

Peptydazy (proteazy) są enzymami hydrolizującymi wiązania peptydowe. Geny kodujące proteazy stanowią około 3% wszystkich genów bakterii. Wiele proteaz bakteryjnych jest postrzeganych jako czynniki wirulencji bakterii, ponieważ enzymy te są odpowiedzialne m.in. za degradację białkowych składników zainfekowanych tkanek, ułatwianie kolonizacji organizmu gospodarza i rozprzestrzenianie bakterii w obrębie zainfekowanego organizmu, a także ochronę patogenu przed odpowiedzią układu immunologicznego. Przykładem choroby, w etiologii której kluczową rolę pełni proteazy jest parodontoza, chroniczna infekcyjna choroba prowadząca do uszkodzenia dziąseł i tkanek podporowych zębów. Parodontoza, w swojej ciężkiej postaci, dotyka nawet 15% populacji dorosłych, a nieleczona prowadzi nawet do utraty zębów. Ponadto, ze względu na swój infekcyjny oraz zapalny charakter, parodontoza przyczynia się do powstawania i/lub rozwoju innych schorzeń, takich jak: reumatoidalne zapalenie stawów, osteoporoza, choroby serca, cukrzyca czy też choroby neurodegeneracyjne. Ze względu na fakt, że przyczyny powstawania i rozwoju parodontozy są złożone, nie jest możliwe wskazanie jednego patogenu odpowiedzialnego za powstawanie i rozwój tej choroby. Jednakże trzy gatunki bakterii uznawane są za główne periodontopatogeny: *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* i *Tannerella forsythia*, tworzące tzw. „czerwony kompleks” bakterii. Głównym czynnikiem wirulencji tych bakterii są zewnątrzkomórkowe proteazy. Oprócz opisanych do tej pory proteaz, w zsekwencjonowanych genomach przedstawicieli „czerwonego kompleksu” obecnych jest wiele genów kodujących domniemane, często wydzielnicze proteazy, które prawdopodobnie posiadają wyjątkowe właściwości. Przykładem takich proteaz są dwa białka *T. forsythia*: *TfPepO* (*BFO_0011*), podobna do ludzkiej konwertazy endoteliny, której homologi u innych gatunków bakteryjnych są zaangażowane w inwazję komórek ssaków, oraz *TfIgAse* (*BFO_2042*), metaloproteaza należąca do rodziny M64 proteaz IgA, posiadających zdolność do hydrolizy immunoglobulin A (IgA) obu podklas. W związku z tym, nadrzędnym celem proponowanego projektu jest nie tylko biochemiczna i strukturalna charakterystyka dwóch nowych proteaz *T. forsythia*, lecz także opisanie ich potencjalnej roli w wirulencji tego ludzkiego patogenu.

W pierwszej części projektu, proteazy *TfIgAse* i *TfPepO* zostaną otrzymane i oczyszczone jako rekombinowane białka. Następnie, aktywność obu proteaz zostanie szczegółowo scharakteryzowana. W skrócie, określimy ich specyficzność substratową oraz sprawdzimy efekt fizycznych i chemicznych czynników, zwłaszcza jonów dwudodatnich oraz inhibitorów, na ich aktywność enzymatyczną. Następnie, sprawdzimy zdolność proteaz do cięcia ważnych z punktu widzenia fizjologicznego substratów, których degradacja może prowadzić do zaburzenia homeostazy w jamie ustnej człowieka. W kolejnym kroku zostaną przeprowadzone analizy krystalograficzne proteaz *TfIgAse* i *TfPepO* oraz proteazy, *PgPepO*, z innego przedstawiciela „czerwonego kompleksu”, *P. gingivalis*. W skrócie, zostaną otrzymane kryształy badanych proteaz a następnie struktura krystaliczna zostanie rozwiązana na podstawie rezultatów z dyfrakcji promieniowania X przez kryształy. Rozwiązanie struktury tych enzymów może przyczynić się do opisanie nowych struktur proteaz bakteryjnych. W ostatniej części projektu, sprawdzimy czy badane proteazy zaangażowane są w unikanie odpowiedzi ze strony wrodzonego układu odporności człowieka i inwazję jego komórek. W tym celu, określimy poziom ekspresji oraz lokalizację komórkową obu proteaz. Otrzymamy także mutanty delecyjne badanych proteaz, które zostaną użyte jako negatywne kontrole w każdym eksperymencie. Na koniec, sprawdzimy również zdolność *TfIgAse* do hydrolizy różnych form IgA, a także wpływ *TfPepO* na inwazję komórek gospodarza przez bakterie *T. forsythia*. W rezultacie chcemy opisać domniemaną rolę *TfIgAse* i *TfPepO* w wirulencji *T. forsythia*.

Rezultatem tego projektu będzie nie tylko biochemiczna i strukturalna charakterystyka nowych proteaz *T. forsythia*, lecz także wyjaśnienie domniemanej roli tych enzymów w wirulencji tego patogenu. Warto wspomnieć, że tylko kilka proteaz z *T. forsythia* zostało opisanych do dnia dzisiejszego i obecny stan wiedzy o systemie proteolitycznym tego patogenu jest wciąż niewystarczający. Realizacja celów zawartych w projekcie przyczyni się do poszerzenia stanu wiedzy w dziedzinach nauki takich jak: biochemia, biologia strukturalna oraz patogenność drobnoustrojów.