

Streszczenie

Układ immunologiczny stanowi pierwszą linię obrony w walce z toczącymi się w organizmie infekcjami wywołanymi przez różne patogeny. W walce z komórkami nowotworowymi obiecująca wydaje się być terapia bazująca na blokadzie punktów kontrolnych układu immunologicznego. Punktami kontrolnymi układu odpornościowego nazwano receptory oraz ich ligandy, które zdolne są do regulowania aktywacji układu immunologicznego. Utworzenie kompleksu receptor/ligand dostarcza sygnałów stymulujących lub hamujących aktywację limfocytów T, dzięki czemu układ immunologiczny pozostaje w stanie równowagi. Jednym z przykładów takiego kompleksu jest oddziaływanie białka receptorowego CD160 z białkiem HVEM, które znajduje się na powierzchni komórek nowotworowych. Utworzenie kompleksu HVEM/CD160 powoduje zahamowanie aktywacji limfocytów T CD4⁺. Poznanie interakcji pomiędzy komórkami nowotworowymi, a komórkami układu odpornościowego na przykładzie receptorów HVEM/CD160 jest niezbędne, by możliwe było zaprojektowanie cząsteczek terapeutycznych (peptydów lub peptydomimetyków), które pozwolą na stymulowanie odpowiedzi immunologicznej organizmu.

Tematem niniejszej rozprawy doktorskiej były badania strukturalne białek HVEM i CD160. Do badań strukturalnych niezbędne są duże ilości białka o wysokim stopniu czystości. Dlatego pierwszym etapem badań było opracowanie wydajnej metody ekspresji i oczyszczania domen zewnątrzkomórkowych HVEM⁽³⁹⁻¹⁹⁹⁾ i CD160⁽²⁷⁻¹⁵⁷⁾ odpowiedzialnych za tworzenie kompleksu.

Ekspresja białka HVEM⁽³⁹⁻¹⁹⁹⁾ prowadzona była w bakteryjnym systemie ekspresyjnym w dwóch szczepach *Escherichia coli*: BL21(DE3) oraz SHuffle® T7. Białko znajdowało się zarówno we frakcji rozpuszczalnej jak i nierozpuszczalnej. W komórkach *Escherichia coli* udało się nadprodukować trzy różne formy białka HVEM⁽³⁹⁻¹⁹⁹⁾: dimer, trimer oraz wyższy oligomer. W przypadku odzyskiwania białka zakumulowanego we frakcji nierozpuszczalnej stosunek uzyskanych form oligomerycznych różnił się w zależności od zastosowanej metody ponownego fałdowania.

W przypadku białka CD160⁽²⁷⁻¹⁵⁷⁾ ekspresja prowadzona była w trzech systemach ekspresyjnych: bakteryjnym, drożdżowym i eukariotycznym. Nadprodukcja w bakteryjnym systemie ekspresyjnym, podobnie jak w przypadku HVEM⁽³⁹⁻¹⁹⁹⁾, prowadzona była w dwóch szczepach *Escherichia coli*: BL21(DE3) oraz SHuffle® T7.

Białko w całości zostało zakumulowane we frakcji nierozpuszczalnej. W bakteriiach *Escherichia coli* udało się nadprodukcować nieglikozyłowany monomer białka CD160⁽²⁷⁻¹⁵⁷⁾, natomiast glikozyłowane białko CD160⁽²⁷⁻¹⁵⁷⁾ udało się uzyskać w drożdżach *Pichia pastoris* oraz w ludzkich embrionalnych komórkach nerki HEK293. Jednak uzyskane białko nie było odpowiednie do dalszych badań. CD160⁽²⁷⁻¹⁵⁷⁾, którego ekspresja prowadzona była w drożdżach, zawierało liczne reszty cukrowe trudne do całkowitego odcięcia przy użyciu enzymów. Natomiast ilości białka nadprodukowanego w eukariotycznym systemie ekspresyjnym były zbyt małe, aby można było je użyć do badań krystalograficznych.

Kolejnym etapem rozprawy doktorskiej były badania strukturalne z zastosowaniem rentgenografii strukturalnej oraz małokątowego rozpraszania promieniowania rentgenowskiego (SAXS).

Krystalizacja obu białek prowadzona była metodą dyfuzji par w układzie wiszącej kropli. Wybrane kryształy białka HVEM⁽³⁹⁻¹⁹⁹⁾ były namaczane w roztworze peptydu gD7Nle, który jest inhibitorem tworzenia się kompleksu HVEM/BTLA. Oddziaływanie peptydu z uzyskanym białkiem potwierdzone zostało za pomocą chromatografii powinowactwa, elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej oraz woltamperometrii cyklicznej. Poszukiwanie wstępnych warunków krystalizacji oraz ich optymalizacja pozwoliły na uzyskanie licznych kryształów, które zostały poddane badaniom dyfrakcyjnym przy użyciu synchrotronowego źródła promieniowania. Dane dyfrakcyjne zostały zarejestrowane dla dimeru i trimeru białka HVEM⁽³⁹⁻¹⁹⁹⁾ oczyszczonego z frakcji rozpuszczalnej.

Badania z zastosowaniem małokątowego rozpraszania promieniowania rentgenowskiego pozwoliły na wyznaczenie promienia żyracji dla obu białek, który w przypadku HVEM⁽³⁹⁻¹⁹⁹⁾ wynosił 3,03(2) nm, natomiast dla białka CD160⁽²⁷⁻¹⁵⁷⁾ 2,48 nm. Niezależnie od zastosowanego stężenia monomeru CD160⁽²⁷⁻¹⁵⁷⁾ odzyskanego z frakcji nierozpuszczalnej użytego do przeprowadzenia badań początkowy kształt krzywej rozpraszania wskazywał na skłonność białka do agregacji. O niskiej stabilności i potencjalnej oligomeryzacji białka świadczyły również wyniki uzyskane z zastosowaniem dynamicznego rozpraszania światła. Eksperyment dostarczył również informacji o tym, że dimer białka HVEM⁽³⁹⁻¹⁹⁹⁾ oczyszczonego z frakcji rozpuszczalnej był białkiem globularnym. Ponadto modelowanie *ab initio* za pomocą programu DAMMIF pozwoliło na zaproponowanie wstępnego modelu struktury w roztworze dimeru białka HVEM⁽³⁹⁻¹⁹⁹⁾ oczyszczonego z frakcji rozpuszczalnej.