

*Porphyromonas gingivalis*, jest czarno pigmentowaną (dzięki akumulacji hemu), Gram-ujemną, beztlenową bakterią, która odgrywa kluczową rolę w inicjacji i postępie chronicznego zapalenia tkanek utrzymujących ząb w zębodole (tzw. periodontium). Jak przystało na bakterię patogenną, *P. gingivalis* jest uzbrojona w szereg czynników wirulencji, które są odpowiedzialne za skorumpowanie immunologicznego systemu obrony gospodarza przed infekcją. Dzięki temu kolonizacja powierzchni zęba poniżej linii dziąseł przez *P. gingivalis* generuje środowisko sprzyjające wzrostowi innych bakterii, które zamieniają się w patogeny pod złym wpływem *P. gingivalis*. Żeby osiągnąć ten swój cel *P. gingivalis* musi wyczuwać zmiany w środowisku i odpowiednio na nie reagować. W tym celu podobnie jak inne bakterie wykorzystuje dwuskładnikowe systemy regulacji (TCS) (ang. *two component systems*) składające się z białka receptorowego, ulokowanego w błonie komórkowej z domeną kinazy histydynowej (HK) (ang. *histidine kinase*) po stronie cytoplazmy oraz białka cytoplazmatycznego pełniącego funkcję regulatora odpowiedzi (RR) (ang. *response regulator*). Pod wpływem rozpoznanego sygnału HK ulega autofosforylacji na reszcie His, z której następnie grupa fosforanowa zostaje przeniesiona na konserwatywną resztę Asp w RR. Pod wpływem fosforylacji RR ulega dimeryzacji i z reguły wiąże się z DNA wpływając na ekspresję określonych genów. Celem naszego projektu jest funkcjonalna i strukturalna charakterystyka TCS *P. gingivalis* zwanego PorXY. Ten TCS w nieznanym jeszcze dokładnie sposobie reguluje potranslacyjne modyfikacje i sekrecję białek, a wśród nich niemalże wszystkich białkowych czynników wirulencji *P. gingivalis*, transportowanych na powierzchnię bakterii przez typ IX sekrecji białek (T9SS) (ang. *Type IX Secretion System*). Pod wieloma względami PorXY jest wyjątkowy wśród bakteryjnych TCS. Podczas gdy PorY wydaje się być kanoniczną HK, PorX wykazuje szereg unikatowych cech odróżniających go od poznanych dotychczas RR. PorX nie posiada regionu wiążącego DNA i zamiast regulować bezpośrednio ekspresję genów, oddziałuje z SigP – czynnikiem sigma o zewnątrzkomórkowej funkcji (ang. *extracytoplasmic function sigma factor*, ECF), który wiąże się do rejonów promotorowych genów T9SS. PorX oddziałuje również z jednym ze strukturalnych elementów T9SS, a mianowicie PorL, ale funkcja tego oddziaływania nie jest znana. C-terminalna domena PorX została zaliczona do alkalicznych fosfataz z rodziny PglZ. Jednakże, w naszych wstępnych badaniach wykazaliśmy jednoznacznie, że PorX nie posiada aktywności fosfatazowej, wykazuje natomiast aktywność fosfodiesterazową i degradowuje 5'-fosfoguaninylo-(3',5')-guanozynę (pGpG), jeden z najmniej poznanych nukleotydów sygnałowych wykorzystywanych przez bakterie. Delecja genu *porX* objawia się brakiem czarnej pigmentacji kolonii *P. gingivalis* co jest wynikiem zaburzonej akumulacji hemu wywołanej obniżoną sekrecją przez T9SS proteaz degradowujących hemoglobinę (gingipainy) oraz białek wiążących/transportujących hem. Będąc już w posiadaniu dyfraktujących kryształów PorX niedługo poznamy przestrzenną strukturę atomową tego białka kluczowego w regulacji T9SS. Oczyszciliśmy już również wszystkie białka pomocnicze PorX (SigP, PorL, PorY) w ilościach i o jakości niezbędnej do badań strukturalno-funkcjonalnych.

Na podstawie tych wstępnych wyników nasz plan badawczy w tym projekcie ma na celu: (i) określenie specyficzności substratowej PorX; (ii) poznanie mechanizmu katalitycznego odpowiedzialnego za aktywność PorX oraz kluczowych reszt niezbędnych dla tej aktywności; (iii) zbadanie roli PorX w regulacji działania T9SS; (iv) zbadanie wpływu fosforylacji PorX na aktywność fosfodiesterazową oraz na oddziaływanie z białkami pomocniczymi; (v) identyfikację białek cytoplazmatycznych oddziałujących PorX; (vi) rozwiązanie struktury PorX oraz kompleksów tego białka z SigP, PorL i PorY. Wyniki tych badań rzucą nowe światło na mechanizmy regulujące wirulencję *P. gingivalis*. Uzyskana wiedza może w przyszłości pozwolić na rozwój nowej, skuteczniejszej metody leczenia i/lub zapobiegania paradontozie i chorobom systemowym z nią związanym.