

Przewlekłe zapalenie przyzębia (PZP), potocznie nazywane paradontozą, jest chorobą zapalną o podłożu mikrobiologicznym. Najnowsze dane WHO wskazują, że PZP w ciężkiej postaci dotyka 19% populacji na całym świecie. Nieleczona choroba prowadzi do nieodwracalnego uszkodzenia tkanek, utraty przyczepu łącznotkankowego i ostatecznie do utraty zębów. Mikrobiologiczne podłoże PZP związane jest z pojawieniem się tzw. dysbiotycznej mikroflory wywołanej przez obecność kluczowych periodontopatogenów, jak np. *Porphyromonas gingivalis*. Jest to beztlenowa bakteria, która ze względu na wysoki stopień patogenności oraz zdolność do unikania układu immunologicznego gospodarza, pełni istotną funkcję w wywoływaniu przewlekłego stanu zapalnego. Natomiast interakcje między komórkami strukturalnymi przyzębia a patogenami jamy ustnej odgrywają ważną rolę w rozwoju choroby. Jedną z najliczniejszych grup komórek dziąsła są fibroblasty dziąsła (ag. *gingival* fibroblasts; GFs), które pod wpływem aktywacji mogą wykazywać funkcje immunologiczne, np. poprzez indukcję infiltracji leukocytów. Ostatnie doniesienia literaturowe wskazują, że modulacja mechanizmów epigenetycznych może odwrócić patologiczne zmiany obserwowane w PZP. Jednakże dane opisujące epigenetyczne podłoże interakcji między *P. gingivalis* i/lub środowiskiem zapalnym a GFs są ograniczone.

Jednym z celów niniejszej pracy doktorskiej było zbadanie roli acetylacji histonów w aktywacji zapalnej GFs. Acetylacja histonów jest jednym z procesów epigenetycznych, który jest kontrolowany przez acetylotransferazy histonów (HATs) i deacetylasy histonów (HDACs). Acetylacja histonów prowadzi do aktywacji transkrypcji, natomiast deacetylacja histonów jest odpowiedzialna za wyciszenie ekspresji genów. Jednak ostatnie badania z wykorzystaniem inhibitorów HDAC (HDACi) wykazały, że regulacja ta jest bardziej złożona, a do zainicjowania transkrypcji nie wystarczy tylko acetylacja. W niniejszym badaniu HDACi wykorzystano do sprawdzenia, czy farmakologiczna modulacja systemu acetylacji może odwrócić patologiczne zmiany wywołane obecnością bakterii i mediatorów stanu zapalnego. Zastosowanie pan-HDACi (SAHA, ITF2357) i HDAC3/6i, ale nie inhibitorów HDAC1, HDAC6 ani HDAC8 zmniejszyło odpowiedź zapalną GFs na *P. gingivalis* i cytokiny prozapalne. Wynik ten sugeruje istotną rolę HDAC3 w aktywacji zapalnej GFs. Wyciszenie ekspresji *HDAC3* poprzez transfekcję komórek siRNA w większości pokrywało się z przeciwzapalnymi efektami HDAC3/6i w GFs infekowanych *P. gingivalis*. Natomiast hamowanie aktywności HDAC nie miało wpływu na internalizację i przeżywalność wewnątrzkomórkową bakterii. Przeciwzapalne działanie HDACi nie było również związane z indukcją szlaków sygnałowych MAPK (kinazy białkowej aktywowanej mitogenami) lub NFκB (czynnika jądrowego κB), jak również nie

wynikało z indukcji syntezy negatywnych regulatorów transkrypcji. Podsumowując, badania te pozwoliły na identyfikację HDAC3 jako ważnego regulatora ekspresji genów zapalnych i wskazują, że terapie blokujące aktywność HDACs, w szczególności HDAC3, mogą być korzystne w osłabianiu stanu zapalnego w PZP.

Metylacja DNA jest procesem prowadzącym do wyciszenia ekspresji genów, który katalizowany jest przez metylotransferazy DNA (DNMTs). Najnowsze badania wskazują, że hamowanie aktywności DNMTs może osłabiać stan zapalny i resorpcję kości w PZP, potencjalnie przyczyniając się do poprawy stanu pacjentów. Dlatego też kolejnym celem niniejszej pracy było określenie wpływu metylacji DNA na funkcje biologiczne i aktywację zapalną GFs. W tym celu komórki inkubowano przez 12 dni w obecności inhibitora DNMT1 – decytabiny (5-aza-2'-deoksytydyna), który indukował hipometylację DNA. Analiza transkryptomyczna (sekwencjonowanie RNA; RNA-seq) ujawniła, że decytabina indukowała ekspresję genów związanych z odpowiedzią zapalną, natomiast ekspresja genów kontrolujących procesy związane z organizacją włókien kolagenowych i macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) była obniżona. Wyniki te wykazały zatem, że decytabina indukuje prozapalny fenotyp w GFs, a badania funkcjonalne potwierdziły wyniki analizy RNA-seq. Pokazano również, że decytabina może przyczyniać się do rozprzestrzeniania bakterii, ponieważ ułatwiała adhezję *P. gingivalis* do komórek. Ponadto decytabina wykazywała efekt antyproliferacyjny i cytotoksyczny, a jej niekorzystne działanie potwierdzono również w fibroblastach więzadła przyzębia (PDLFs). Ze względu na fakt, że decytabina jest wysoce niestabilna, przeprowadzono dalsze badania w celu weryfikacji, czy toksyczne produkty uwalniane podczas degradacji decytabiny mogą przyczyniać się do obserwowanych efektów. Wyniki wykazały jednak, że produkty degradacji inhibitora miały znikomy wpływ na aktywację zapalną i funkcje biologiczne GFs, co wskazuje, że obserwowane niekorzystne efekty działania decytabiny są konsekwencją wywołanej przez nią hipometylacji DNA. Podsumowując, ta część projektu doktorskiego wykazała ograniczony potencjał terapeutyczny decytabiny ze względu na jej niekorzystny wpływ na funkcje biologiczne GFs i PDLFs oraz na indukcję szlaków prozapalnych. Inhibitory DNMT stanowią jednak dobre narzędzie do badania roli hipometylacji DNA w komórkach strukturalnych dziąsła.

Trzecim celem niniejszej pracy była zbadanie długotrwałego wpływu infekcji *P. gingivalis* na aktywację zapalną GFs. W modelu tym GFs były pre-infekowane *P. gingivalis* przez 24 h, następnie bakterie odpłukiwano, a komórki poddawano stymulacji TNF (czynnik martwicy nowotworów) w 6 dniu eksperymentu. Wcześniejsza infekcja bakteryjna uwrażliwiła GFs na

późniejszą stymulację zapalną i skutkowałą podwyższoną produkcją cytokin (IL-6, IL-8), a efekt ten był niezależny od proliferacji komórek. Dodatkowo, analiza wewnątrzkomórkowego poziomu IL-6 za pomocą cytometrii przepływowej potwierdziła ten wynik, pokazując, że GFs wykazują zjawisko "pamięci immunologicznej" w odpowiedzi na ponowną stymulację zapalną. Ponieważ literatura wskazuje procesy epigenetyczne jako mechanizm leżący u podstaw "wrodzonej pamięci immunologicznej", zbadano zmiany w profilu metylacji DNA w GFs. Analiza RRBS (zredukowane reprezentacyjne sekwencjonowanie bisulfitowe) nie wykazała jednak istotnych zmian zarówno w globalnym, jak i w lokalnych poziomach metylacji DNA pomiędzy nieinfekowaną kontrolą a komórkami pre-infekowanymi *P. gingivalis*. Dalsze badania pokazały jednak wzrost poziomu fosforylacji podjednostki p65 czynnika transkrypcyjnego NFκB po stymulacji TNF w pre-infekowanych GFs. Wynik ten sugeruje możliwą rolę szlaku sygnałowego NFκB w regulacji obserwowanych zmian podczas aktywacji zapalnej GFs. Określenie pełnej skali i konsekwencji tego zjawiska, jak również potwierdzenie roli szlaku NFκB, wymaga jednak dalszych badań.