

**1. Cel badań:** Geny kodujące proteazy, enzymy hydrolizujące wiązanie peptydowe, stanowią w przybliżeniu 3% wszystkich genów u prokariotów. Wobec tego nie jest zaskoczeniem, że bakteryjne proteazy odgrywają kluczową rolę w takich procesach jak degradacja niepotrzebnych białek, zdobywanie składników odżywczych, proteolityczna modyfikacja białek i regulacja ekspresji genów oraz są czynnikami wirulencji ludzkich patogenów. Przykładem choroby, w której etiologią kluczową rolę odgrywają proteazy, jest paradontoza. Paradontoza, dotykająca w swoich zaawansowanych postaciach nawet 15% dorosłych ludzi, jest najprawdopodobniej najczęstszym wywołanym przez bakterie przewlekłym schorzeniem o charakterze zapalnym znanym ludzkości. Nieleczona paradontoza może prowadzić nie tylko do utraty zębów, ale również przyczynić się do powstawania i/lub rozwoju systemowych schorzeń takich jak reumatoidalne zapalenie stawów, cukrzyca, choroby neurodegeneracyjne i schorzenia układu krążenia. Wprawdzie w etiologię paradontozy zaangażowanych jest wiele gatunków bakterii, ale 3 z nich: *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* i *Treponema denticola*, tworzące tzw. „czerwony kompleks”, są uważane za główne periodontopatogeny. Wspólną cechą bakterii „czerwonego kompleksu” jest bardzo wysoka zewnątrzkomórkowa aktywność proteolityczna, która jest powszechnie uważana za główny czynnik wirulencji tych patogenów. Znaczenie wydzielniczych proteaz *P. gingivalis* i *T. denticola* w patogenezie paradontozy jest bardzo dobrze opisane. Pomimo znaczenia proteaz dla wirulencji bakterii „czerwonego kompleksu”, do niedawna nasza wiedza o wydzielniczych enzymach proteolitycznych *T. forsythia* wciąż była bardzo niewielka. Sytuacja ta uległa drastycznej zmianie wraz z odkryciem przez nasz zespół badawczy rodziny zupełnie nowych 6 proteaz, które nazwano proteazami KLIKK. Jednakże pomimo coraz liczniejszych dowodów, również tych opublikowanych, jasno wskazujących na wyjątkowe właściwości biochemiczne i strukturalne proteaz KLIKK jak ich możliwą rolę w wirulencji *T. forsythia* poprzez manipulację odpowiedzią ze strony wrodzonego układu immunologicznego, enzymy te, w porównaniu do proteaz innych periodontopatogenów, są wciąż słabo zbadane. Wobec tego w ramach proponowanego projektu zamierzamy nie tylko wyjaśnić na poziomie molekularnym wyjątkowe cechy proteaz KLIKK, ale również zbadać ich funkcję jako potencjalnych czynników wirulencji *T. forsythia*.

**2. Opis badań:** W związku z powyższym proteazy KLIKK zostaną otrzymane z wykorzystaniem bakteryjnego systemu produkcji białek. Na początku, bardzo dokładnie zbadamy i określimy specyficzność substratową badanych proteaz. W dalszym etapie na podstawie wyników rozpraszania promieni Roentgena przez uzyskane kryształy badanych białek rozwiążemy strukturę przestrzenną proteaz KLIKK. Głównym celem badań krystalograficznych jest wyjaśnienie na poziomie molekularnym wyjątkowej specyficzności substratowej i mechanizmów latencji (w jaki sposób enzymy utrzymywane są w nieaktywnej formie przed wydzieleniem na zewnątrz komórki) badanych proteaz. Sprawdzimy również, czy proteazy KLIKK są odpowiedzialne za manipulację odpowiedzią wrodzonego układu odporności przez *T. forsythia*. W tym celu porównamy wrażliwość na zabicie przez wrodzony układ odporności bakterii *T. forsythia*: szczepu dzikiego oraz mutantów pozbawionych pojedynczej proteazy KLIKK. Na podstawie tych wyników postaramy się znaleźć kluczową dla ochrony *T. forsythia* przed wrodzonym układem odporności proteazę KLIKK. Sprawdzimy również, czy proteazy KLIKK są w stanie ochronić przed zabiciem przez wrodzony układ odporności inne bakterie, zwłaszcza inne periodontopatogeny: zarówno w formie planktonicznej (w zawieszynie) jak i znajdujące się w otrzymanym w laboratorium wielobakteryjnym biofilmie. Na koniec, zbadamy czy proteazy KLIKK poprzez aktywację receptorów znajdujących się na powierzchni ludzkich neutrofilów i komórek nabłonka dziąseł mogą przyczynić się do rozwoju paradontozy.

**3. Powód podjęcia badań:** Pomimo licznych prób nadal nie jest dostępny lek, który mógłby być wykorzystany nie tylko w leczeniu, ale przede wszystkim w profilaktyce paradontozy. Główną przyczyną tego jest zaangażowanie więcej niż jednego gatunku bakterii w etiologię paradontozy. Ponadto w wielu przypadkach więcej niż jedna proteaza, które są kluczowymi czynnikami wirulencji bakterii „czerwonego kompleksu”, jest odpowiedzialna za jedną funkcję taką jak ochrona przed wrodzonym układem odporności. Wobec tego konieczne jest opisanie jak największej liczby proteaz periodontopatogenów, co umożliwi lepsze opisanie molekularnego mechanizmu powstawania i rozwoju paradontozy. Tylko wtedy będzie można znaleźć proteazę(y), które mogą być wykorzystane w przyszłości jako cel do opracowania leków. Wobec tego w ramach proponowanego projektu zamierzamy szczegółowo scharakteryzować proteazy KLIKK *T. forsythia*, zwłaszcza ich rolę w wirulencji *T. forsythia*. Pomimo możliwej roli proteaz KLIKK w etiologii paradontozy, jest również druga przesłanka do prowadzenia proponowanych badań: enzymy te posiadają wyjątkowe właściwości.

**4. Spodziewane efekty:** Wobec tego biochemiczna i strukturalna charakterystyka proteaz KLIKK powinna doprowadzić, między innymi, do opisania nowych mechanizmów aktywacji dla proteaz. Oprócz czysto naukowej wartości, uzyskane wyniki mogą zostać w przyszłości wykorzystane do opracowania leków zaprojektowanych na podstawie rozwiązanych struktur krystalicznych: inhibitorów nie tylko proteaz KLIKK, ale podobnych do nich proteaz takich jak ludzka papalizyna.