

Do tej pory odkryto i wstępnie scharakteryzowano kilkadziesiąt receptorów błonowych regulujących działania układu immunologicznego człowieka. Około połowa z opisanych immunoreceptorów znajduje się na powierzchni komórek układu odpornościowego (głównie limfocytów), ich ligandy natomiast na komórkach peryferyjnych (m.in. komórkach śródbłonna) oraz komórkach nowotworowych. Dotychczasowe badania pokazują, że komórki nowotworowe wykorzystują opisywane receptory do maskowania swojej obecności i hamowania odpowiedzi immunologicznej skierowanej wobec nich. Ostatnie badania oraz wyniki prób klinicznych dowodzą, że terapia przeciwciałami monoklonalnymi hamująca oddziaływanie pomiędzy immunoreceptorami PD-1/PD-L1 charakteryzuje się wysoką skutecznością oraz selektywnością w porównaniu do chemio i radioterapii, jak i dostępnych obecnie terapii immunologicznych. W świetle prezentowanych faktów, niezbędne jest poszerzenie naszej wiedzy w obszarze immuno-onkologii strukturalnej obejmującej molekularną charakterystykę poszczególnych receptorów zaangażowanych w regulację działania systemu immunologicznego człowieka.

Głównym założeniem prezentowanego wniosku jest charakterystyka strukturalna oraz biochemiczna kompleksów receptor – ligand istotnych z punktu widzenia badań podstawowych obejmujących procesy immunomodulacyjne. Pierwsza część projektu skupia się na strukturze przestrzennej białka PD-L2 oraz kompleksu PD-1/PD-L2. Immunoreceptor PD-L2 jest mocno powiązany z kompleksem białek PD-1/PD-L1, którego struktura przestrzenna została już wcześniej rozwiązana w toku realizacji pracy doktorskiej. PD-L2 jest drugim - obok PD-L1 - ligandem białka PD-1. Rola biologiczna PD-L2 jest znacznie słabiej określona niż w przypadku PD-L1, dlatego badanie tego ligandu jest niezwykle ciekawe w sensie poznawczym. Interesujące, że pomimo znaczącego podobieństwa sekwencji aminokwasowej, PD-L2 oddziałuje z PD-1 około trzy razy silniej w porównaniu do oddziaływania PD-1/PD-L1 tworząc tym samym kompetycję pomiędzy dwoma ligandami. Druga część projektu skupia się na receptorze CD80 ekspresjonowanym na powierzchni limfocytów. CD80, tak jak PD-1, także oddziałuje z dwoma białkami/ligandami: receptorem CTLA-4 oraz wcześniej opisywanym PD-L1. Struktura krystaliczna kompleksu immunoreceptorów - CTLA-4/CD80 - ujawniła, że białka te oddziałują ze sobą za pomocą pętli pomiędzy beta arkuszami. Pomimo podobieństw strukturalnych opisywanych białek, ten mechanizm oddziaływania jest zatem znacząco inny niż wcześniej opisany w przypadku kompleksu PD-1/PD-L1, w którym białka oddziałują ze sobą za pomocą dużych, hydrofobowych powierzchni złożonych z beta arkuszy. Dlatego, planowane badania mają doprowadzić do wyjaśnienia na poziomie molekularnym mechanizmu oddziaływania białek CD80/PD-L1. Ostatni, trzeci cel określony w projekcie to poszukiwanie białek oddziałujących z wewnątrzkomórkową domeną PD-L1. Identyfikacja partnerów wiązania umożliwi dalsze badania nad ścieżką przekazu sygnału zachodzącą poprzez ten immunoreceptor w komórce nowotworowej. Aspekt ten jest bardzo atrakcyjny z uwagi na fakt, że obecnie nie ma na ten temat żadnych danych literaturowych.

Podczas realizacji założonych celów proponowanego projektu zostaną otrzymane konstrukty genetyczne kodujące cytozolową domenę PD-L1 oraz zewnątrzkomórkowe domeny białek PD-L2 i CD80. Uzyskane konstrukty posłużą następnie do produkcji białek rekombinowanych w bakteriiach *Escherichia coli*. W celu realizacji części projektu obejmującej badania strukturalne, oczyszczone i poddane analizie jakościowej ektodomeny opisywanych immunoreceptorów będą krystalizowane w formie niezwiązanej oraz w kompleksach z oddziałującymi receptorami. Otrzymane kryształy zostaną poddane pomiarom dyfrakcyjnym z użyciem promieni Roentgena, a następnie uzyskane wyniki przeanalizowane przy użyciu specjalistycznego oprogramowania w celu rozwiązania struktur przestrzennych opisywanych białek oraz ich kompleksów. Podczas pracy nad drugą częścią projektu, cytozolowa domena PD-L1 inkubowana będzie z lizatami komórkowymi w celu odnalezienia partnerów białkowych, które następnie zostaną zidentyfikowane przy użyciu spektrometrii masowej.