

Rozprawa Doktorska

„Analiza biochemiczna deiminazy peptydyloargininowej i jej rola w wirulencji

Porphyromonas gingivalis”

Grzegorz Bereta

Streszczenie

Najczęściej spotykaną chorobą o podłożu zapalnym jest paradontoza, czyli przewlekłe zapalenie przyzębia. W chorobie tej na skutek chronicznego procesu zapalnego dochodzi do uszkodzenia tkanek przyzębia, co w konsekwencji prowadzi do utraty zębów i przekłada się na istotne pogorszenie jakości życia pacjentów. Głównym czynnikiem prowadzącym do rozwoju choroby są zmiany w mikroflorze bakteryjnej płytki podziąsłowej spowodowane wzrostem bakterii gatunku *Porphyromonas gingivalis*. Gatunek ten produkuje wiele czynników wirulencji, które osłabiają systemy obrony antybakteryjnej i stwarzają warunki do proliferacji dysbiotycznych gatunków bakterii. Jednym z takich czynników jest deiminaza peptydyloargininowa (PPAD), enzym modyfikujący reszty argininy do cytruliny. Skutkuje to utratą ładunku dodatniego, co w konsekwencji może powodować zaburzenie struktury i funkcji zmodyfikowanego peptydu lub białka. Aktywność PPAD została zidentyfikowana jako istotny czynnik wpływający na rozwój zapalenia przyzębia, a także reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS). W RZS kluczową rolę pełnią autoprzeciwciała specyficzne względem epitopów zawierających reszty cytruliny. Stwierdzono, że PPAD występuje w dwóch wariantach genetycznych (T1 i T2). W przedstawionej do oceny pracy doktorskiej scharakteryzowano właściwości enzymatyczne wariantów genetycznych PPAD, w tym specyficzność substratową oraz znaczenie aktywności PPAD w wirulencji *P. gingivalis*.

W oznaczeniach kinetyki enzymatycznej, inhibicji oraz wiązania substratu wykazano, że wariant T2 PPAD jest bardziej aktywny niż T1. Podwyższona aktywność wariantu T2 koreluje z klinicznym przebiegiem zapalenia przyzębia, gdyż pacjenci, u których występował szczep *P. gingivalis* z PPAD T2 cierpieli na bardziej zaawansowaną chorobę niż pacjenci zakażeni szczepem z wariantem PPAD T1. W pracy potwierdzono jednoznacznie, że w przeciwieństwie do ludzkich PADów, PPAD praktycznie nie wykazuje aktywności endodeiminazowej, niezależnie od tego czy jest natywnym enzymem izolowanym z *P. gingivalis*, czy też rekombinowanym białkiem produkowanym w *E. coli*. Wyniki tych analiz powtórzonych wielokrotnie podważają dane przedstawione w niektórych publikacjach. Na podstawie uzyskanej struktury krystalicznej PPAD

T2 z związanym inhibitorem Cl-amidyną przeanalizowano podobieństwa i różnice strukturalne PPAD i ludzkiego PAD4. Następnie, w oparciu o porównanie struktur zaprojektowano serię mutacji punktowych w PPAD i dokonano ekspresji zmutowanego enzymu a oczyszczone muteiny poddano szczegółowej analizie aktywności enzymatycznej z uwzględnieniem specyficzności substratowej. Stwierdzono, że reszty R152 oraz Y233 mają kluczowe znaczenie w wiązaniu substratu, a specyficzność PPAD dla C-końcowej argininy jest zależna od innych elementów strukturalnych enzymu. Przy okazji tych badań zaobserwowano, że ludzki PAD4 wydajnie cytrulinuje C-końcowe reszty argininy, co nie było wcześniej opisywane w literaturze. Pomimo różnic w aktywności PPAD T1 i T2, w mysim modelu resorpcji kości nie wykazano różnic w patogenności izogenowych mutantów *P. gingivalis* produkujących warianty genetyczne T1 lub T2 PPAD. Znaczenie PPAD jako czynnika wirulencji przynajmniej częściowo może wyrażać się poprzez potranslacyjną modyfikację (cytrulinację) białek budujących fimbrie, w tym białka FimA. Mutanty *P. gingivalis* pozbawione białka FimA i/lub aktywności PPAD nie stymulują receptora TLR2. Nie stymulują również produkcji prozapalnych czynników, prostaglandyny E2 przez fibroblasty. W tym kontekście bardzo ciekawe jest to, że w modelu infekcji larw *Galleria mellonella* zmutowany szczep *P. gingivalis* produkujący nieaktywny PPAD był bardziej wirulentny niż szczep dziki. Te różnice mogą wynikać z zaangażowania zarówno odpowiedzi wrodzonej jak i swoistej w proces resorpcji kości w mysim modelu infekcji. Wskazuje to istotność PPAD w manipulowaniu odpowiedzią nieswoistą.

Podsumowując, w przedstawionej pracy przeprowadzono biochemiczną analizę właściwości PPAD oraz znaczenia tego enzymu w wirulencji bakterii *P. gingivalis*. Wykazano również różnice we właściwościach PPAD w zależności od wariantu genetycznego oraz prawdopodobny synergizm PPAD z fimbriami wynikający z zwiększenia wirulencji *P. gingivalis* produkującego obydwa czynniki. Przedstawione wyniki poszerzają również wiedzę dotyczącą budowy i specyficzności zarówno PPAD, jak i ludzkiego PAD4, dla którego po raz pierwszy opisano aktywność egzodeiminazową. Wyniki te mogą stanowić podstawę do dalszych badań nad inhibitorami tych enzymów oraz patofizjologiczną rolę jaką pełnią w zależności od ich specyficzności substratowej.

Abstract


Periodontitis is the most prevalent inflammatory disease in the world. The disease is characterized by chronic inflammatory state which leads to the damage of the gum tissue and eventually to tooth loss. This has significant, detrimental effect on the quality of life of affected patients. The main factor leading to the disease initiation and progression is a change in the oral subgingival microflora caused by *Porphyromonas gingivalis*. This is possible through the action of virulence factors produced by this species. One of such factors is peptidylarginine deiminase (PPAD), the enzyme which converts arginine residues to citrulline. Such modification leads to a loss of positive charge and in turn can disturb the structure and function of modified substrates. Activity of PPAD has been identified as an important factor contributing to the progression of periodontitis and rheumatoid arthritis, which is caused by autoimmune reaction to citrullinated epitopes. It was observed that PPAD can be found in two different genetic variants (T1 and T2). In this thesis the substrate specificity and other enzymatic properties of PPAD variants and their contribution to *P. gingivalis* virulence was investigated.

Using enzyme kinetic, inhibition and substrate binding assays it was shown that PPAD variant T2 is more active than T1. Interestingly, patients with periodontitis and carrying *P. gingivalis* strain expressing T2 variant of PPAD showed significantly more severe clinical symptoms of the disease as compared to patients infected with the T1 variant. In contrast with human PAD enzymes, neither native PPAD produced by *P. gingivalis* nor the enzyme expressed in *E. coli* exerted any significant arginine endodeiminase activity. This data contest results presented by some reports and showing the high activity of recombinant PPAD on internal arginine residues. Based on the crystal structure of PPAD T2 with bound inhibitor Cl-amidine the similarities between PPAD and human PAD4 were analyzed. Based on this analysis a series of point mutations, including R152 and Y233 were designed to generate PPAD with endoarginine deiminase activity. The expressed in *P. gingivalis* and purified PPAD mutants were tested on an array of substrates bearing either the internal or C-terminal arginine. Although R152 and Y233 were crucial for substrate binding, none of introduced mutations affected PPAD specificity. This indicates that other elements of the substrate binding site contribute to the preference of PPAD for C-terminal arginine. Here, we also observed unreported earlier efficient modification of C-terminal arginines by human PAD4. In the mice gavage model of periodontitis, we confirmed that PPAD is essential for full manifestation of the *P. gingivalis* pathogenicity but there was no difference in alveolar bone loss between mice

infected with strains expressing T1 and T2 variant of PPAD. One way PPAD contributes to *P. gingivalis* virulence is apparently dependent on citrullination of fimbriae necessary for proinflammatory stimulation through activation of the TLR2 dependent pathway. Mutant strains devoid of FimA and/or PPAD activity did not stimulate the TLR2 receptor and also weakly stimulated prostaglandin E2 production pathway in gingival fibroblasts. Unexpectedly, in the invertebrate infection model of *Galleria mellonella* the mutant strain of *P. gingivalis* producing inactive PPAD was more virulent than the wild-type, parental strain. This discrepancy can be apparently due to involvement of both innate and adaptive immunity responses to infection in resorption of the alveolar bone in mice. As *G. mellonella* has only innate immunity it is clear that PPAD is apparently able to compromise this defense system.

To sum up, this work presents biochemical, structural and enzymological analysis of PPAD and its arginine deiminase activity contribution to the *P. gingivalis* pathogenicity. The differences in activity of PPAD variants and possible interaction of PPAD with fimbriae in enhancing the virulence of *P. gingivalis* were also shown. Together, the presented results enhance our knowledge about specificity of PPAD and human PAD4 and constitute a starting point for further studies on inhibitors of those enzymes and their biological role in the context of their specificity.


Grzegorz Bereta


Promotor

Digitally signed
by Jan Potempa
Date: 2022.05.10
08:54:44 -04'00'