

FAGOWE BIBLIOTEKI PEPTYDOWE PRZYKŁAD ZASTOSOWANIA W BADANIACH NAD RAKIEM

PHAGE-DISPLAYED PEPTIDE LIBRARIES
AN APPLICATION IN CANCER RESEARCH

Dominik CZAPLICKI

Pracownia Genetyki Molekularnej i Wirusologii, Wydział Biotechnologii UJ, Kraków

Streszczenie: Zagadnienie interakcji cząsteczek zależnej od ich przestrzennej struktury jest kluczowe dla wielu dziedzin biologii. Metody tworzenia bibliotek zawierających ogromną pulę różnych cząsteczek pozwalają na nowe podejście do poszukiwania i badania ligandów. Jedną z takich metod jest technologia *phage display* oparta na bibliotece sekwencji peptydów prezentowanych na powierzchni bakteriofagów nitkowatych. Spośród wielu zastosowań tej techniki na uwagę zasługuje procedura uzyskiwania epitopów peptydowych (mimeotopów) identycznych strukturalnie z wybranym epitopem. Strategia zastosowania mimeotopów zamiast antygenów glikolipidowych otwiera nowe możliwości czynnej immunoterapii nowotworów. Przykładem takiego podejścia badawczego jest poszukiwanie sekwencji peptydów imitujących strukturalnie gangliozyd G_{D2} obecny na komórkach nerwiaka zarodkowego (neuroblastoma).

Słowa kluczowe: biblioteki peptydowe, phage display, mimeotopy, immunoterapia nowotworów.

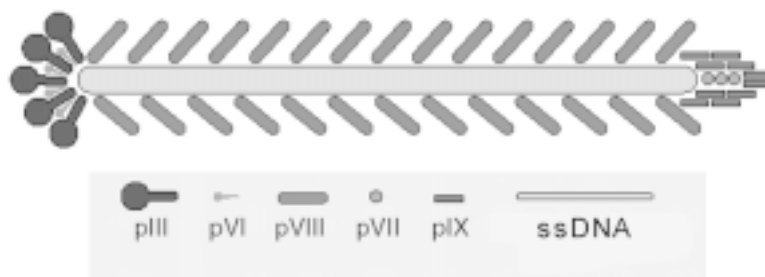
Summary: The problem of molecules interaction based on the spatial structure is central to many fields of biology. Methods of building libraries that contain vast numbers of different molecules offer new approach in ligand-oriented research. One of these methods is phage display technology using libraries of peptides displayed on filamentous phage particles. Among many applications of the technique, structural peptide mimicry seems to be particularly important, since it opens a possibility for cancer immunotherapy to utilise peptide epitopes instead of glycolipid ones. The search for peptide sequences that mimic G_{D2} ganglioside present on neuroblastoma cancer cells comes as an example of this strategy.

Keywords: peptide libraries, phage display, mimeotopes, cancer immunotherapy.

*Praca była finansowana przez grant 3P05A 00124 Ministerstwa Nauki i Informatyzacji.

Oddziaływanie pomiędzy cząsteczkami oparte na ich przestrzennym dopasowaniu jest podstawą zjawisk biologicznych na poziomie molekularnym. Wiązanie substratu przez enzym, łączenie się hormonu z jego receptorem, adhezja komórek czy reakcja antygen - przeciwciało, choć stanowią jedynie skromny wybór takich oddziaływań, świadczą o ich powszechności i ogromnym znaczeniu, a także możliwości praktycznych zastosowań. Badanie takich procesów stanowi niewątpliwie kluczowe zagadnienie szeroko pojętej biologii molekularnej, a podczas ostatnich kilkunastu lat opracowane zostały metody umożliwiające bezprecedensowy postęp w tej dziedzinie. Metody te pozwalają na poszukiwanie ligandów dla rozmaitych celów biologicznych przy wykorzystaniu bibliotek, to jest ogromnych zbiorów cząsteczek o cechach potencjalnych ligandów. Biblioteki takie mogą zostać utworzone metodami chemii kombinatorycznej, co ma swoje zastosowanie w poszukiwaniu substancji o określonym działaniu farmakologicznym (ang. *drug discovery*). Istnieją również biblioteki, które budowane są dzięki technikom rekombinacji DNA i mogą się składać z oligonukleotydów RNA lub DNA (aptamerów), a nawet kompletnych wirionów zawierających na swej powierzchni potencjalne ligandy. W pierwszym przypadku mamy do czynienia z technologią SELEX (ang. *Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*) [7,8], natomiast w drugim – z metodą przeszukiwania bibliotek fagowych (ang. *phage display*). Znamionną cechą obu jest zastosowanie strategii ewolucji powinowactwa, która opiera się na wyławianiu z biblioteki wielu ligandów o wysokim powinowactwie, a następnie stopniowym wzbogacaniu ich puli w ligandy najlepiej wiążące cząsteczkę docelową. Charakterystyczny dla technik wykorzystujących przeszukiwanie bibliotek jest fakt, iż selekcja ligandów nie wymaga żadnej wiedzy o strukturze cząsteczki docelowej, co powoduje wszechstronność zastosowań wspomnianych metod. Technologie SELEX oraz *phage display* są w dużym stopniu komplementarne, a dalsza część artykułu traktowała będzie o podstawach i zastosowaniach drugiej z nich.

Fundamentem metody przeszukiwania bibliotek fagowych jest wykorzystanie bakteriofagów nitkowatych należących do rodzaju *Inoviridae*. Stanowią one grupę wirusów o charakterystycznej budowie (ryc. 1) infekujących bakterie *Escherichia coli* za pośrednictwem pili F. Infekcja nie powoduje lizy komórek bakteryjnych, a jedynie około dwukrotne spowolnienie ich wzrostu. Do rodzaju *Inoviridae* należy kilka gatunków bakteriofagów (fI, fD, M13), lecz ich sekwencje DNA są identyczne w ponad 98%.



RYCINA 1. Schemat budowy fagów nitkowatych na przykładzie M13

Genomem fagów nitkowatych jest jednoniciowa cząsteczka DNA (ssDNA) o długości około 6500 zasad zawierająca 11 genów – około połowa z nich koduje białka kapsydu. Główne znaczenie strukturalne ma białko VIII (g8p) występujące na powierzchni wirionu w około 2700 kopiach, natomiast najważniejsze dla infekcyjności faga jest białko III (g3p) obecne w 5 kopiach.

Kluczowy dla idei *phage display* jest fakt, iż niektóre białka bakteriofagów typu M13 można modyfikować bez znaczącego wpływu na pełnioną przez nie funkcję. Zmiany te mogą między innymi polegać na fuzji z obcym białkiem lub peptydem, co prowadzi do powstania zrekombinowanego białka fagowego. Jeśli rekombinacja dotyczy składnika kapsydu, to takie obce białka lub peptydy mogą być eksponowane (ang. *displayed*) na powierzchni bakteriofaga. Mogą one tym samym oddziaływać ze znajdującym się w otoczeniu przeciwciałem lub innym ligandem. Co niezmiernie istotne, sekwencja nukleotydowa prezentowanych w ten sposób cząsteczek znajduje się w genomie faga – manipulując genotypem można więc znaleźć odpowiedni fenotyp.

Zastosowane w metodzie *phage display* podejście polega najczęściej na stworzeniu biblioteki złożonej z milionów lub miliardów rozmaitych sekwencji prezentowanych na powierzchni bakteriofagów nitkowatych. W skrócie – używane w tym celu są rekombinacyjne techniki DNA pozwalające na wygenerowanie ogromnej różnorodności sekwencji włączanych następnie w wybrane miejsce wirusowego genu kodującego białko kapsydu, najczęściej g3p lub g8p. Następnie tworzone są klony bakteriofagów, z których każdy ma inną wersję zrekombinowanego genu, a zatem prezentuje odmienną sekwencję aminokwasową. Tym sposobem otrzymuje się fagową bibliotekę peptydową o złożoności określonej liczbą występujących w niej sekwencji.

Zbiór sekwencji zawartych w bibliotece fagowej stanowi podstawę dla procedury selekcyjnej określanej jako *panning*. Ogólnie polega ona na przeprowadzaniu kolejnych cykli wiązania fagów z ligandem oraz namnażania tak wybranych klonów. Jako ligand do selekcji służyć może zarówno przeciwciało, jak i enzym, receptor lub niemal dowolna inna cząsteczka. Każdy cykl (runda) powoduje znaczne wzbogacenie puli fagów w te, które przenoszą sekwencje o wysokim powinowactwie do ligandu. Wykorzystując zatem zróżnicowane powinowactwo peptydów w bibliotece można w ten sposób przeprowadzić wydajną selekcję fenotypów. Przez fenotyp rozumiana jest tutaj sekwencja występująca na danym klonie fagów, natomiast genotyp to kodujący ją fragment DNA. Co charakterystyczne, dopiero analiza genomu otrzymanych klonów pozwala na ujawnienie sekwencji aminokwasowych wyselekcjonowanych przez *panning*.

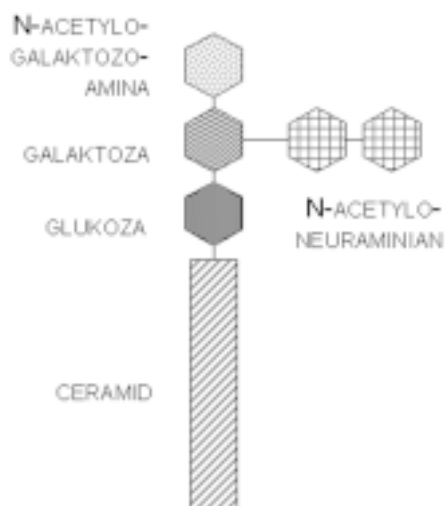
Przedstawiona tu pokrótce technologia otwiera pole dla nowych, niezwykle ciekawych zastosowań. O skali możliwości oferowanych przez metodę *phage display* świadczyć może krótka lista przykładowych badań prowadzonych z jej użyciem:

- identyfikacja nowych substratów enzymatycznych oraz inhibitorów [13],
- poszukiwanie antagonistów i agonistów rozmaitych receptorów [5],
- badanie oddziaływań białko-białko zachodzących dzięki domenom rozpoznającym specyficzne sekwencje [10],
- odkrywanie nieznanych bakteryjnych białek błonowych i pozakomórkowych [20],
- identyfikacja sekwencji aminokwasowych o potencjalnych własnościach alergicznych [18],

- mapowanie epitopów rozpoznawanych przez specyficzne przeciwciała zarówno monoklonalne, jak i poliklonalne [15],
- inżynieria przeciwciał i tworzenie nowych fragmentów wiążących antygen [12],
- poszukiwanie sekwencji peptydów wiążących się specyficznie do komórek nowotworowych [11, 17].

Kolejnym zastosowaniem przeszukiwania fagowych bibliotek peptydowych, które daje nowe praktyczne możliwości w medycynie, jest **mimikra peptydów** (ang. *peptide mimics*). Podstawą tej strategii jest założenie, że reakcje odpornościowe polegające na rozpoznaniu antygeny opierają się w istocie na rozpoznaniu struktury przestrzennej jego fragmentu – epitopu. Kluczowe jest przy tym przestrzenne dopasowanie epitopu do struktury odpowiedniego receptora. Wynika z tego, iż dwa epitopy zbliżone pod względem strukturalnym będą immunologicznie równocenne, bez względu na ich naturę chemiczną. Dzięki metodzie *phage display* możliwe staje się zastępowanie antygenów cukrowych i glikolipidowych odpowiednimi peptydami [6]. Zastosowanie przeciwciał monoklonalnych (skierowanych przeciw epitopowi antygeny glikolipidowego) do przeszukiwania fagowej biblioteki peptydowej pozwala na odnalezienie szeregu sekwencji imitujących w różnym stopniu ten epitop. Odnalezione w ten sposób peptydy są określane jako mimoty lub mimeoty.

Skuteczna immunoterapia wymaga istnienia specyficznego i immunogennego antygeny. Mimikra peptydów staje się niezwykle ważnym narzędziem w przypadkach, gdy taka terapia jest utrudniona ze względu na charakter chemiczny antygeny. Przykładem jest gangliozyd G_{D2} (disialogangliozyd) – glikolipidowy antygen powierzchniowy stanowiący składnik błony komórkowej, pochodna cerebroydu zawierająca dwie reszty kwasu sjałowego (ryc. 2). Jest to antygen właściwy komórkom pochodzenia neuroektodermalnego, ale jego zawartość jest szczególnie duża na komórkach nowotworowych nerwiaka zarodkowego (neuroblastoma). Nowotwór ten

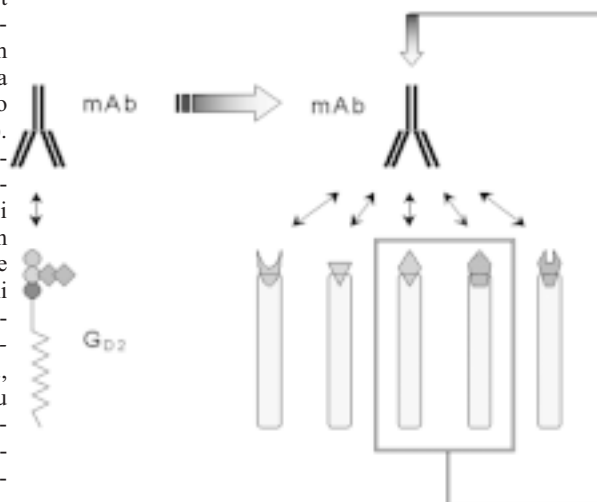


RYCINA 2. Schemat struktury gangliozydu G_{D2}

jest trzecim pod względem częstości występowania nowotworem dziecięcym, a stosowane metody jego terapii są często niewystarczające. Jedną z proponowanych w związku z tym strategii terapeutycznych jest immunoterapia skierowana przeciw gangliozydowi G_{D2} . Dotychczasowe wykorzystanie gangliozydu G_{D2} jako celu immunoterapii opierało się na podawaniu gotowych przeciwciał. Metoda ta ma swoje zalety, ale ma również szereg wad, w tym niską penetrację guza przez przeciwciała oraz stosunkowo krótki czas ich półtrwania w organizmie. Ponadto bierna immunoterapia jest z definicji ograniczona w czasie i nie prowadzi do powstania żadnej długotrwałej odporności. Wad tych pozbawiona jest immunoterapia czynna, a więc taka, która polega na wprowadzeniu do organizmu antygeny i wywołania naturalnej odpowiedzi na ten antygen. Skuteczna immunizacja antygenem wymaga jednak, aby miał on określone cechy biochemiczne warunkujące odpowiednio wysoką immunogenność. Do skutecznych immunogenów należą białka – gangliozydy są jednak antygenami glikolipidowymi o niskiej immunogenności, a nawet o cechach immunosupresyjnych. Charakter biochemiczny glikolipidów determinuje ich własności antygenowe i powoduje, że wiele z nich należy do grupy antygenów grasiczniezależnych, wywołujących odpowiedź humoralną bez pomocy limfocytów Th [14]. W efekcie glikolipidy indukują produkcję krótkotrwałych przeciwciał IgM i nie są w stanie wywołać wtórnej odpowiedzi ani pamięci immunologicznej. Ponadto problemy sprawia już samo oczyszczanie i synteza glikolipidów.

Z pomocą przychodzi tu technika *phage display* – dzięki zastosowaniu przeciwciał monoklonalnych przeciw gangliozydowi G_{D2} [16] możliwa staje się selekcja mimeotopów peptydowych imitujących strukturę przestrzenną epitopu gangliozydu (ryc. 3). Otrzymane sekwencje peptydów można następnie wykorzystać w immunoterapii spodziewając się, że wywołana odpowiedź obejmie również pierwotny antygen [21]. Immunizacja mimeotopami ma liczne zalety. Mimeotopy peptydowe są antygenami grasiczniezależnymi i indukują pełną, a więc humoralną i komórkową, odpowiedź organizmu.

RYCINA 3. Uproszczony schemat poszukiwania mimeotopów peptydowych metodą *phage display*. Pierwszym etapem jest wytworzenie przeciwciała monoklonalnego (mAb) specyficznego względem pierwotnego antygeny (G_{D2}). Następnie przeciwciała to jest wykorzystywane do przeszukiwania fagowych bibliotek peptydowych, czyli ogromnej puli peptydów o różnych sekwencjach (oznaczonych jako kolejne figury) występujących na powierzchni fagów nitkowatych. Następnie fagi niezwiązane są odpłukiwane (ang. *panning*), a pozostałe, po namnożeniu, przeznaczane są do kolejnego cyklu wiązania / odpłukiwania. Po kilku cyklach uzyskuje się pulę fagów o największym powinowactwie do przeciwciała monoklonalnego



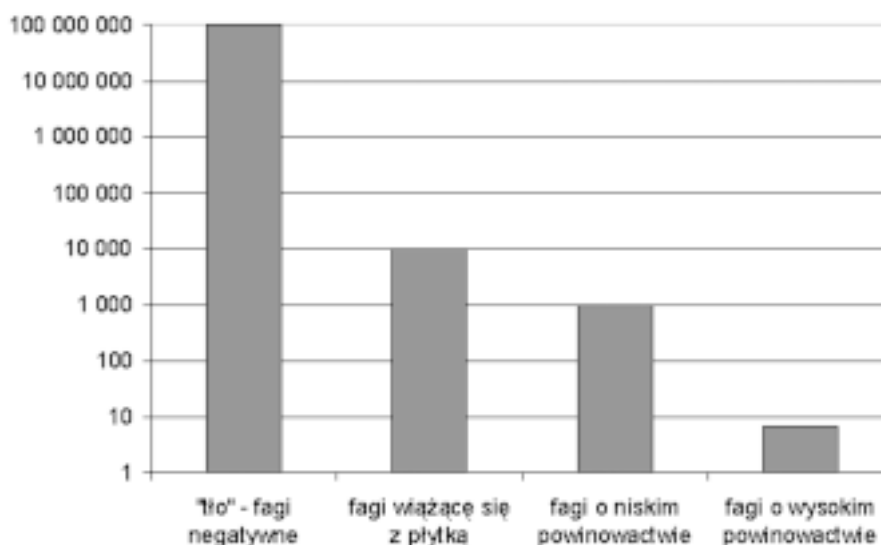


RYCINA 4. *Phage display* – schemat selekcji ligandów. Używane do selekcji przeciwciała 14G2a przeciw G_{D2} są immobilizowane na płytkach 96-studzienkowych. Następuje inkuwacja biblioteki, po czym wolne bakteriofagi są starannie odpłukiwane. Fagi związane na przeciwciałach wymywa się i infekuje *E. coli* szczepu K91. Namnożone fagi stanowią bibliotekę pośrednią używaną w kolejnych rundach selekcji

Ponadto są w stanie wywołać produkcję przeciwciał o wysokim powinowactwie do antygeny oraz wytworzyć pamięć immunologiczną. Peptydy są łatwe do otrzymania syntetycznie, również ich oczyszczanie można przeprowadzić w stosunkowo prosty sposób. Ich aminokwasowa struktura pozwala na skonstruowanie skutecznej szczepionki DNA zawierającej minigeny kodujące mimeotopy [9]. Dzięki tym cechom oraz łatwej modulacji odpowiedzi przez ingerencję w sekwencję amino kwasową immunizacja mimeotopami okazuje się skuteczna w przypadku infekcji wirusowych [19] oraz pasożytniczych [1]. Mimeotopy białek związanych z nowotworami również mogą znaleźć zastosowanie terapeutyczne [2].

W celu uzyskania mimeotopów peptydowych użytecznych w immunoterapii neuroblastoma nasz zespół posłużył się fagową biblioteką peptydową LX-8/f88-4 opartą na zrekombinowanym białku VIII (g8p) [4]. Prezentowane w niej peptydy składają się z 8 aminokwasów oflankowanych resztami cysteiny, dzięki czemu tworzy się zamknięta mostkiem dwusiarczkowym pętla. Złożoność biblioteki LX-8 wynosi $1,5 \times 10^9$ sekwencji. Szczegółowy opis zastosowanych procedur i metodyki oraz obszernie wprowadzenie w technologię *phage display* znajduje się w pracy Barbasa i in. [3]. Schematyczny przebieg przykładowej rundy selekcji przedstawiono na rycinie 4. Gospodarzem bakteriofagów, wykorzystywanym do ich namnażania, był szczep *Escherichia coli* K91. Dla wydajnej selekcji peptydów wymagane jest jak najpełniejsze usunięcie bakteriofagów wiążących się niespecyficznie do elementów układu, czyli do streptawidyny, polistyrenu i przeciwciał poza miejscem wiążącym antygen. Wynika to z proporcji klonów bakteriofagów wchodzących w skład biblioteki (ryc. 5). Po przeprowadzeniu sześciu kolejnych rund selekcji pojedyncze klony pozytywne były izolowane z puli fagów. Po otrzymaniu i namnożeniu ich jednoniciowe DNA było sekwencjonowane w obrębie zrekombinowanego regionu białka VIII. Jest to sposób na poznanie genotypu reprezentowanego przez wyselekcjonowany fenotyp i tym samym ustalenie sekwencji aminokwasów w prezentowanym peptydzie. W wyniku procedury przeszukiwania fagowej biblioteki peptydowej LX-8 przy pomocy przeciwciała 14G2a odnaleziono zostało 5 sekwencji peptydów. Dalszym etapem badań będzie ich analiza *in vitro* oraz ocena przydatności do immunoterapii na modelu mysim BALB/c.

Podsumowując, technologia *phage display* jest uniwersalnym sposobem poszukiwania ligandów dającym ogromne możliwości i wielość zastosowań. Jest przy tym



RYCINA 5. Pule fagów w bibliotece złożonej z 10^8 klonów. Przeważająca większość sekwencji obecnych na powierzchni bakteriofagów nie wykazuje powinowactwa do cząsteczki selekcyjnej. O kilka rzędów wielkości mniej jest tych, które wiążą się niespecyficycznie do elementów układu („wiążące się z płytką”). Klony stanowiące ostateczny cel selekcji powinowactwa są zatem prawdziwą „igłą w stogu siana”

metodą stosunkowo tanią, niewymagającą specjalnego wyposażenia czy zestawu kosztownych odczynników. *Panning* można przeprowadzać dla wielu ligandów selekcyjnych jednocześnie przy zastosowaniu mikroplutek polistyrenowych. Niestety, opisywana metoda nie jest pozbawiona wad: procedura selekcyjna opiera się na reprezentatywnej bibliotece początkowej, której skonstruowanie jest bardzo pracochłonne. Ponadto, biblioteki zawierają zwykle jedynie małą frakcję możliwych sekwencji, co wynika z astronomicznej liczby kombinacji występujących już dla peptydów o długości kilku czy kilkunastu aminokwasów. Kolejnym ograniczeniem jest wielkość cząsteczki prezentowanej na powierzchni kapsydu – zbyt duży ligand zmniejsza infekcyjność bakteriofagów, wpływa na ich namnażanie lub powoduje agregację. Pomimo tych wad wydaje się, że przeszukiwanie fagowych bibliotek peptydowych należy do najlepszych istniejących strategii poszukiwania ligandów dla cząsteczek biologicznych i jest szczególnie przydatne w badaniach zorientowanych na immunoterapię.

LITERATURA

- [1] ARNON R, TARRAB-HAZDAI R, STEWARD M. A mimotope peptide-based vaccine against *Schistosoma mansoni*: synthesis and characterization. *Immunology* 2000; **101**(4): 555–562.
- [2] ASHOK BT, DAVID L, CHEN YG, GARIKAPATY VP, CHANDER B, KANDUC D, MITTELMAN A, TIWARI RK. Peptide mimotopes of oncoproteins as therapeutic agents in breast cancer. *Int J Mol Med* 2003 Apr; **11**(4): 465–471.
- [3] BARBAS CF, BURTON DR, SCOTT JK, SILVERMAN GJ. Phage display – a laboratory manual. New York: Cold Springs Harbor Laboratory Press 2001.

- [4] BONNYCASTLE LL, MEHROKE JS, RASHED M, GONG X, SCOTT JK. Probing the basis of antibody reactivity with a panel of constrained peptide libraries displayed by filamentous phage. *J Mol Biol* 1996 May 24; **258**(5): 747–762.
- [5] CAIN SA, HIGGINBOTTOM A, MONK PN. Characterisation of C5a receptor agonists from phage display libraries. *Biochem Pharmacol* 2003; **66**(9): 1833–1840.
- [6] CUNTO-AMESTY G, DAM TK, LUO P, MONZAVI-KARBASSI B, BREWER CF, VAN COTT TC, KIEBER-EMMONS T. Directing the immune response to carbohydrate antigens. *J Biol Chem* 2001; **276**(32): 30490–30498.
- [7] FAMULOK M, MAYER G. Aptamers as tools in molecular biology and immunology. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; **243**: 123–136.
- [8] JAMES W. Nucleic acid and polypeptide aptamers: a powerful approach to ligand discovery. *Curr Opin Pharmacol* 2001; **1**(5): 540–546.
- [9] KIEBER-EMMONS T, MONZAVI-KARBASSI B, WANG B, LUO P, WEINER DB. Cutting edge: DNA immunization with minigenes of carbohydrate mimotopes induce functional anti-carbohydrate antibody response. *J Immunol* 2000; **165**(2): 623–627.
- [10] KURAKIN A, WU S, BREDESEN DE. Target-assisted iterative screening of phage surface display cDNA libraries. *Methods Mol Biol* 2004; **278**: 47–60.
- [11] LANDON LA, DEUTSCHER SL. Combinatorial discovery of tumor targeting peptides using phage display. *J Cell Biochem* 2003; **90**(3): 509–517.
- [12] LEE CV, SIDHU SS, FUH G. Bivalent antibody phage display mimics natural immunoglobulin. *J Immunol Methods* 2004; **284**(1–2): 119–132.
- [13] MELO FR, MELLO MO, FRANCO OL, RIGDEN DJ, MELLO LV, GENU AM, SILVA-FILHO MC, GLEDIE S, GROSSI-DE-SA MF. Use of phage display to select novel cystatins specific for *Acanthoscelides obtectus* cysteine proteinases. *Biochim Biophys Acta* 2003; **1651**(1–2): 146–152.
- [14] MOND JJ, VOS Q, LEES A, SNAPPER CM. T cell independent antigens. *Curr Opin Immunol* 1995; **7**(3): 349–354.
- [15] MUHLE C, SCHULZ-DROST S, KHRENOV AV, SAENKO EL, KLINGE J, SCHNEIDER H. Epitope mapping of polyclonal clotting factor VIII-inhibitory antibodies using phage display. *Thromb Haemost* 2004; **91**(3): 619–625.
- [16] MUJOO K, KIPPS TJ, YANG HM, CHERESH DA, WARGALLA U, SANDER DJ, REISFELD RA. Functional properties and effect on growth suppression of human neuroblastoma tumors by isotype switch variants of monoclonal antiganglioside GD2 antibody 14.18. *Cancer Res* 1989 Jun 1; **49**(11): 2857–2861.
- [17] OYAMA T, SYKES KF, SAMLI KN, MINNA JD, JOHNSTON SA, BROWN KC. Isolation of lung tumor specific peptides from a random peptide library: generation of diagnostic and cell-targeting reagents. *Cancer Lett* 2003; **202**(2): 219–230.
- [18] RHYNER C, WEICHEL M, FLUCKIGER S, HEMMANN S, KLEBER-JANKE T, CRAMERI R. Cloning allergens via phage display. *Methods* 2004; **32**(3): 212–218.
- [19] ROCCASECCA R, FOLGORI A, ERCOLE BB, PUNTORIERO G, LAHM A, ZUCHELLI S, TAFI R, PEZZANERA M, GALFRE G, TRAMONTANO A, MONDELLI MU, PESSI A, NICOSIA A, CORTESE R, MEOLA A. Induction of cross-reactive humoral immune response by immunization with mimotopes of the hypervariable region 1 of the hepatitis C virus. *Int Rev Immunol* 2001; **20**(2): 289–300.
- [20] WALL T, ROOS S, JACOBSSON K, ROSANDER A, JONSSON H. Phage display reveals 52 novel extracellular and transmembrane proteins from *Lactobacillus reuteri* DSM 20016(T). *Microbiology* 2003; **149**: 3493–3505.
- [21] YIP YL, WARD RL. Application of phage display technology to cancer research. *Curr Pharm Biotechnol* 2002; **3**(1): 29–43.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 06.11.2004 r.

Przyjęto: 22.12.2004 r.

ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków

email: dominik@mol.uj.edu.pl