

Abstrakt

Mezibuněčná komunikace umožňuje buňkám vzájemně interagovat a komunikovat se svým okolím pro koordinaci základních činností a funkcí. Imunitní buňky, rozptýlené po celém těle, se při výměně informací s jinými imunitními a somatickými buňkami zejména spoléhají na signální molekuly a rozpoznávající receptory. Proto může dysregulace buněčné komunikace narušit normální buněčné funkce a vést k rozvoji patologických stavů. Rozsáhlý výzkum v imunologii identifikoval několik specifických signálních mediátorů, které jsou v různých podmínkách dysregulovány nebo zneužívány. Hlavním cílem tohoto doktorského projektu je proto terapeutické cílení imunitních receptorů v patologických stavech, jako je autoimunita a rakovina.

V tomto projektu byl použit přístup proteinového inženýrství k vývoji malých proteinových vazebných molekul s potenciálním využitím ve výzkumu, diagnostice a terapii. Tyto nové proteinové vazebné molekuly byly vyvinuty z vysoce komplexní kombinatorické knihovny vytvořené mutagenezí vybraných reziduí albumin-vazebné domény (ABD) nebo Myomedinového proteinového skafoldu. Tento přístup rozšiřuje sadu terapeutických proteinů o specifické vysoko-afinitní malé proteinové vazebné molekuly s příznivými biofyzikálními vlastnostmi, které lze vyrábět v nákladově efektivním bakteriálním systému. Funkční aktivita a účinnost těchto vazebných molekul byly hodnoceny jak v *in vitro*, tak *in vivo* modelech nemocí.

Pro počáteční molekulární cíl byl vybrán receptor interleukinu-6 (IL-6) kvůli jeho zapojení do různých autoimunitních chorob, jako je imunoglobulin A nefropatie (IgAN) a chronické střevní záněty, stejně jako významný příspěvek k progresi rakoviny působením na nádorové buňky nebo nádorové mikroprostředí. K inhibici signalizace IL-6 byla řízenou evolucí vyvinuta sbírka od ABD odvozených malých proteinových vazebných molekul NEF cílených na IL-6 receptor alfa (IL-6R α). Výsledné ABD varianty prokázaly specifitu a vysokou afinitu vazby k IL-6R α , stejně jako inhibiční potenciál. Tyto ABD vazebné molekuly účinně potlačily maturaci B buněk, což poskytuje základ pro další výzkum jejich aplikovatelnosti v IgAN. Rostoucí množství důkazů zdůrazňuje důležitost IL-6 v IgAN, jak je diskutováno v přehledovém článku publikovaném jako součást této doktorské studie. Také NEF varianty cílené na signalizaci IL-6 účinně snižovaly markery střevního zánětu v chemicky indukovaném modelu kolitidy u myši. Nakonec blokátory NEF vykazovaly významné snížení proliferace a migrace nádorových buněčných linií, přičemž v některých případech překonávaly komerční protilátku Tocilizumab. Povzbuzující experimentální výsledky inspirovaly podání patentové přihlášky, která je v současnosti hodnocena Úřadem průmyslového vlastnictví České Republiky.

Další část doktorského projektu byla zaměřena na cílení signalizace zprostředkované IL-22 při IBD. Podle současného stavu poznání má signalizace IL-22 dvojí roli ve střevním zánětu v závislosti na kontextu choroby. Pomocí proteinového inženýrství byly z kombinatorické knihovny

ABD vyvinuty ABR varianty, které specificky cílí na podjednotku IL-22R1 komplexu receptoru pro IL-22. Specifita a inhibiční potenciál blokátorů IL-22R1 byly prokázány v *in vitro* testech. Navíc nejpersvědčivější ABR varianta prokázala protizánětlivý potenciál v modelu akutní kolitidy vyvolané DSS u myši, což zdůrazňuje významnou roli signalizace zprostředkované IL-22 ve střevním zánětu. Proto mohou ABR proteiny poskytnout cenné molekulární stopy pro budoucí vývoj léků na IBD.

Dále tato doktorská práce zahrnuje výzkumné úsilí na vývoji terapeutických nástrojů k predikci účinnosti terapie pomocí blokace imunitních kontrolních bodů u pacientů s rakovinou. V tomto kontextu byly z myomedinového skafoldu vyvinuty MBA ligandy cílené na PD-1 jako molekulární cíl, které rozpoznávají jak lidské, tak myší receptory s vysokou specifitou a afinitou. Diagnostický potenciál MBA ligandů byl hodnocen pomocí tkáňových řezů lidské krční mandle a na řezech pacientů s nemalobuněčným plicním karcinomem (NSCLC), a také pomocí *in vivo* zobrazování pozitronovou emisní tomografií (PET) u myši.

Nakonec, s ohledem na rostoucí roli receptoru 2 myeloidních buněk (TREM-2) u zánětlivých poruch a rakoviny, byla přezkoumána buněčná a molekulární biologie TREM-2 v přehledovém článku. Navíc byla zdůrazněna klinická relevance TREM-2 v progresi rakoviny a terapeutický potenciál molekul cílených na TREM-2 v terapii rakoviny samostatně nebo v kombinaci s inhibitory imunitních kontrolních bodů.