

Polimorfizm G231N, E232T, N235D genu deiminazy peptydyloargininowej *P. gingivalis*: nowy czynnik wirulencji i rokowania zapalenia przyzębia

Główny cel niniejszego projektu dotyczy zbadania wpływu nowo wykrytego polimorfizmu w genie deiminazy peptydyloargininowej produkowanej przez *Porphyromonas gingivalis* na zaawansowanie zmian patogenetycznych w chorobie zapalnej przyzębia.

Część kliniczna projektu będzie obejmować badania periodontologiczne pacjentów z zapaleniem przyzębia i zdrowych dawców oraz zbiorów próbek płynu z kieszonek dziąsłowych, płytki poddziąsłowej i osocza/surowicy krwi. Próbkę posłużą do wyhodowania szczepów klinicznych *P. gingivalis* oraz wykonania badań molekularnych i biochemicznych. Oznaczane będzie stężenie i aktywność deiminazy peptydyloargininowej, stężenie składowych szlaku zależnego od prostaglandyny E2 i markerów resorpcji kostnej oraz poziom przeciwciał anti-*P. gingivalis*. Analizy metabolomiczne w próbkach pacjentów posłużą do detekcji wskaźników degradacji białka, re-kolonizacji kieszonek periopatogenami i wskaźników progresji choroby.

Część doświadczalna obejmie genotypowanie szczepów *P. gingivalis* wyhodowanych z próbek pacjentów, sekwencjonowanie genu deiminazy peptydyloargininowej, przygotowanie mutantu *P. gingivalis* z nowym polimorfizmem i oczyszczanie białka deiminazy peptydyloargininowej z mutantu. Następnie zostaną przeprowadzone testy wirulencji mutantu z nowym polimorfizmem przy użyciu pierwotnych fibroblastów i keratynocytów dziąsła, organotypowego modelu 3D dziąsła, makrofagów pochodnych monocytów krwi, osteoblastów, ko-kultur komórek dziąsła z komórkami odpowiedzi zapalnej oraz ko-kultur osteoblastów z osteoklastami. W testach wirulencji będzie oceniana adhezja i inwazja, efekt immunomodulacyjny i pro-resorpcyjny mutantu *P. gingivalis*. Wielokierunkowe analizy na różnych typach komórek pozwolą na uzyskanie obiektywnych i rzetelnych wyników, które posłużą do selekcji reprezentatywnych szczepów klinicznych z polimorfizmem i szczepów bez polimorfizmu do dalszych badań molekularnych i biochemicznych, mających wyjaśnić mechanizm patogenności *P. gingivalis* z nowym polimorfizmem w genie deiminazy peptydyloargininowej. W tym celu będzie badana ekspresja i aktywność deiminazy peptydyloargininowej szczepów klinicznych *P. gingivalis* i mutantu z polimorfizmem, aktywność enzymu oczyszczonego z mutantu z polimorfizmem oraz zostanie wykonana analiza cytrulinomu *P. gingivalis*. Parametry kliniczne oceniające stan przyzębia będą korelowane ze stężeniem i aktywnością bakteryjnej deiminazy peptydyloargininowej, wynikami analizy składowych szlaku prostaglandyny E2 i resorpcji kostnej, poziomem przeciwciał anti-*P. gingivalis* oraz wynikami analizy metabolomicznej w próbkach płynu z kieszonek dziąsłowych, płytki poddziąsłowej i osocza/surowicy krwi, odpowiednio w obrębie grupy pacjentów zawierających *P. gingivalis* z polimorfizmem i w grupie bez polimorfizmu, a następnie wyniki będą porównane pomiędzy tymi grupami. Analizy te wyjaśnią czy szczepy z polimorfizmem odpowiadają za zaawansowanie zmian patogenetycznych w chorobie zapalnej przyzębia.

Jak dotąd nie zbadano roli polimorfizmów genu deiminazy peptydyloargininowej z *P. gingivalis* w patogenezie zapalenia przyzębia, zatem zagadnienie to wydaje się ciekawe i nowatorskie. Potwierdzenie naszych wstępnych obserwacji badaniami z licznej grupy chorych niewątpliwie wpłynie na rozwój badań związanych z polimorfizmem genów, również innych czynników wirulencji *P. gingivalis*, tak więc realizacja niniejszego projektu będzie miała wpływ na rozwój periodontologii. Biorąc pod uwagę, iż choroba ta powiązana jest z niektórymi chorobami ogólnoustrojowymi, jak np. reumatoidalne zapalenie stawów, wyniki naszych badań mogą mieć wpływ na rozwój badań dotyczących polimorfizmów genów w reumatologii. Ostatecznie, potwierdzenie obserwacji z badań wstępnych będzie stanowiło podstawy do skonstruowania specyficznego inhibitora deiminazy peptydyloargininowej, który po przejściu odpowiednich faz testowych zostanie wprowadzony na rynek jako nowoczesny lek w terapii zapalenia przyzębia.