

## Streszczenie rozprawy doktorskiej

### „Charakterystyka molekularna kompleksu białek HVEM-CD160, jako potencjalnego celu w immunoterapii”

mgr Katarzyna Kuncewicz

Punkty kontrolne układu immunologicznego są to białka, które mogą modulować działanie układu odpornościowego, poprzez jego stymulację lub inhibicję. Niektóre z tych białek są już dobrze poznane np. białka CTLA-4 oraz PD1, ale istnieją również i takie, o których wiadomo jeszcze bardzo mało. Jednym z niedawno odkrytych punktów kontrolnych układu immunologicznego jest białko CD160 (ang. *cluster of differentiation 160*), którego budowa i funkcja nie zostały jeszcze dokładnie poznane. Wiadomo na pewno, że białko CD160 występuje między innymi na powierzchni limfocytów T i oddziałuje z białkiem HVEM (ang. *herpesvirus entry mediator*), obecnym na komórkach prezentujących antygen lub komórkach nowotworowych. Tworzenie kompleksu CD160–HVEM powoduje hamowanie aktywacji limfocytów T, ich proliferacji i produkcji przez nie cytokin. Coraz więcej badań wskazuje, że kompleks białkowy CD160–HVEM może być celem terapeutycznym w leczeniu chorób nowotworowych, infekcji wirusowych oraz chorób immunologicznych. Liczne badania udowadniają, że kompleks ten może również brać udział w wielu nieodkrytych szlakach immunologicznych.

Tematem przedstawionej pracy doktorskiej była charakterystyka molekularna kompleksu białek CD160–HVEM. Ponieważ, niewiele wiadomo na temat budowy CD160, w pierwszym etapie badań postanowiłam sprawdzić, czy białko to występuje w postaci monomeru, dimeru czy też tworzy wyższe formy oligomeryczne w roztworze wodnym. Przy wykorzystaniu takich technik jak: elektroforeza SDS-PAGE, chromatografia wykluczenia sterycznego, test Ellman'a oraz spektrometria mas wykazałam, że białko CD160 jest monomerem i posiada w sekwencji aminokwasowej jedną resztę cysteiny z wolną grupą sulfhydrylową. Następnie, przy wykorzystaniu techniki wymiany wodoru-deuteru sprzężonej ze spektrometrią mas oraz metod modelowania molekularnego, wyznaczyłam strukturę trzeciorzędową białka CD160. Wskazuje ona, że białko to zbudowane jest z dwóch  $\beta$ -kartek, z których jedna składa się z czterech  $\beta$ -nici, a druga z pięciu  $\beta$ -nici.

Kolejnym etapem mojej pracy było wyznaczenie fragmentów sekwencji aminokwasowej białka CD160, odpowiedzialnych za oddziaływanie z białkiem HVEM oraz

ustalenie struktury kompleksu CD160–HVEM. Na podstawie danych literaturowych wiadomo, że białko HVEM wiąże się z CD160 za pomocą domeny CRD1, składającej się z około 40 reszt aminokwasowych. W swoich badaniach skupiłam się więc na identyfikacji miejsc wiążących w białku CD160. Do wyznaczenia fragmentów w białku CD160, uczestniczących w oddziaływaniu z białkiem HVEM, wykorzystałam technikę wymiany wodoru-deuteru sprzężoną ze spektrometrią mas. Ustaliłam, że następujące fragmenty CD160 - CD160(16-21), CD160(30-34) i CD160(76-87) uczestniczą w wiązaniu się z białkiem HVEM. Dodatkowo sekwencję białka CD160 podzieliłam na 10 fragmentów (peptydów), których wykonałam syntezę. Przy wykorzystaniu chromatografii powinowactwa oraz testów immunoenzymatycznych wykazałam, że cztery peptydy (CD160(13-32), CD160(25-44), CD160(61-80), CD160(73-92)) wykazują powinowactwo do białka HVEM.

Ze względu na fakt, że tworzenie kompleksu CD160–HVEM hamuje działanie układu immunologicznego, zaprojektowałam również potencjalne inhibitory blokujące oddziaływanie wspomnianych wyżej białek. Moim celem było zaprojektowanie związków wiążących się z białkiem HVEM, dlatego postanowiłam sprawdzić czy zidentyfikowane przez mnie fragmenty sekwencji białka CD160 mogą hamować wiązanie się badanych białek. Do projektowania inhibitorów wykorzystałam również sekwencje aminokwasowe białek BTLA (ang. *B- and T-lymphocyte attenuator*) oraz gD (ang. *glycoprotein D*), które podobnie jak CD160 wiążą się z domeną CRD1 białka HVEM. Następnie wykonałam syntezę dwunastu peptydów (potencjalnych inhibitorów) i sprawdziłam ich wpływ na tworzenie kompleksu CD160–HVEM, za pomocą immunoenzymatycznych testów kompetycyjnych. Przeprowadzone badania wykazały, że dwa z zaprojektowanych peptydów (CD160(13-39)(Cys6-Asp37Cys) oraz gD(1-36)(Lys10Cys-Thr29Cys)) hamują tworzenie kompleksu CD160–HVEM.