

## **Tytuł:** Pochodzenie peptydów antygenowych szlaku MHC klasy I

### **Abstrakt**

Zdolność układu immunologicznego do odróżnienia 'swojego' od 'obcego' opiera się na prezentacji peptydów antygenowych na cząsteczkach głównego układu zgodności tkankowej klasy I (ang. Major Histocompatibility Complex I, MHC-I). 'Obce' peptydy pochodzące z patogenów lub zmutowanych 'swoich' białek rozpoznawane są przez cytotoksyczne limfocyty T CD8+, co prowadzi do zniszczenia komórki je prezentującej. Odkrycie, że peptydy pochodzące z intronów są prezentowane na cząsteczkach MHC-I zrodziło pytania o sposób powstawania antygenów dla układu MHC-I. Zrozumienie mechanizmu powstawania tych peptydów pozwoli lepiej pojąć w jaki sposób wirusy i komórki nowotworowe unikają tej ścieżki obrony organizmu. Moja praca doktorska koncentruje się na dwóch mechanizmach powstawania tych peptydów. Po pierwsze, na autofagii jako drodze degradacji białek i po drugie, na produktach pierwszej rundy translacji (ang. Pioneer Translation Products, PTPs) pochodzących z pre-mRNA.

#### *Pierwszy mechanizm*

Autofagia pełni istotną rolę w utrzymaniu homeostazy komórki i usunięciu z niej zakumulowanych szkodliwych agregatów białkowych, prowadzących do wielu chorób, między innymi chorób neurodegeneracyjnych. Odpowiedź immunologiczna wobec komórek niosących takie agregaty pozostaje jeszcze niezbadana i nie ma zbyt wielu dowodów na udział autofagii w produkcji antygenów dla cząsteczek MHC-I.

W celu oceny prezentacji na cząsteczkach MHC-I peptydów pochodzących z autofagii, użyliśmy limfocytów T CD8+ (OT-1), specyficznie rozpoznających epitop SL8 (SIINFEKL) pochodzący z kurzej owalbuminy (OVA) i prezentowany na mysich cząsteczkach MHC-I (Kb).

Oceniliśmy udział substratów dla procesu autofagii w powstawaniu antygenów MHC-I dzięki fuzji sekwencji owalbumina-SIINFEKL z tworzącą agregaty sekwencją poliglutaminy (PolyQ) oraz z sekwencją białka EBNA1 wirusa Epstein-Barr'a (EBV). Supresja autofagii na drodze knockdownu Atg5 i Atg12 nie wpłynęła na prezentację peptydów pochodzących z białka EBNA1, ale obniżyła prezentację antygenów pochodzących z samej owalbuminy oraz z produktu fuzji OVA z PolyQ. Co ciekawe, fuzja owalbuminy z sekwencją powtórzeń glicyna-alanina (GAR-OVA; ang. Glycin-Alanin repeats; GAR) pochodzącą z białka EBNA1 i hamującą prezentację antygenów

pochodzących z EBNA1, zahamowała prezentację antygenów pochodzących z owalbuminy. Wyniki wskazują na zależny od substratu udział autofagii w produkcji antygenów dla cząsteczek MHC-I oraz ilustrują nowy mechanizm unikania przez wirusy prezentacji antygenów powstających na drodze autofagii.

### *Drugi mechanizm*

Z biegiem czasu postulat, że peptydy antygenowe w całości pochodzą z degradacji 'starych' pełnołańcuchowych białek został zastąpiony nowym, mówiącym, że peptydy antygenowe powstają również z peptydów nowo-syntetyzowanych na drodze niekanonicznej, alternatywnej translacji, zachodzącej przed splicingiem mRNA. To tłumaczyłoby prezentację przez cząsteczki MHC-I peptydów pochodzących z intronów. Zgodnie z tym założeniem zaobserwowaliśmy, że sekwencja SIINFEKL wstawiona do drugiego intronu genu  $\beta$ -globiny powoduje proliferację limfocytów T CD8<sup>+</sup> OT-1.

Przy użyciu techniki PLA (ang. Proximity ligation assay) zaobserwowaliśmy akumulację peptydów SIINFEKL pochodzących z translacji pre-mRNA po zastosowaniu inhibitora splicingu – isokingentiny. Niedojrzałe mRNA  $\beta$ -globiny przed splicingiem wykryto we frakcji lekkich polisomów, podczas gdy sekwencja  $\beta$ -globiny po splicingu znajduje się we frakcji ciężkiej. Uzyskane wyniki dalej wspierają tezę, że peptydy antygenowe pochodzą z translacji niedojrzałego mRNA (pre-mRNA).