

### 3. Streszczenie

Jednym z kluczowych wyzwań współczesnej medycyny jest skuteczna diagnostyka, leczenie oraz zapobieganie chorobom o podłożu autoimmunologicznym. Jedną ze strategii ich leczenia jest immunoterapia ukierunkowana na punkty kontrolne układu immunologicznego (ICP). Cząsteczki te regulują intensywność odpowiedzi immunologicznej, poprzez przekazywanie sygnałów aktywujących lub hamujących komórki układu odpornościowego, co umożliwia zachowanie homeostazy organizmu. W niniejszej pracy skoncentrowałem się na białkach: czynnika wnikania wirusa opryszczki (HVEM) oraz jego ligandzie – białku LIGHT, które zaliczane są do stymulujących ICP.

HVEM i LIGHT należą do nadrodziny czynnika martwicy nowotworu, a ich oddziaływanie prowadzi do aktywacji ścieżek sygnałowych odpowiedzialnych m.in. za aktywację limfocytów T, komórek NK oraz dojrzewanie komórek dendrytycznych. Zaburzenie prawidłowego funkcjonowania tego mechanizmu związane jest z nadmierną aktywacją komórek układu odpornościowego, co może prowadzić do powstawania szeregu chorób o podłożu autoimmunologicznym, takich jak nieswoiste zapalenie jelit czy reumatoidalne zapalenie stawów. Zahamowanie tworzenia kompleksu HVEM/LIGHT, przy użyciu inhibitorów może więc stanowić potencjalną strategię terapeutyczną w leczeniu tych chorób. Inhibitory wiązania się białek HVEM/LIGHT mogą znaleźć również zastosowanie u pacjentów po przeszczepach narządów lub tkanek, u których wskazane jest kontrolowane wyciszenie odpowiedzi immunologicznej, w celu zapobiegania odrzuceniu przeszczepu. Ich zastosowanie może prowadzić do ograniczenia lub zapobiegania występowania powikłań immunologicznych, takich jak choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi oraz reakcja gospodarza przeciwko przeszczepowi.

W ciągu ostatnich lat, poczyniono znaczne postępy w chemio-informatyce. Na szczególną uwagę zasługuje projektowanie inhibitorów wspomagane komputerowo, wykonywane w oparciu o szereg wysoko wyspecjalizowanych narzędzi programistycznych.

Pozwalają one w niezwykle szybkim tempie zbadać właściwości wielu proponowanych molekuł, co pozwala na przeprowadzenie wstępnej selekcji związków, a tym samym uniknięcie wielu godzin pracy laboratoryjnej. Połączenie metod projektowania wspomaganego komputerowo z syntezą zaprojektowanych związków oraz ich eksperymentalną walidacją może stanowić efektywną strategię opracowywania skutecznych inhibitorów ukierunkowanych na określony cel molekularny.

W swojej pracy skupiłem się na zaprojektowaniu peptydowych inhibitorów tworzenia kompleksu HVEM/LIGHT, których sekwencja aminokwasowa oraz struktura bazywały na fragmentach białek HVEM oraz LIGHT. W pierwszym etapie moich badań zajęłem się analizą kompleksu HVEM/LIGHT. W celu określenia reszt aminokwasowych w białkach HVEM i LIGHT kluczowych dla ich wiązania wykonałem symulacje dynamiki molekularnej (MD). Na ich podstawie zaprojektowałem peptydy – potencjalne inhibitory tworzenia kompleksu HVEM/LIGHT. Dla związków tych również wykonałem symulacje MD, w celu sprawdzenia ich powinowactwa do celów molekularnych. W celu identyfikacji kluczowych oddziaływań stabilizujących kompleks białko/peptyd przeprowadziłem dekompozycję energii wiązania na poziomie pojedynczych reszt aminokwasowych, z wykorzystaniem metody MM-GBSA. Dla peptydów wykazujących najwyższe powinowactwo do białek zaproponowałem substytucje reszt aminokwasowych, mogących potencjalnie negatywnie wpływać na stabilność kompleksu białko/peptyd. Ponadto przeprowadziłem dodatkowe badania, w tym sterowaną dynamikę molekularną oraz ocenę wybranych parametrów termodynamicznych, co umożliwiło dokładniejsze scharakteryzowanie oddziaływań białko/peptyd. Wyselekcjonowane związki następnie zsyntezowałem i poddałem weryfikacji eksperymentalnej.

W moich badaniach eksperymentalnych otrzymałem dwie grupy peptydów – (1) bazujące na sekwencji aminokwasowej białka HVEM oraz (2) bazujące na sekwencji aminokwasowej białka LIGHT. Przeanalizowałem je pod kątem powinowactwa do celów molekularnych metodą termoforezy mikrokapilarnej oraz właściwości hamujących względem kompleksu HVEM/LIGHT, wykorzystując testy ELISA oraz badania na liniach komórkowych.

Badania komórkowe wykonałem podczas odbytego przeze mnie stażu w Instytucie Immunologii Wiedeńskiego Uniwersytetu Medycznego. Wśród peptydów będących fragmentami HVEM największym powinowactwem do LIGHT oraz najwyższą aktywnością hamującą charakteryzowały się CRD2(39–73)e oraz CRD2e\_K54E. Natomiast spośród związków zaprojektowanych na podstawie białka LIGHT najlepsze właściwości wykazywały peptyd light3 i jego analog light3\_E178L. Uzyskane wyniki wskazują, że cząsteczki te mogą stanowić punkt wyjścia do dalszej optymalizacji, jednak wymagane są dla nich dalsze badania, w celu pełnej oceny ich właściwości immunomodulacyjnych oraz ich potencjału terapeutycznego.