

1. Cel badań: Hydroliza wiązania peptydowego przez proteazy jest nieodwracalna, więc musi być ściśle kontrolowana w celu uniknięcia szkód w komórce czy też całym organizmie. Jednym z sposobów kontrolowania aktywności proteolitycznej, zwłaszcza w organizmach wielokomórkowych, jest synteza białkowych inhibitorów proteaz. Prawie wszystkie inhibitory są specyficzne względem wąskiej grupy proteaz, które posiadają podobną specyficzność substratową, i oddziałują bezpośrednio z szczeliną katalityczną i tym samym blokując dostęp do niej dla wszystkich substratów. W ostrym kontraście są natomiast inhibitory z rodziny α_2 -makroglobulin (A2M), które hamują bardzo szeroki zakres proteaz, bez zaburzania ich centrum aktywnego. Hamowanie jest osiągnięte dzięki nieodwracalnemu mechanizmowi pułapki osiąganemu przez ogromne zmiany strukturalne w cząsteczce inhibitora wywołane cięciem w regionie przynęty przez hamowaną proteazę, co prowadzi do uwięzienia enzymu proteolitycznego. Mechanizm działania A2M można więc porównać do mięsożernych roślin polujących na owady takich jak rosiczka i muchołówka amerykańska. Jednakże, w przeciwieństwie do tych roślin złapane proteazy są nietknięte i zachowują aktywność względem małych substratów. Poza wielokomórkowymi zwierzętami, geny kodujące domniemane A2M ogólnie nie są obecne w Archae, jednokomórkowych zwierzętach, grzybach i roślinach. Co ciekawe, A2M są znajdowane w bakteriach Gram-ujemnych kolonizujących ssaki, ale nie w wolno żyjących w środowisku mikroorganizmach. Wobec tego, jest interesujące, że A2M jest produkowane przez dwa gatunki bakterii: *Porphyromonas gingivalis* (Pg) i *Tannerella forsythia* (Tf), będące głównymi czynnikami etiologicznymi chorób przyzębia u ludzi, dotykających w swojej ostrej postaci nawet 15% dorosłych na świecie. Nielezione schorzenie prowadzi nie tylko do uszkodzenia tkanek podporowych zębów, co w ostateczności prowadzi do utraty zębów, ale również przyczynia się do powstawania i/lub rozwoju chorób ogólnoustrojowych takich jak cukrzyca, miażdżyca, reumatoidalne zapalenie stawów i choroby neurodegeneracyjne. Wobec tego głównym celem proponowanego projektu jest nie tylko dokładne biochemiczne i strukturalne opisanie mechanizmu hamownika proteaz wykorzystywanego przez PgA2M i TfA2M, ale również opisanie roli tych A2M w wirulencji periodontopatogenów.

2. Opis badań: TfA2M i PgA2M otrzymamy jako białka rekombinowane przy użyciu bakteryjnego systemu ekspresji. Najpierw zidentyfikujemy proteazy, zarówno ludzkie, jak i endogenne, hamowane przez badane A2M i szczegółowo scharakteryzujemy biochemicznie proces hamowania. Aby to osiągnąć, określimy stechiometrię hamowania (SI), czyli liczbę cząsteczek A2M potrzebną do zahamowania jednej cząsteczki aktywnej proteazy i stałą szybkości asocjacji (k_{ass}), parametr opisujący szybkość hamowania aktywności proteaz, określimy masę cząsteczkową najmniejszego substratu białkowego, dla którego następuje inhibicja, oraz zbadamy tworzenie i chemiczny charakter kompleksów inhibitorowych, proteaza-A2M. Na tym etapie przeanalizujemy również elastyczność hamowania badanych A2M, poprzez wprowadzenie różnych zmian w A2M, tak aby poprawić właściwości hamujące. Po drugie, za pomocą krystalografii rentgenowskiej i kriogenicznej mikroskopii elektronowej (cryo-EM) rozwiążemy trójwymiarową strukturę A2M: natywnych i w kompleksie z hamowanymi proteazami. Na koniec opiszemy biologiczną rolę PgA2M i TfA2M. W tym celu sprawdzimy przy użyciu komórek *P. gingivalis* i *T. forsythia*: szczepu dzikiego i mutantów delecyjnych pozbawionych A2M, czy A2M chronią te patogeny przed zabiciem przez ludzkie komórki fagocytarne (neutrofile, makrofagi) i nabłonkowe. Zbadamy również, czy A2M poprzez hamowanie proteazy, dentilizyny, ograniczają zjadliwość innego periodontopatogenu, *Treponema denticola*.

3. Powód podjęcia badań: W przeciwieństwie do ssaków, A2M są rzadko spotykane w bakteriach i, co zaskakujące, głównie w mikroorganizmach kolonizujących ssaki. Co więcej, bakteryjne, w przeciwieństwie do ssaczy, A2M są bardzo nieskutecznymi inhibitorami, co nie pozwoliło nawet na ich szczegółową charakterystykę biochemiczną. W tym kontekście fascynujące jest to, że dwa A2M wytwarzane przez ludzkie periodontopatogeny są bardzo skutecznymi inhibitorami. Ze względu na małe podobieństwo do innych scharakteryzowanych A2M, badania strukturalne TfA2M i PgA2M mogą ujawnić nowy mechanizm hamowania dla tej rodziny inhibitorów. Wreszcie, ze względu na sporadyczną dystrybucją A2M wśród bakterii, można przypuszczać, że A2M odgrywają zasadniczą rolę w wirulencji *P. gingivalis* i *T. forsythia*. Ze względu na zaangażowanie w liczne procesy fizjologiczne i etiologię chorób, proteazy są uważane za atrakcyjny cel rozwoju leków. Przykład takich schorzeń są choroby przyzębia, choroba Crohna, zespół jelita drażliwego i wrzodziejące zapalenie okrężnicy. W tym kontekście A2M wydają się dobrym kandydatem do opracowania leków, ponieważ w przeciwieństwie do większości znanych inhibitorów mogą hamować wiele zupełnie różnych proteaz.

4. Spodziewane efekty: Realizacja projektu doprowadzi nie tylko do szczegółowego opisu mechanizmu hamowania proteaz przez PgA2M i TfA2M, ale także roli A2M w zjadliwości periodontopatogenów. Porównując te dane z wynikami uzyskanymi dla innych A2M, można będzie również rzucić więcej światła na ewolucję bakteryjnych A2M. Wyniki te wzbogacą więc naszą wiedzę w takich dziedzinach, jak biochemia, biologia strukturalna i mikrobiologia. Pomimo czysto naukowych efektów, możemy również opisać nowy inhibitor oparty na rusztowaniu badanych A2M, co może być pierwszym etapem opracowania leku na choroby, w których etiologii kluczową rolę odgrywają proteazy.