

Streszczenie rozprawy doktorskiej mgr Tomasza Osińskiego

Tytuł:

Ustalenie struktury przestrzennej i analiza porównawcza wybranych alergenów wziewnych oraz ich kompleksów z przeciwciałami

Promotor: Prof. dr hab. Janusz M. Bujnicki

Promotor pomocniczy: dr Władek Minor

Streszczenie

Alergie towarzyszą człowiekowi niemal od zarania dziejów. Już w starożytnym Egipcie, Mezopotamii i Grecji znano reakcje alergiczne na pewne substancje. Alergią nazywamy stan, w którym organizm reaguje na substancję niegroźną w sposób gwałtowny i nieadekwatny do poziomu rzeczywistego zagrożenia. Reakcja alergiczna może występować pod wpływem różnych czynników i pod różnymi postaciami. Astma, wysięk z nosa, wysypka, problemy pokarmowe to tylko główne schorzenia związane z alergią. Astma jest jedną z najczęstszych i jedną z najpoważniejszych chorób dróg oddechowych, która może być powodowana przez alergeny wziewne. Przebieg astmy może być ostry lub chroniczny i ekspozycja na pyłek, ślinę i naskórek zwierzęcy, odchody roztoczy kurzu domowego, różne substancje karalusze, a także substancje niebędące alergenami mogą spowodować atak astmy. Poznanie struktury pneumoalergenów oraz próba zrozumienia molekularnych podstaw oddziaływań pomiędzy badanymi alergenami i przeciwciałami może przyczynić się do opracowania w przyszłości odpowiedniej terapii immunologicznej a tym samym zmniejszenia objawów astmy u osób nią dotkniętych.

Głównym elementem tezy doktorskiej było zbadanie molekularnych podstaw oddziaływania głównego alergenu Grupy 1 z roztocza kurzu domowego pochodzącymi z Europy Der p 1 (skórożarłoczek skryty - *Dermatophagoides pteronyssinus*) oraz roztoczy kurzu domowego pochodzącymi z Ameryki (*Dermatophagoides farinae*) Der f 1 z przeciwciałami monoklonalnymi 4C1, 5H8 oraz 10B9. Została przeprowadzona szczegółowa analiza powierzchni oddziaływania epitopu oraz paratopu w otrzymanych kompleksach alergenu z przeciwciałami.

Zbadanie alergenu Bla g 4 pochodzącego z karaczana prusaka (*Blatella germanica*) było kolejną częścią projektu poznania pneumoalergenów. Alergen ten należy do lipokalin – rodziny białek wiążących małe cząsteczki. Lipokaliny charakteryzują się stosunkowo niewielkim zachowaniem ewolucyjnym na poziomie sekwencji, ale silnym na poziomie struktury. Funkcja Bla g 4 oraz ligand wiązany przez to białko są nieznane. Rozwiązanie struktury Bla g 4 umożliwiło identyfikację ligandu, a przeprowadzenie analiz strukturalnych, sekwencyjnych oraz filogenetycznych najbliższego homologa – Per a 4 oraz innych spokrewnionych alergenów umożliwi w nieodległej przyszłości poznanie ich wzajemnych relacji.

Poznanie struktury oraz zbadanie homologów alergenu Alt a 1 było ostatnią częścią projektu. Alergen Alt a 1 pochodzi z pleśni *Alternaria alternata* występującej powszechnie w klimacie umiarkowanym. Alt a 1 jest alergenem o nieznanym strukturze i funkcji. Rozwiązanie struktury, oraz analizy sekwencyjne i filogenetyczne będą pierwszym krokiem do przyszłych badań nad tym alergenem.

Kompleksy alergenu Der p 1 z przeciwciałami 10B9 oraz 5H8, a także przeciwciała 10B9 w niezwiązanej formie dostarczyły unikatowej okazji do przeanalizowania sposobu wiązania

regionów determinujących komplementarność przeciwciał do epitopów. Bardzo bliskie pokrewieństwo Der p 1 oraz Der f 1 oraz różnorodność otrzymanych struktur umożliwiła porównanie zmian zachodzących podczas wiązania przeciwciał, a także rodzajów uwarunkowań molekularnych do ich wystąpienia. Umożliwiło to porównanie zmian zachodzących podczas wiązania przeciwciała 10B9 do Der p 1 w kontekście otrzymanej uprzednio struktury alergenów Der p 1 i Der f 1 z podwójnie swoistym przeciwciałem 4C1. Otrzymane wyniki prowadzą do wniosku, że nawet takie same lub prawie identyczne epitopy mogą zachowywać się zgodnie zarówno z modelem „klucza i zamka” jak i modelem indukowanego dopasowania. Identyfikacja reszt aminokwasowych odgrywających znaczącą rolę w oddziaływaniach alergenu z przeciwciałami oraz zrozumienie strukturalnych podstaw komplementarności między nimi może zostać wykorzystane w projektowaniu alergenów o epitopach charakteryzujących się obniżoną siłą wiązania przeciwciał do celów immunoterapii alergicznej.

Dzięki krystalografii rentgenowskiej możliwe było poznanie szczegółów oddziaływania alergenu Bla g 4 z tyraminą, a dzięki analizie struktur oraz sekwencji białek homologicznych, będących także alergenami, poznanie zachowanego ewolucyjnie miejsca i sposobu wiązania tego ligandu wśród pokrewnych alergenów. Okazuje się, że nawet najbliższy homolog Bla g 4 - Per a 4 pochodzący z karalucha amerykańskiego (*Periplaneta americana*) nie ma zachowanych kluczowych aminokwasów odpowiedzialnych za wiązanie tyraminy i oktopaminy, więc najprawdopodobniej wiąże inne ligandy oraz pełni inną funkcję.

Poznanie struktury alergenu Alt a 1, jako unikalnej dimerycznej β -baryłki, a także jako pierwszej z całej rodziny białek z grzybów o nieznannej funkcji jest pierwszym krokiem w celu dalszych badań nad funkcją oraz powiązaniem struktury z funkcją, co może doprowadzić do opracowania nowych form immunoterapii dla osób uczulonych na ten alergen.

Uzyskanie struktur krystalicznych za pomocą rentgenografii krystalograficznej oraz analizy molekularnych podstaw oddziaływania alergenów z przeciwciałami; analizy strukturalnej wraz z sekwencyjną między homologicznymi alergenami może w przyszłości zostać wykorzystana do celów farmaceutycznych. Wyniki tych badań pokazują, że zastosowanie połączenia różnych technik umożliwia otrzymanie optymalnych rezultatów.