.

W badaniach *in vitro* obserwacje poczynione na modelu *D. rerio* zostaną zweryfikowane na ludzkich komórkach endotelialnych. Dotyczyć to będzie sposobów rozprzestrzeniania się bakterii, czyli w przypadku endotelium, z komórki do komórki, lub migracji *Pg* przez rozluźnione przestrzenie między komórkami (degradacja białek adhezyjnych). Obecnie prowadzone są też eksperymenty na ludzkich i mysich makrofagach. W ten sposób dowiemy się, jaki jest udział składników T9SS w zdolności bakterii do oddziaływania z komórkami żernymi, inwazji tych komórek oraz przeżycia wewnątrzkomórkowego. Podsumowując, w pracy doktorskiej wykorzystany będzie po raz pierwszy innowacyjny model *in vivo* *D. rerio* do obrazowania infekcji *Pg* w czasie rzeczywistym. Dzięki temu uzyskane zostaną wyniki, które rzucają nowe światło na mechanizmy patogenyzy *Pg*, które są odpowiedzialne za rozwój lub nasilenie chorób systemowych powiązanych z paradontozą.