

1. STRESZCZENIE

Epitopy komórek T regulatorowych, zwane tregitopami, są polipeptydami, które zidentyfikowano w wielu białkach ludzkich i zwierzęcych. Stanowią ważny element regulacyjny układu immunologicznego. Tregitopy indukują proliferację komórek T regulatorowych (Treg). Dysfunkcja Treg jest istotnym elementem patogenezы chorób autoimmunologicznych. Powyższe obserwacje skłaniają do poszukiwań nowych tregitopów. Celem pracy była selekcja *in silico* i weryfikacja *in vitro* nowych tregitopów. Pierwszym etapem badań była identyfikacja białek biorących udział w mechanizmach regulacyjnych związanych z Treg. Spośród 88 białek dokonano selekcji potencjalnych tregitopów. Do dalszej analizy *in vitro* wykorzystano 8 sekwencji w różnym stopniu spełniających kryteria włączenia do fazy *in vitro*. W badaniu *in vitro* zakładano hodowle z mysich komórek prezentujących antygen (komórki dendrytyczne i makrofagi), komórek CD4⁺CD25⁻ pochodzących od myszy szczepu C57BL6Foxp3^{GFP} oraz wybranych polipeptydów. Metodą cytometrii przepływowej oznaczono odsetek komórek CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ i CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺IL-10⁺. Ponadto, analizie poddano powinowactwo peptydów kontrolnych z MHC-II. Badania *in silico* dowiodły, iż niskie powinowactwo do MHC-I wiązało się z większą częstotliwością występowania w tregitopach aminokwasów: tryptofanu, fenyloalaniny, peptydu prolina-glicyna, izoleucyny, natomiast wyższe powinowactwo z obecnością aminokwasów: asparaginy, leucyny i peptydów walina-walina oraz treonina-walina. Wynikiem badań *in vitro* była weryfikacja wpływu potencjalnych tregitopów na proliferację populacji funkcjonalnych Treg. W wyniku przeprowadzonych badań zidentyfikowano dwa nowe tregitopy (FSG, WLS), indukujące proliferację komórek CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺IL-10⁺. Tregitop WLS zidentyfikowano w białku P52960 pochodzącym z drożdży piekarskich *Saccharomyces cerevisiae*. Tregitop FSG został zidentyfikowany w białku P03244 wytwarzanym przez adenowirusy. Przeprowadzone prace pozwoliły na zdefiniowanie modelu badawczego, który począwszy od wstępnej selekcji *in silico* poprzez analizę *in vitro* umożliwił weryfikację tolerogennego potencjału dwóch nowych tregitopów. Potencjał aplikacyjny odkrytych tregitopów obejmuje zastosowanie ich, jako sekwencji tolerogennych w badaniach nad odrzucaniem przeszczepu, terapii chorób alergicznych, a także w optymalizacji leków biologicznych. Przedstawiona praca może stanowić podstawę do przeprowadzenia badań weryfikujących nowe tregitopy na zwierzęcych modelach chorób autoimmunologicznych.

2. ABSTRACT

Epitopes of T cells called tregitopes are polypeptides that have been identified in many human and animal proteins. They are significant regulatory component of immune system. Tregitopes induce proliferation of the regulatory T cells (Treg). Treg dysfunction is an important element of the pathogenesis of autoimmune diseases. The above-mentioned observations prompt a search for new tregitopes. The purpose of the study was *in silico* selection and *in vitro* verification of new tregitopes. The first phase of the study was an identification of proteins involved in regulatory mechanisms related to Treg. From 88 proteins, several potential tregitopes were selected. For further *in vitro* analysis, 8 sequences that fulfilled criteria with varying degrees were used. In the *in vitro* study, mouse antigen presenting cells (dendritic cells and macrophages), CD4⁺CD25⁻ cells, all from house mice, strain C57BL6Foxp3^{GFP} were co-cultured with selected polypeptides. With the use of flow cytometry frequency of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ and CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺IL-10⁺ cells was analyzed. Moreover, an affinity for MHC-II of control polypeptides was analyzed. The *in silico* studies proved that low affinity for MHC-I was connected with a larger frequency in tregitopes of such amino acids: tryptophan, phenylalanine, proline-glycine, isoleucine and high affinity was related to a presence of amino acids: asparagine, leucine, valine-valine and threonine-valine.

The result of *in vitro* studies was a verification of the impact of potential tregitopes on the proliferation of functional Treg population. In the wake of conducted studies, two new tregitopes (FSG and WLS) inducing the proliferation of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺IL-10⁺ were identified. Tregitope WLS was identified in protein P52960 from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Tregitope FSG was recognised in protein P03244 produced by adenovirus. Performed studies allowed identification of research model, that from preliminary *in silico* selection, through *in vitro* analysis enabled verification of tolerogenic potential of two new tregitopes. Application potential of discovered tregitopes includes their use as tolerogenic sequences in studies on transplant rejection, allergy therapy and also biologics optimization. Presented research could provide the basis for conducting the studies verifying new tregitopes on the animal models of autoimmune diseases.