



Charakterystyka wybranych inhibitorów immunologicznych punktów kontrolnych

Edyta Żyła

Praca doktorska została wykonana w Zakładzie Biochemii Komórki Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii oraz w Pracowni Krystalografii Białek Małopolskiego Centrum Biotechnologii,

Uniwersytet Jagielloński

Promotorzy:

prof. dr hab. Joanna Bereta

prof. dr hab. Grzegorz Dubin

Kraków 2023

Pragnę serdecznie podziękować

Prof. dr. hab. Joannie Berecie za opiekę merytoryczną, cenne uwagi i sugestie oraz życzliwość.

Dr hab. Grzegorzowi Dubinowi za opiekę merytoryczną,

nieocenioną pomoc i wsparcie, dzięki któremu możliwe było napisanie tej pracy.

Pracownikom, doktorantom i studentom Pracowni Krystalografii Białek MCB oraz Zakładu Biochemii Komórki WBBIB za życzliwość, koleżeńską pomoc, cenne dyskusje a przede wszystkim tworzenie wielu miłych wspomnień.

Wszystkim tym, których nie zdołałam tutaj wymienić, a którzy przyczynili się do powstania tej pracy.

Mojej Rodzinie za wsparcie.

Wprowadzenie

Wybrane wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej zostały opublikowane w pracy:

Zyla E, Musielak B, Holak TA, Dubin G. Structural Characterization of a Macrocyclic Peptide Modulator of the PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint Axis. *Molecules*. 2021 Aug 11;26(16):4848.

Część wyników przedstawionych w rozprawie doktorskiej stanowi tematykę przygotowywanych publikacji:

Malicki S, Pucelik B, Żyła E, Benedyk-Machaczka M, Gałan W, Golda A, Sochaj-Gregorczyk A, Kamińska M, Encarnação JC, Chruścicka B, Marti HP, Chen TJ, Magiera-Mularz K, Zięba B, Holak TA, Dąbrowski JM, Czarna A, Kozieł J, Mydel P, Dubin G. Imaging of Clear Cell Renal Carcinoma with Immune Checkpoint Targeting Aptamer-Based Probe.

Malicki S, Czarna A, Żyła E, Pucelnik B, Galan W, Chruścicka B, Kamińska M, Sochaj-Gregorczyk A, Magiera-Mularz K, Zięba B, Wang J, Benedyk-Machaczka M, Kozieł J, Dubin G, Mydel P. Development of selective ssDNA micro-probe for PD1 detection as a novel strategy for cancer imaging

Ponadto, wyniki badań przedstawione w rozprawie doktorskiej zaprezentowałam w formie następujących referatów ustnych i posterowych na międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych:

E. Żyła, G. Dubin. Structural characteristics of macrocyclic peptide as a potent modulator of PD-1/PD-L1 immune checkpoint axis. *Polonium 2021*. 7-8.05.2021. Zurych. Poster

E. Żyła, G. Dubin. Structural characteristics of macrocyclic peptide as a potent modulator of PD-1/PD-L1 immune checkpoint axis. Experimental Biology ASMBM 2021. 27-30 kwiecień 2021. Online. Poster.

E. Żyła, B. Pucelik, K. Rembacz, M. Kamińska, P. Mydel, S. Malicki, G. Dubin. Novel ssDNA aptamers against PD-1 and PD-L1 immune checkpoints as promising agents for cancer immunotherapy and theranostics. 2nd Summer School MCB „Structural biology”. 23-24.05.2019. Zakopane. Wystąpienie ustne.

E. Żyła, B. Pucelik, K. Rembacz, S. Malicki, G. Dubin. Novel immune checkpoint targeting molecules. The 44th FEBS Congress. 6-11.07.2019. Kraków. Poster.

E. Żyła, M. Wawro, J. Bereta. Flagellin mutant of *Salmonella* Typhimurium VNP20009 producing recombinant mouse PD-1 preserves the growth kinetics and mobility of the parental strain. 3rd International Conference on Tumor and Cancer Immunology and Immunotherapy. 17-18.09.2018, San Diego. Wystąpienie ustne. **I miejsce w konkursie na najlepszy poster.**

E. Żyła, J. Bereta. Otrzymanie genetycznie modyfikowanych bakterii szczepu *S. Typhimurium* VNP20009 zdolnych do sekrecji terapeutycznego białka PD-1 o potencjale przeciwnowotworowym. Konferencja Symbioza. 26-28.05.2017. Warszawa. Wystąpienie ustne. **I miejsce w głosowaniu publiczności na najlepsze wystąpienie publiczne.**

E. Żyła, J. Bereta. Delecja genu kodującego białko flageliny nie powoduje obniżenia ruchliwości terapeutycznych bakterii szczepu *Salmonella* Typhimurium VNP20009. Konferencja Genomica. 12-14.05.2017. Kraków. **II miejsce w konkursie na najlepsze wystąpienie publiczne.**

Źródła finansowania:

Badania nad charakterystyką makrocyclicznego peptydu p104 oraz charakterystyki przedstawionych w pracy aptamerów, które prowadzone były w ramach rozprawy doktorskiej zostały sfinansowane ze środków pochodzących z grantu OPUS 13 nr UMO-2017/25/B/NZ1/00827 (Narodowe Centrum Nauki) pt. „Charakterystyka strukturalna i funkcjonalna immunologicznych punktów kontrolnych”.

Badania nad wykorzystaniem systemu flagelinowego bakterii *S. Typhimurium* terapeutycznego szczepu VNP20009 oraz szczepu dzikiego LT2 do wydzielania białka HAC-V, które prowadzone były w ramach rozprawy doktorskiej zostały sfinansowane ze środków pochodzących z projektu o numerze K/DSC/004478 (środki przyznawane przez WBBiB UJ na działalność służącą rozwojowi młodych naukowców i uczestników studiów doktoranckich oraz w ramach środków z dotacji KNOW) pt. „Zastosowanie systemu flagelinowego bakterii *S. Typhimurium* do wydajnej sekrecji rozpuszczalnego i aktywnego biologicznie białka PD-1”, którego byłam beneficjentką.

Patenty:

Aptamer 2c2s poddany badaniom w ramach niniejszej pracy jest przedmiotem zgłoszenia patentowego o numerze P.441076 w UP RP (uprząd patentowy Rzeczypospolitej Polskiej) oraz międzynarodowego zgłoszenia patentowego o numerze PCT/PL2023/050030 dla wynalazku pod tytułem „Aptamer DNA wykazujący powinowactwo do białka PD-L1 i jego zastosowanie, funkcjonalny kompleks kowalencyjny oraz jego zastosowanie”

SPIS TREŚCI

WPROWADZENIE	1
SPIS TREŚCI.....	4
1. STRESZCZENIE	8
2. ABSTRACT	12
3. WYKAZ SKRÓTÓW	15
4. WSTĘP	17
4.1 ROZWÓJ NOWOTWORU I EFEKT IMMUNOEDYCJI	17
4.2 ROLA OSI PD-1/PD-L1 W ETAPIE UCIECZKI PODCZAS ROZWOJU NOWOTWORU	20
4.3 IMMUNOSUPRESYJNE ŚRODOWISKO NOWOTWORU	24
4.3.1 Współzawodnictwo komórek nowotworowych i komórek immunologicznych o glukozę	25
4.3.2 Rekrutacja komórek immunologicznych i ich funkcja w tkance nowotworowej.....	26
4.4 IMMUNOTERAPIA PRZECIWNOWOTWOROWA	31
4.5 STRATEGIE IMMUNOTERAPII PRZEDSTAWIONE W PRACY	33
4.6 WYKORZYSTANIE BAKTERII RODZAJU SALMONELLA W AKTYWNEJ IMMUNOTERAPII PRZECIWNOWOTWOROWEJ	34
4.7 ATENUOWANY SZCZEP BAKTERII <i>SALMONELLA</i> TYPHIMURIUM VNP20009 O POTENCJALE TERAPEUTYCZNYM.....	38
4.8 ZASTOSOWANIE APTAMERÓW OLIGONUKLEOTYDOWYCH W TERAPII I DIAGNOSTYCE	42
4.9 APTAMERY BLOKUJĄCE ODDZIAŁYWANIE PD-1/PD-L1	47
4.10 TERAPEUTYCZNE INHIBITORY PEPTYDOWE I MAKROCYKLICZNE PEPTYDY	50
4.12 MAKROCYKLIZACJA PEPTYDÓW	56
4.13 SUKCES MAKROCYKLICZNYCH PEPTYDÓW.....	58
4.14 MAKROCYKLICZNE PEPTYDY A ICH ZDOLNOŚĆ DO HAMOWANIA INTERAKCJI BIAŁKO-BIAŁKO62	
4.15 STOPIEŃ ZAAWANSOWANIA BADAŃ NAD MAKROCYKLICZNYMI PEPTYDAMI BMS HAMUJĄCYMI INTERAKCJĘ PD-1/PD-L1.....	63
5. CELE NAUKOWE	70

6. MATERIAŁY I METODY.....	71
6.1 MATERIAŁY	71
6.2 METODY	75
6.2.1 Hodowle komórkowe	75
6.2.2 Hodowle bakteryjne	76
6.2.3 Przygotowanie bakterii kompetentnych	76
6.2.4 Transformacja poszczególnych szczepów bakteryjnych.....	77
6.2.5 Konstrukcja kasety genowej Km ^R służącej do delecji genów <i>fliC</i> , <i>fljB</i> i <i>flgK</i> z genomu bakterii <i>S. Typhimurium</i> szczepów VNP20009 i LT2.....	77
6.2.6 Delecje fragmentów chromosomowego DNA w bakteriach <i>S. Typhimurium</i> szczepów VNP20009 i LT2.....	78
6.2.7 Analiza procesu delecji genów <i>fliC</i> , <i>fljB</i> i <i>flgK</i> metodą PCR z pojedynczych kolonii bakteryjnych uzyskanych w hodowli na podłożu stałym	80
6.2.8 Ocena żywotności bakterii i przygotowanie krzywej wzrostu <i>S. Typhimurium</i> szczepów VNP20009 i LT2.....	81
6.2.9 Analiza stopnia zakażenia komórek RAW264.7 bakteriami <i>S. Typhimurium</i> szczepów VNP20009 i LT2	82
6.2.10 Oznaczanie cytotoksycznego wpływu bakterii modyfikowanych szczepów <i>S. Typhimurium</i> VNP20009 i LT2 na komórki linii RAW264.7	83
6.2.11 Konstrukcja plazmidów rekombinowanych zawierających sekwencje sekrecyjnej w fuzji genetycznej z sekwencją genu kodującego białko HAC-V	84
6.2.12 Analiza sekrecji białek fuzyjnych przez system flagelinowy bakterii <i>S. Typhimurium</i>	86
6.2.13 Wyznaczenie EC50 badanych inhibitorów poprzez pomiar aktywności lucyferazy aktywowanej interakcją PD-L1 z PD-1 obecnym na powierzchni komórek Jurkat T	87
6.2.14 Badanie interakcji aptamerów z receptorem PD-L1 różnych linii komórkowych lub z receptorem PD-1 komórek Jurkat T PD-1 z użyciem cytometrii przepływowej	88
6.2.15 Testy in vitro cytotoksyczności stosowanych inhibitorów	89
6.2.16 Ekspresja i oczyszczanie białka PD-L1	89
6.2.17 Przygotowanie inhibitora p104	91
6.2.18 Badanie interakcji białka PD-L1 lub kompleksu PD-1/PD-L1 z p104	91
6.2.19 Krystalizacja kompleksu białka PD-L1 z inhibitorem p104 metodą kropli siedzącej	91
6.2.20 Analiza dyfrakcyjna otrzymanych kryształów białka	92
6.2.21 Rozdział elektroforetyczny białek	92
7. WYNIKI I WNIOSKI.....	94
7.1 ZASTOSOWANIE SYSTEMU FLAGELINOWEGO BAKTERII RODZAJU S. TYPHIMURIUM SZCZEPU VNP20009 JAKO UKŁADU TRANSPORTUJĄCEGO BIAŁKA FUZYJNE O POTENCJALNE TERAPEUTYCZNYM	94
7.2 DELECJA GENU FLIC Z CHROMOSOMU BAKTERYJNEGO S. TYPHIMURIUM VNP20009	95
7.3 WPŁYW DELECJI GENU FLIC NA ZMIANY FENOTYPU BAKTERII SZCZEPU S. TYPHIMURIUM VNP20009.....	98
7.9.1 Krzywa wzrostu bakterii szczepu <i>S. Typhimurium</i> VNP20009 z delecją genu <i>fliC</i>	99
7.9.2 Badanie żywotności bakterii szczepu <i>S. Typhimurium</i> VNP20009 z wprowadzoną delecją genu <i>fliC</i>	99

7.9.3	Badanie zdolności bakterii VNP20009 i VNP20009 $\Delta fliC$ do zakażenia i wywoływania śmierci komórkowej komórek linii monocytarno-makrofagowej RAW264.7	100
7.4	ANALIZA EKSPRESJI I SEKRECJI BIAŁEK FUZYJNYCH O POTENCJALE TERAPEUTYCZNYM Z WYKORZYSTANIEM SYSTEMU FLAGELINOWEGO BAKTERII SZCZEPU <i>S. TYPHIMURIUM</i> VNP20009 ORAZ VNP20009 $\Delta FLIC$	103
7.5	ZASTOSOWANIE SYSTEMU FLAGELINOWEGO BAKTERII SZCZEPU DZIKIEGO <i>S. TYPHIMURIUM</i> LT2 DO SEKRECJI FUZYJNYCH BIAŁEK	107
7.6	DELECCJE GENÓW SYSTEMU FLAGELINOWEGO W BAKTERIACH DZIKIEGO SZCZEPU <i>S. TYPHIMURIUM</i> LT2	107
7.7	WPŁYW DELECCJI GENU <i>FLIC</i> ORAZ PODWÓJNEJ DELECCJI GENÓW <i>FLIC</i> I <i>FLGK</i> NA ZMIANY FENOTYPU BAKTERII SZCZEPU <i>S. TYPHIMURIUM</i> LT2	111
7.8	ANALIZA EKSPRESJI I SEKRECJI BIAŁEK FUZYJNYCH O POTENCJALE TERAPEUTYCZNYM Z WYKORZYSTANIEM SYSTEMU FLAGELINOWEGO BAKTERII SZCZEPU <i>S. TYPHIMURIUM</i> LT2, LT2 $\Delta FLIC$ ORAZ LT2 $\Delta FLIC$ $\Delta FLGK$	116
7.9	CHARAKTERYSTYKA WYBRANYCH APTAMERÓW SKIEROWANYCH PRZECIWKO OSI PD-1/PD-L1	121
7.9.1	Wykorzystanie aptamerów oligonukleotydowych ssDNA do zahamowania aktywności osi PD-1/PD-L1	121
7.9.2	Charakterystyka aptameru ssDNA rozpoznającego domenę IgV ludzkiego białka PD-L1	121
7.9.3	Oznaczenie cytotoksyczności aptameru L2c2s względem komórek aAPC/CHO-K1 hPD-L1 w warunkach <i>in vitro</i>	122
7.9.4	Analiza zdolności wiązania aptameru L2c2s z PD-L1 w warunkach <i>in vitro</i>	123
7.9.5	Analiza hamowania interakcji białek kompleksu PD-1/PD-L1 przez aptamer L2c2s w warunkach <i>in vitro</i>	127
7.9.6	Charakterystyka aptamerów ssDNA rozpoznających domenę IgV ludzkiego białka PD-1	128
7.9.7	Oznaczenie cytotoksyczności aptameru P2c2s względem komórek Jurakt T PD-1 w warunkach <i>in vitro</i>	129
7.9.8	Analiza zdolności wiązania aptameru P2c2s z PD-1 w warunkach <i>in vitro</i>	130
7.9.9	Hamowanie interakcji białek kompleksu PD-1/PD-L1 przez aptamer P2c2s – w warunkach <i>in vitro</i>	132
7.9.10	Oznaczenie cytotoksyczności aptameru p34 względem komórek Jurkat T PD-1 w warunkach <i>in vitro</i>	134
7.9.11	Analiza zdolności wiązania aptameru p34 z PD-1 w warunkach <i>in vitro</i>	135
7.10	CHARAKTERYSTYKA BIOCHEMICZNA I STRUKTURALNA KOMPLEKSU BIAŁKA PD-L1 Z MAKROCYKLICZNYM PEPTYDEM P104	137
7.11	EKSPRESJA I OCZYSZCZANIE BIAŁKA PD-L1	138
7.12	BADANIE INTERAKCJI BIAŁKA PD-L1 Z MAKROCYKLICZNYM PEPTYDEM P104	140

7.13	KRYSTALIZACJA KOMPLEKSU BIAŁKA PD-L1 Z MAKROCYKLICZNYM PEPTYDEM P104	142
7.14	STRUKTURA KRYSTALICZNA BIAŁKA PD-L1 Z MAKROCYKLICZNYM PEPTYDEM P104	143
7.15	PORÓWNANIE MECHANIZMU WIĄZANIA PD-1 I MAKROCYKLICZNEGO PEPTYDU P104 DO PD-L1 152	
7.16	PORÓWNANIE MECHANIZMU WIĄZANIA MAKROCYKLICZNYCH PEPTYDÓW BMS III KLASY .	154
7.17	ZDOLNOŚĆ MAKROCYKLICZNEGO INHIBITORA P104 DO INHIBICJI ODDZIAŁYWANIA PD-1/PD-L1 W UKŁADZIE KOMÓRKOWYM	158
8.	DYSKUSJA.....	163
8.1	ZASTOSOWANIE SYSTEMU FLAGELINOWEGO BAKTERII S. TYPHIMURIUM JAKO UKŁADU TRANSPORTUJĄCEGO BIAŁKA FUZYJNE O POTENCJALNE TERAPEUTYCZNYM	163
8.2	CHARAKTERYSTYKA WYBRANYCH APTAMERÓW SKIEROWANYCH PRZECIWKO OSI PD-1/PD-L1 171	
8.3	CHARAKTERYSTYKA BIOCHEMICZNA I STRUKTURALNA MAKROCYKLICZNEGO PEPTYDU P104 BĘDĄCEGO ANTAGONISTĄ INTERAKCJI PD-1/PD-L1	179
9.	ZAŁĄCZNIKI	185
	LITERATURA	189

1. Streszczenie

Układ odpornościowy pełni funkcję ochrony organizmu przed pochodzącymi z zewnątrz patogenami, ale również przed własnymi komórkami, które wykazują nieprawidłowe cechy. Dlatego selektywne rozpoznawanie niepożądanych antygenów podlega ścisłej i wieloetapowej kontroli, co zapobiega wyindukowaniu autoimmunologicznej reakcji przeciwko prawidłowym komórkom organizmu. Niezależnie jednak od źródła aktywacji odpowiedzi immunologicznej musi ona ulegać wyciszeniu, w czym biorą udział cząsteczki negatywnie regulujące odpowiedź immunologiczną, do których należy m.in.: PD-1, obecny na powierzchni aktywnych limfocytów T i B, komórkach NK i makrofagach. Interakcja PD-1 ze swoim ligandem PD-L1, który ulega ekspresji na powierzchni komórek immunologicznych (limfocytów T i B, makrofagów, komórek dendrytycznych) oraz szeregu komórek niehematopoetycznych (jak np. komórki wysp trzustkowych, komórki śródbłonka naczyniowego, komórki nabłonkowe, hepatocyty) prowadzi do ograniczenia aktywacji limfocytów T cytotoksycznych i zahamowania ich proliferacji. Aktywacja osi PD-1/PD-L1 jest obserwowana także w wielu typach nowotworów, gdzie prowadzi do ukształtowania środowiska immunosupresyjnego, co sprzyja dalszemu rozwojowi guza. Ligand dla receptora PD-1 (PD-L1) występuje nie tylko na powierzchni komórek nowotworowych, ale również na powierzchni komórek immunologicznych rezydujących w tkance guza. Aktywacja układu immunologicznego przez stosowanie inhibitorów immunologicznych punktów kontrolnych, do których należy oś PD-1/PD-L1 i innych form immunoterapii jest jednym z ważniejszych osiągnięć onkologii w ostatnich latach. Immunoterapie mobilizują układ immunologiczny pacjenta, a prym w dziedzinie wiodą przeciwciała monoklonalne, zaś przeciwciała anti-PD-1 i anti-PD-L1 zrewolucjonizowały leczenie niektórych typów nowotworów. Jednak mimo niewątpliwego sukcesu, ingerencja w działanie punktów kontrolnych odpowiedzi immunologicznej za pomocą przeciwciał monoklonalnych posiada ograniczenia związane z farmakokinetyką oraz penetracją tkanki nowotworowej. Efekty te mogą obniżać skuteczność terapii, a także wiązać się z występowaniem różnych skutków ubocznych.

Niniejsza praca przedstawia trzy alternatywne strategie oparte o aktywne i pasywne mechanizmy immunoterapii przeciwnowotworowej skierowane przeciwko osi PD-1/PD-L1.

Pierwsza opisywana w pracy strategia opiera się na wykorzystaniu bakterii *Salmonella enterica* serotyp Typhimurium jako wektora do sekrecji białek fuzyjnych blokujących interakcję PD-L1 z PD-1. Strategia ta wykorzystuje zdolność bakterii *S. Typhimurium* do przemieszczania się do wnętrza tkanki guza w odpowiedzi na sygnały chemotaktyczne jakimi są hipoksja oraz uwolniona w wyniku nekrozy zawartość cytoplazmatyczna komórek nowotworowych. Akumulacja bakterii w tkance guza powinna wspomagać mobilizację układu immunologicznego oraz prowadzić do lokalnego wzrostu stężenia produkowanego przez nie terapeutycznego w guzie. Pojawiło się pytanie czy bakterie *S. Typhimurium* są zdolne do produkcji i wydzielania białka hamującego interakcję PD-1/PD-L1. Do tej pory w Zakładzie Biochemii Komórki podjęto próby uzyskania bakterii *S. Typhimurium* szczepu terapeutycznego VNP20009 zdolnego do wydzielania rozpuszczalnego PD-1 za pomocą systemu sekrecyjnego T3SS. Brak obiecujących wyników spowodował, że w swoich wcześniejszych pracach podjęłam próbę wykorzystania sygnału sekrecyjnego białka flageliny FlhC do sekrecji białka PD-1 z wykorzystaniem flagelinowego systemu F-T3SS. W związku z brakiem zadowalających rezultatów, w niniejszej pracy przedstawiłam alternatywne rozwiązanie, którego idea było wykorzystanie systemu flagelinowego bakterii *S. Typhimurium* terapeutycznego szczepu VNP20009 oraz szczepu dzikiego LT2 do wydzielania białka HAC-V, które stanowi zmodyfikowaną domenę PD-1 oddziałującą z PD-L1. Prace obejmowały wprowadzenie delecji wybranych genów kodujących białka systemu flagelinowego, co było konieczne, aby system mógł wydzielać białka rekombinowane. Następnie oceniono wpływ mutacji na żywotność bakterii i przebieg krzywej wzrostu hodowli jak również zdolność do zakażenia komórek gospodarza w modelu komórek linii monocytarno-makrofagowej, RAW264.7 i cytotoksyczny wpływ bakterii na badane komórki. Bakterie z wprowadzonymi delecjami, poddano transformacji z użyciem plazmidów kodujących białka fuzyjne. Każde białko fuzyjne składało się z domeny pochodzącej od jednego z białek FlgL, FlgD lub FlgM, dostarczającej sygnału sekrecyjnego systemu flagelinowego oraz białka HAC-V, wiążącego PD-L1. Analiza sekrecji białek fuzyjnych wykazała, że

spośród wszystkich testowanych szczepów dochodzi do sekrecji jedynie białka terapeutycznego FlgD-HAC-V w zmutowanych bakterjach szczepu LT2: LT2 $\Delta fliC\Delta flgK$. Wykorzystanie systemu flagelinowego do wydzielania białka HAC-V jest możliwe, jednak w przeprowadzonych badaniach ograniczone do szczepu dzikiego. Otrzymane wyniki mogą posłużyć do dalszej optymalizacji opracowanego układu.

Druga strategia obejmowała charakterystykę nowych aptamerów rozpoznających białka osi PD-1/PD-L1. Zanalizowano poziom wiązania aptamerów do białek PD-L1 i PD-1 na powierzchni wybranych komórek w badaniach *in vitro*. Zbadano także ich aktywność biologiczną jako inhibitorów kompleksu PD-1/PD-L1 i cytotoksyczność względem badanych komórek. Analiza cytofluorymetryczna wykazała, że aptamer L2c2s skierowany przeciwko PD-L1, wiąże się do powierzchni komórek aAPC/CHO-K1 z nadekspresją ludzkiego PD-L1 (hPD-L1) oraz do komórek linii ludzkich. Aptamer P2c2s i jego skrócona forma p34 rozpoznające PD-1 wiążą się z komórkami Jurkat T z nadekspresją PD-1. Usunięcie nukleotydów, które nie mają wkładu w specyficzne wiązanie PD-1, spowodowało niewielki wzrost poziomu wiązania aptameru do PD-1. Pomimo rozpoznawania przez testowane aptamery powierzchniowych PD-L1 i PD-1, aptamery nie powodowały efektu biologicznego hamowania tworzenia kompleksu PD-1/PD-L1 w układzie komórkowym. Dzięki temu, że aptamery nie wykazywały cytotoksyczności w stosunku do testowanych komórek zaproponowano ich alternatywne zastosowanie w diagnostyce i obrazowaniu.

Trzecią strategią hamowania osi PD-1/PD-L1, która została przedstawiona w pracy jest zastosowanie makrocyklicznych peptydów. Scharakteryzowano pod względem biochemicznym i strukturalnym peptyd p104 wiążący białko PD-L1. Makrocykliczne peptydy są obiecującą alternatywą dla przeciwciał monoklonalnych rozpoznających PD-L1. Peptyd p104 należy do, wciąż słabo zbadanej, klasy III makrocyklicznych peptydów otrzymanych przez firmę Bristol Myers Squibb (BMS). Makrocykliczne peptydy BMS klasy III charakteryzują się tym, że, w przeciwieństwie do klasy I i II, są zbudowane jedynie z aminokwasów białkowych. Oprócz scharakteryzowania peptydu p104, zbadano także hipotezę zakładającą, że dualistyczna natura interakcji z PD-L1, zaobserwowana wcześniej dla jedynego dotychczas scharakteryzowanego pokrewnego

peptydu p101, jest typową cechą wszystkich peptydów BMS klasy III. Utworzenie kompleksu PD-L1 z peptydem p104 zostało potwierdzone w analizie zmian przesunięć chemicznych sygnałów rezonansowych widm NMR, zaś potencjał peptydu p104 jako inhibitora kompleksu PD-1/PD-L1 przy jednoczesnym braku cytotoksyczności został potwierdzony w układzie komórkowym *in vitro*. Badania prowadzone w roztworze jak i w formie krystalicznej nie wykazały bifurkacji wiązania peptydu p104 przez PD-L1, co wskazuje, że cecha ta nie dotyczy wszystkich peptydów BMS klasy III. Analiza strukturalna ujawniła, że kompleks PD-L1/p104 jest utrzymywany głównie za pomocą sieci oddziaływań hydrofobowych, ale także elektrostatycznych w centralnej części domeny wiążącej białka PD-L1. Kompleks PD-L1/p104 jest stabilizowany poprzez interakcję π -siarka pomiędzy ${}_{PD-L1}Met115$ i ${}_{104}Phe3$, którą do tej pory odnotowano jedynie w kompleksie PD-L1 z peptydem p71 należącym do klasy II makrocyklicznych peptydów. Poznanie natury kompleksu PD-L1/p104 pozwoliło poszerzyć charakterystykę makrocyklicznych peptydów BMS klasy III, co może być pomocne w projektowaniu i optymalizacji kolejnych peptydów skierowanych przeciwko osi PD-1/PD-L1 o coraz lepszych właściwościach terapeutycznych.

2. Abstract

The immune system can defeat invading pathogens and abnormal cells in the organism. Therefore, the highly selective recognition of antigens must be strictly controlled in a multi-step process preventing the development of autoimmune reaction against healthy cells. Regardless of the source of activation, the immune response must be silenced at some point to prevent prolonged immune response. Immune checkpoint proteins, such as PD-1, which are present on the surface of T and B cells, NK cells, and macrophages act as a negative regulator of immune response. The interaction of PD-1 with its ligand PD-L1 inhibits T cell activation, proliferation, and cytotoxic functions leading to suppression of immune response. The PD-L1 receptor is found on the surface of not only tumour cells but also immune cells residing in the tumour site. Activation of the PD-1/PD-L1 axis leading to the development of an immunosuppressive environment that promotes further tumour growth is also widely observed in many types of tumours. Thus, immunotherapy focused on targeting immune checkpoints, including the PD-1/PD-L1 axis, is one of the most important achievements in oncology in recent years. Immunotherapies mobilize the patient's immune system for elimination of tumour cells, with the greatest contribution of monoclonal antibodies, and anti-PD-1 and anti-PD-L1 antibodies have revolutionised the treatment of certain types of cancer. However, there are some limitations in the use of therapeutic antibodies related to pharmacokinetics and insufficient tumour tissue penetration, which may sometimes weaken the response to the treatment. Thus, new generations of PD-1/PD-L1 axis inhibitors need to be developed.

This work presents three alternative strategies based on active and passive cancer immunotherapy mechanisms directed against the PD-1/PD-L1 axis.

The first strategy consists in the use of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium bacteria as a vector for secreted fusion proteins that block the PD-1/PD-L1 interaction. This strategy is based on the *S. Typhimurium* ability to reach the tumour tissue in response to chemotactic signals, e.g., the cell content released from necrotic tumour cells. The presence of bacteria producing a therapeutic agent increases its concentration locally in the tumour tissue and triggers the immune response in the

tumour site. Thus far, the Cellular Biochemistry Department research group has attempted to obtain the *S. Typhimurium* VNP20009 therapeutic strain with the ability to secrete soluble PD-1 using T3SS. However, the chosen experimental setup was unsuccessful. At that time, I proposed the use of the flagellar protein FliC secretion signal for secretion of PD-1 extracellular domain using F-T3SS in my previous work. Herein, I demonstrate an alternative idea of using the bacterial motion flagellar system for efficient secretion of the PD-1/PD-L1 inhibitory protein.

Due to the unsatisfactory results using FliC secretion signal, an alternative solution that utilizes the flagellar system of the *S. Typhimurium* VNP20009 therapeutic strain and the wild-type LT2 strain was developed to secrete HAC-V protein (modified PD-1 domain), which has potential to interact with PD-L1. To accomplish this, deletion of selected genes coding the flagellar system protein was performed. To estimate the effect of mutations on the VNP20009 and LT2 strains, the bacterial viability and growth curve as well as the infectiveness of the monocytic-macrophage RAW264.7 cell line were tested. Furthermore, plasmids encoding fusion protein sequences intended for secretion were introduced into mutant strains. Each fusion protein consists of a domain of FlgL, FlgD, or full-length FlgM protein providing a secretion signal for the flagellar system and HAC-V protein binding PD-L1. The analysis of the fusion protein secretion showed that, among all the LT2 strains, Δ fliC Δ flgK bacteria secreted the FlgD-HAC-V protein. The results presented in this thesis indicate that the use of the flagellar system to secrete fusion proteins inhibiting the PD-1/PD-L1 axis is feasible; however, it is limited to the wild-type LT2 strain. This result may be useful for further optimization of the presented system.

The second strategy presented in this thesis is based on activating the immune response against cancer cells using ssDNA aptamer molecules. This study involved the characterization of novel aptamers that recognize PD-1/PD-L1 complex proteins. The level of binding of the aptamers to cells presenting PD-1 or PD-L1 on the surface were analysed in *in vitro* studies. The biological activity of the aptamers as a potential inhibitor of the PD-1/PD-L1 axis and the cytotoxic effect of the aptamers on the tested cells were investigated. The study results indicated that the aptamer against PD-L1 (L2c2s) binds to the surface of aAPC/CHO-K1 cells overexpressing human PD-L1 (hPD-L1)

as well as to human cell lines. The P2c2s aptamer and its truncated form p34 (recognizing PD-1) bind specifically to the surface of the tested Jurkat T cells overexpressing PD-1. The aptamer truncation involving deletion of nucleotides that do not contribute to specific binding to PD-1 resulted in a slight increase in the aptamer binding to the PD-1 cell receptor. However, all the tested aptamers exerted no biological effect inhibiting the formation of the PD-1/PD-L1 complex in the cellular system. Therefore, since the aptamers did not exhibit cytotoxicity towards the tested cells, an alternative application for diagnostic and imaging purposes has been proposed.

The last strategy of PD-1/PD-L1 inhibition presented in this work is focused on the use of macrocyclic peptides. Macrocyclic peptide p104 binding PD-L1 was biochemically and structurally characterized. Macrocyclic peptides seem to be a promising alternative to monoclonal antibodies. The p104 peptide presented in this work belongs to the poorly characterized class III of macrocyclic peptides developed by Bristol Myers Squibb (BMS). In this group, macrocyclic peptides are exclusively composed of proteinogenic amino acids, whereas peptides of two previous classes (I and II) contain modified amino acids. This work investigates the hypothesis that the dualistic nature of the PD-L1 binding previously observed for p101 is a common feature for all macrocyclic peptides from class III of BMS. First, the PD-L1/p104 complex formation was confirmed by NMR analysis, whereas the ability of peptide p104 to inhibit the PD-1/PD-L1 complex was confirmed by an *in vitro* cell-based assay. Peptide p104 showed no cytotoxicity to the tested cells. Neither the solution nor the crystallographic studies confirmed the PD-L1/p104 bifurcation interaction, suggesting that the phenomenon of bifurcation interaction of peptides from class III with PD-L1 is not a characteristic feature of the whole group. The structural analysis revealed that p104 mostly interacted with PD-L1 via hydrophobic contacts, but some electrostatic interactions were also observed. Additionally, the π -sulphur interaction observed between _{PD-L1}Met115 and ₁₀₄Phe3 was found to support the macrocycle-receptor binding. Previously, this interaction was only observed during p71 peptide (class II) binding. The elucidation of the mechanism of PD-L1/p104 complex formation has expanded the characterisation of class III of BMS macrocyclic peptides. This study may be helpful in the future design and optimization of other peptides targeting the PD-1/PD-1 axis with increasingly improved therapeutic properties.

3. Wykaz skrótów

APC	Komórki prezentujące antygen (ang. <i>Antigen presenting cell</i>)
APC	Allofikocyjanina (białko fluorescencyjne)
CFU	Jednostka tworząca kolonię (ang. <i>Colony forming unit</i>)
DCs	Komórki dendrytyczne (ang. <i>Dendritic cells</i>)
DMSO	Dimetylosulfotlenek (ang. <i>Dimethyl sulfoxide</i>)
EC50	Stężenie powodujące połowę maksymalnej odpowiedzi biologicznej (ang. <i>Effective concentration</i>)
EDTA	Kwas etylenodiaminotetraoctowy (ang. <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
ELISA	Test immunoenzymosorpcyjny (ang. <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
FACS	Cytometria przepływowa (ang. <i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FBS	Płodowa surowica wołowa (ang. <i>Fetal bovine serum</i>)
FCS	Przedni detektor światła rozproszonego (ang. <i>Forward scatter channel</i>)
FDA	Agencja Żywności i Leków (ang. <i>Food and Drug Administration</i>)
FITC	Izotiocyjanian fluoresceiny
FlgD	Białko tworzące czapeczkę haka (ang. <i>Hook capping protein</i>)
FlgK	Białko łącznikowe proksymalnej części haka (ang. <i>Flagellar hook-associated protein 1</i>)
FlgL	Białko łącznikowe dystalnej części haka (ang. <i>Flagellar hook-associated protein 3</i>)
FlgM	Negatywny regulator syntezy flageliny (ang. <i>Negative regulator of flagellin synthesis</i>)
FliC	Flagela (ang. <i>Flagellin</i>)
F-T3SS	Flagelinowy system sekrecji typu trzeciego (ang. <i>Flagellin Type 3 Secretion System</i>)
GFP	Białko zielonej fluorescencji (ang. <i>Green fluorescent protein</i>)
HBSS	Zrównoważony roztwór soli Hanka (ang. <i>Hank's balanced salt solution</i>)
HRP	Peroksydaza chrzanowa (ang. <i>Horseradish peroxidase</i>)
HTRF	Pomiar czasoworozdzielczej fluorescencji (ang. <i>Homogeneous Time Resolved Fluorescence</i>)
IB	Ciałka inkluzyjne (ang. <i>Inclusion bodies</i>)
IC50	Stężenie powodujące zahamowanie wzrostu populacji komórek o 50% (ang. <i>Half-maximal inhibitory concentration</i>)
IFN	Interferon
IPTG	Izopropylo-1-tio-β-D-galaktopiranozyd
LB	Pożywka Luria-Bertani (ang. <i>Luria-Bretani Broth</i>)
LDH	Dehydrogenaza mleczanowa (ang. <i>Lactate dehydrogenase</i>)
MAMs	Makrofagi towarzyszące metastazie (ang. <i>Metastasis-associated macrophages</i>)
MDSC	Komórki supresorowe pochodzenia szpikowego (ang. <i>Myeloid-derived suppressor cells</i>)
MFI	Średnia intensywność fluorescencji (ang. <i>Mean fluorescence intensity</i>)
MHC	Główny układ zgodności tkankowej (ang. <i>Major histocompatibility complex</i>)
MOI	Liczba bakterii przypadających na jedną komórkę eukariotyczną (ang. <i>Multiplicity of infection</i>)

MRI	Magnetyczny rezonans jądrowy (ang. <i>Magnetic resonance imaging</i>)
MSB	Pożywka hodowlana MSB (ang. <i>Minimal salt broth</i>)
MTT	Bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)- 2,5-difenylotetrazoliowy
NFAT	Jądrowy czynnik aktywowanych komórek T (ang. <i>Nuclear factor of activated T cells</i>)
NK	Komórki NK (ang. <i>Natural killers</i>)
NLS	Sekwencja lokalizacji jądrowej (ang. <i>Nuclear localisation signal</i>)
OD	Gęstość optyczna (ang. <i>optical density</i>)
ori	Miejsce ori (początku replikacji) plazmidu (ang. <i>Origin of replication</i>)
PAGE	Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym (ang. <i>Poliacrylamide gel electrophoresis</i>)
PBS	Roztwór soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (ang. <i>Phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Reakcja łańcuchowa polimerazy DNA (ang. <i>Polymerase chain reaction</i>)
PD-1	Białko programowanej śmierci komórki 1 (ang. <i>Programmed death 1</i>)
PD-L1/ PD-L2	Ligand białka programowanej śmierci komórki 1/2 (ang. <i>Programmed death ligand 1/2</i>)
PET	Pozytonowa tomografia emisyjna (ang. <i>Positron emission tomography</i>)
PPI	Oddziaływania oparte o interakcję białko-białko (ang. <i>Protein-protein interaction</i>)
pz	Pary zasad DNA
rpm	Liczba obrotów na minutę (ang. <i>Revolutions per minute</i>)
RT	Temperatura pokojowa (ang. <i>Room temperature</i>)
SCV	Wakuola zawierająca bakterie <i>Salmonella</i> (ang. <i>Salmonella-containing vacuole</i>)
SDS	Dodecylosiarczan sodu (ang. <i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
SELEX	Systematyczna ewolucja ligandów w technologii wzbogacenia wykładniczego (ang. <i>Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment</i>)
SPI	Salmonellowa wyspa patogenności (ang. <i>Salmonella pathogenicity island</i>)
SPR	Powierzchniowy rezonans plazmonowy (ang. <i>Surface plasmon resonance</i>)
SSC	Boczny detektor światła rozproszonego (ang. <i>Side scatter channel</i>)
T3SS	System sekrecji typu trzeciego (ang. <i>Type 3 Secretion System</i>)
TAA	Antygeny związane z nowotworem (ang. <i>Tumor associated-antigen</i>)
TAM	Makrofagi związane z nowotworem (ang. <i>Tumor-associated macrophages</i>)
TCR	Receptor limfocyty T (ang. <i>T-cell receptor</i>)
TGF	Transformujący czynnik wzrostu (ang. <i>Transforming growth factor</i>)
Tregs	Limfocyty T regulatorowe
TSA	Antygeny specyficzne nowotworowo (ang. <i>Tumor-specific antigens</i>)
v/v	Stosunek objętościowy (ang. <i>volume to volume</i>)

4. Wstęp

4.1 Rozwój nowotworu i efekt immunoedycji

Hipoteza nadzoru immunologicznego (ang. *Immunosurveillance*) została zaproponowana blisko 70 lat temu przez Burneta i Thomasa, którzy zasugerowali, że układ odpornościowy rozpoznaje nowotwory we wczesnych jego stadiach poprzez rozpoznanie neoantygenów na powierzchni komórek nowotworowych, po czym je eliminuje [1], [2]. Przez kolejne lata prowadzono badania nad nowotworzeniem i podejmowano próby weryfikacji hipotezy nadzoru immunologicznego, co ostatecznie doprowadziło do sformułowania hipotezy immunoedycji nowotworów (ang. *Immunoediting*), tj. zależności pomiędzy rozwijającymi się nowotworami a komórkami układu immunologicznego [3], [4]. Immunoedycja nowotworu jest dynamicznym procesem, będącym konsekwencją immunoselekcji komórek nowotworowych uwarunkowanej głównie aktywnością limfocytów T, podczas której układ immunologiczny z jednej strony chroni organizm przed rozwojem nowotworu, a z drugiej selektywnie kształtuje postępującą transformację nowotworową i przez to wpływa na charakter powstającego nowotworu. Wywieranie tak sprzecznych efektów jest wynikiem zmian zachodzących w czasie rozwoju nowotworu, a relacje między nowotworem a układem odpornościowym zwyczajowo dzieli się na trzy fazy: eliminacji, równowagi i ucieczki [3]–[5], których przebieg ma znaczenie dla przedstawionych w rozprawie metod immunoterapii.

Eliminacja

Eliminacja, będąca pierwszą fazą immunoedycji nowotworu jest wynikiem procesu określanego niegdyś jako nadzór immunologiczny. Podczas fazy eliminacji komórki odpowiedzi wrodzonej, w tym komórki NK, makrofagi i komórki dendrytyczne (DCs) oraz odpowiedzi nabytej (limfocyty T CD4⁺, T CD8⁺ i NKT) współdziałając ze sobą rozpoznają stransformowane komórki i uczestniczą w rozwoju odpowiedzi immunologicznej, która mogłaby je wyeliminować zanim dojdzie do wykształcenia nowotworu wywołującego objawy kliniczne. Badania na myszach wskazują, że aby doszło do wywołania przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej na wczesnym etapie rozwoju nowotworu niezbędna jest obecność limfocytów T cytotoksycznych specyficznie

rozpoznających antygeny nowotworowe. Faza eliminacji kończy się wówczas, gdy pojawiają się komórki nowotworowe zdolne do przetrwania przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej lub alternatywnie gdy wszystkie komórki nowotworowe zostaną zniszczone [3], [5].

Równowaga

Jeśli układ odpornościowy nie jest wystarczająco skuteczny w zwalczaniu komórek nowotworowych pozostają one w stanie dynamicznej równowagi z komórkami odpornościowymi. Na tym etapie rozwój nowotworu przebiega w formie utajonej. Dochodzi do wykształcania pierwszych mechanizmów adaptacyjnych przez komórki nowotworowe w odpowiedzi na presję wywieraną przez aktywność komórek immunologicznych (opisano w dalszej części pracy). Początkowo etap równowagi był obserwowany jedynie pośrednio u pacjentów z wyindukowaną immunosupresją po przebytej transplantacji organów, u których zaobserwowano rozwój nowotworów, co było związane z przeniesieniem komórek nowotworowych od dawcy narządu [6]–[8]. Badania na modelu mysim, prowadzone przez Koebela i wsp. pozwoliły lepiej zrozumieć te obserwacje kliniczne. Koebel i wsp. wykazali, że podczas etapu równowagi komórki przebyły już transformację nowotworową, jednak słabo proliferują [5]. Autorzy pracy wskazują, że o ile etap eliminacji wymaga zarówno komórek odporności wrodzonej jak i nabytej, o tyle etap równowagi jest utrzymywany wyłącznie przez komórki nabytej odporności immunologicznej [5], [9]. Ponadto, wykazano, że obecność limfocytów T podczas etapu równowagi przyczynia się do immunoedycji komórek nowotworowych, prowadząc do ich obniżonej immunogenności [5].

Etapy eliminacji i równowagi w procesie nowotworzenia nie skutkują pojawieniem się objawów klinicznych, przez co w dalszym ciągu nie są dobrze przebadane w organizmie ludzkim [4]–[6], [10]–[14].

Ucieczka

Interakcja pomiędzy heterogenną populacją komórek nowotworowych ulegających ciągłym, stochastycznym modyfikacjom genetycznym i epigenetycznym a komórkami układu odpornościowego oraz stała presja ze strony tego układu doprowadzają do

selekcji i przetrwania mniej immunogennych komórek nowotworowych. Podczas gdy etapy eliminacji i równowagi przybierają formę utajoną, to etap ucieczki nowotworu i jego niekontrolowana proliferacja mają przebieg znacznie bardziej dramatyczny w skutkach.

Zjawisko ucieczki nowotworu zachodzi poprzez tzw. strategie pasywne (ograniczenie rozpoznawalności komórek nowotworowych przez układ odpornościowy) oraz strategie aktywne (pojawienie się mechanizmów zapobiegających wykształceniu przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej i zapobiegających apoptozie). Uruchomienie tych strategii następuje równolegle i stanowi jedną z cech wspólnych wszystkich nowotworów (ang. *hallmark of cancer*) [15].

W zależności od przebiegu procesu immunoedycji, nowotwór może przybierać bardziej lub mniej immunogenną formę. Częste mutacje w genomie komórek nowotworowych oraz transformacja nowotworowa na skutek zakażenia wirusami onkogennymi mogą prowadzić do powstania silnie immunogennych antygenów nowotworowych (neoantygenów) TSA (antygeny swoiste nowotworów; ang. *Tumor Specific Antigens*). Natomiast TAA (antygeny towarzyszące nowotworom; ang. *Tumor Associated Antigens*) mogą ulegać nadekspresji na powierzchni komórek niektórych typów nowotworów, podczas gdy w komórkach normalnych ich poziom ekspresji jest znikomy (o ile w ogóle jest) [16]. Obecność TSA czy TAA na powierzchni komórek nowotworowych może prowadzić do aktywacji limfocytów T. Stąd jedną z pierwszych pasywnych strategii ucieczki komórek nowotworowych jest obniżenie ekspresji neoantygenów poprzez m.in.: redukcję liczby kopii genów obecnych w genomie czy epigenetyczne wyciszenie na drodze hipermetylacji promotorów. Redukcja obecności najbardziej immunogennych białek powierzchniowych polega na subklonalnej eliminacji komórek nowotworowych przez komórki odpornościowe oraz przeżyciu i ucieczce spod kontroli układu odpornościowego tych komórek, które posiadają niski poziom antygenów nowotworowych [17]–[19].

W tym miejscu należy dodać, że aby doszło do odpowiedzi immunologicznej nie wystarczy ekspresja antygenów nowotworowych. Niezbędna jest także ich prezentacja komórkom T w postaci peptydów eksponowanych w kontekście antygenów układu

zgodności tkankowej. Powszechnym procesem fazy ucieczki w wielu typach nowotworów jest redukcja poziomu białek powierzchniowego kompleksu MHC I (ang. *Major Histocompatibility Complex*) odpowiadającego za prezentację antygenów nowotworowych limfocytom CD8⁺ [19]–[21] lub obniżenie ekspresji białek TAP1 lub TAP2 odpowiadających za transport peptydów antygenowych generowanych w cytozolu przez immunoproteasom do retikulum endoplazmatycznego. W obu przypadkach prezentacja antygenów w kontekście MHC I ulega zahamowaniu [22]–[24].

Niekiedy obniżenie immunogenności guza zachodzi z jednoczesnym zachowaniem antygenów nowotworowych. Obecność immunogennych antygenów jest obserwowana w nowotworach wykształcających aktywne formy ucieczki, które skutecznie inaktywują przeciwnowotworową odpowiedź immunologiczną przy jednoczesnym zachowaniu immunogenności. Na podstawie analizy wielu różnych typów nowotworów, które mimo prezentacji peptydów pochodzących z TSA lub TAA nie indukują odpowiedzi immunologicznej, stwierdzono, że choć istnieje wiele mechanizmów tzw. „ucieczki”, mających wpływ na rozwój nowotworu, to aktywacja ścieżki PD-1/PD-L1 odgrywa w tym procesie rolę kluczową [25]–[29].

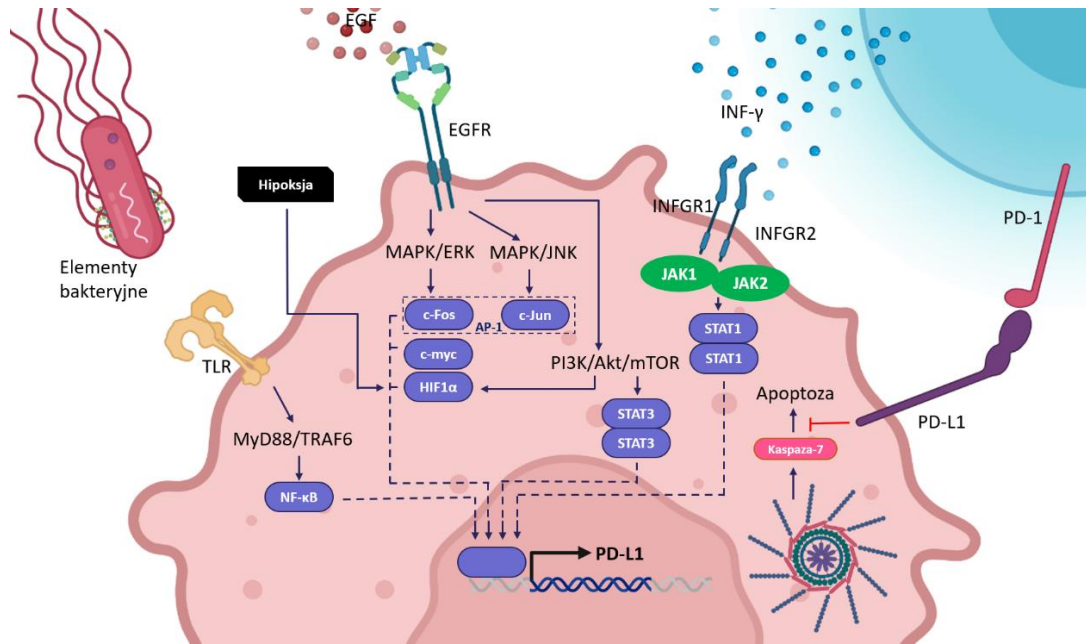
4.2 Rola osi PD-1/PD-L1 w etapie ucieczki podczas rozwoju nowotworu

Oś PD-1/PD-L1 pełni funkcję negatywnego regulatora swoistej odpowiedzi immunologicznej. Białko programowanej śmierci komórki, PD-1, (ang. *Programmed cell death protein 1*) ulega ekspresji głównie na powierzchni zaktywowanych limfocytów T i B, makrofagów i komórek NK (ang. *natural killer*) czy komórek dendrytycznych DCs (ang. *Dendritic Cells*) [30], [31]. Białko PD-1 ulega też konstytutywnej ekspresji w niedojrzałych tymocytach (CD4⁻ CD8⁻), które nie przeszły jeszcze selekcji negatywnej i pozytywnej w grasicy [32], [33]. Białko PD-1 oddziałuje z ligandem PD-L1, którego ekspresja zachodzi w sposób konstytutywny w limfocytach T i B, komórkach DCs, makrofagach oraz komórkach niehematopoetycznych, takich jak mezenchymalne komórki macierzyste, komórki nabłonka czy śródbłonka. Białko PD-1 wiąże jeszcze jeden ligand – PD-L2, który występuje rzadziej niż PD-L1 i ulega ekspresji na powierzchni zaktywowanych komórek dendrytycznych oraz makrofagów [30], [33]. Obecność liganda PD-L1 na powierzchni m.in.: komórek zdrowych tkanek, prowadzi do wyciszenia

odpowiedzi immunologicznej generowanej w wyniku aktywacji TCR (ang. *T-cell receptor*) i cząsteczki kostymulatorowej CD28. Interakcja PD-1/PD-L1 pełni kilka istotnych funkcji w organizmie. Przede wszystkim odpowiada za podtrzymanie tolerancji obwodowej względem własnych antygenów i zabezpiecza przed aktywacją autoreaktywnych limfocytów T, które w sposób niekontrolowany przedostały się do obwodowych narządów immunologicznych [33]. Tym samym oddziaływanie PD-1/PD-L1 zapobiega przed rozwojem chorób autoimmunologicznych. Interakcja PD-1/PD-L1 pełni również ważną rolę w warunkach przedłużających się infekcji bakteryjnych czy wirusowych i skutkuje odwracalnym osłabieniem funkcji efektorowych limfocytów T czyli tzw. efektem wyczerpania limfocytów T [33], [34]. Do wyczerpania limfocytów T dochodzi podczas długotrwałej ekspozycji układu immunologicznego na stymulację antygenami, która prowadzi do przedłużającej się aktywacji limfocytów T, a tym samym do wysokiej ekspresji receptora PD-1. W wyniku interakcji PD-1/PD-L1 dochodzi do zahamowania proliferacji i aktywności limfocytów CD4⁺ i limfocytów CD8⁺. W początkowych stadiach wyczerpania dochodzi do utraty zdolności do produkcji IL-2 i zahamowania proliferacji, a w dalszych etapach następuje utrata zdolności produkcji INF- γ czy TNF- α a także granzymu B przez limfocyty T [34]–[36]. W konsekwencji wyczerpania limfocytów dochodzi do sytuacji, w której odpowiedź immunologiczna jest wyciszana pomimo obecności antygeny [34]. Mechanizm wyczerpania limfocytów T zabezpiecza organizm przed nadreaktywnością układu immunologicznego prowadzącą do uszkodzenia tkanek organizmu [37]. Jednak osłabienie funkcji efektorowych limfocytów T pełni również istotną rolę w tworzeniu immunosupresyjnego środowiska w stanach patologicznych i jest obserwowane np. w miejscu powstawania guza [38], [39].

Napływ TSA- lub TAA-specyficznych limfocytów T do guza generuje immunoedycję komórek nowotworowych poprzez m.in.: indukcję białek kontrolujących odpowiedź immunologiczną. W szczególności pod wpływem IFN- γ produkowanego przez cytotoksyczne limfocyty T dochodzi do stymulacji ekspresji białka PD-L1 lub PD-L2 na powierzchni komórek nowotworowych [30], [40]. W tym miejscu warto nadmienić, że pojedynczy typ receptora dla IFN- γ występuje na powierzchni prawie wszystkich komórek, ale do wykształcenia funkcjonalnego receptora niezbędna jest obecność

dimeru IFNGR1 oraz dimeru IFNGR2, których dystrybucja zależy od typu komórek oraz tkanek [41]–[47]. Dimer IFN- γ wiążąc podwójny dimer IFNGR1/IFNGR2 na powierzchni komórki nowotworowej, prowadzi do fosforylacji JAK1 i JAK2, a następnie fosforylacji STAT1. Dimery STAT1 działają jako czynnik transkrypcyjny aktywujący promotor genu *IRF1*. Białko IRF-1 jest z kolei czynnikiem transkrypcyjnym odpowiedzialnym m.in. za aktywację promotora genu *CD274* kodującego białko PD-L1, a także w mniejszym stopniu promotora genu *CD273* kodującego białko PD-L2 (Rysunek 1) [48], [49]. Białka PD-L1 i PD-L2 oddziałują z receptorem PD-1 aktywnych limfocytów T prowadząc do ich inaktywacji i w efekcie do zahamowania przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej [30], [40]. Aktywacja promotorów genów *CD274* i *CD273* może zachodzić również w wyniku stymulacji receptorów czynników wzrostu np.: czynnika wzrostu EGF (ang. *Epidermal growth factor*) [50]. Receptor EGFR wiążąc EGF uruchamia szlaki przekazywania sygnału MAPK/ERK, MAPK/JNK czy PI3K/Akt/mTOR [51] Aktywacja wymienionych szlaków przekazu sygnału prowadzi do ekspresji czynników transkrypcyjnych stymulujących promotor genu *CD274*: HIF1 α , c-myc, a także c-Fos i c-Jun [52]–[54]. Białko c-Fos oddziałując z c-Jun tworzy kompleks AP-1, który również aktywuje ekspresję genu *CD274* [55], [56]. Kolejną ścieżką aktywacji promotora *CD274* jest przekaz sygnału od receptorów TLR ścieżką MyDD88/TRAF6 (Rysunek 1), aktywowanych przez elementy bakteryjne. Sygnał prowadzi do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, który oddziałuje z promotorem *CD274*. Ostatecznie produkcja PD-L1 czy PD-L2 na powierzchni komórek nowotworowych może zachodzić na skutek pojawienia się mutacji w obrębie promotorów, prowadzących do konstytutywnej ekspresji [57]–[59].



Rysunek 1. Schemat wybranych ścieżek przekazu sygnału w komórce nowotworowej zaangażowane w aktywację ekspresji białka PD-L1. Kolorem fioletowym oznaczono czynniki transkrypcyjne uczestniczące w regulacji ekspresji genu kodującego białko PD-L1. Dodatkowo, na schemacie zaznaczono zaangażowanie PD-L1 w zahamowania szlaku apoptozy. Rysunek utworzony przy użyciu Biorender.com na podstawie literatury [30], [50]–[56], [58], [60]–[64].

Ekspresja białka PD-L1 w odpowiedzi na stymulację może bezpośrednio hamować szlak apoptozy komórek nowotworowych, niezależnie od interakcji PD-L1 z powierzchniowym PD-1 limfocytów T. Obecność krótkiego białkowego motywu RMLDVEKC w wewnątrzkomórkowej domenie PD-L1, o aktywności niekanonicznego regulatora transdukcji sygnału, hamuje ścieżkę aktywacji wykonawczej kaspazy-7 szlaku apoptozy (Rysunek 1) [64]. Najnowsze badania pokazują, że PD-L1 może być kierowany do jądra komórkowego [65]. Mechanizm odpowiedzialny za ten transport nie został dotychczas poznany, jednak w sekwencji PD-L1 brak klasycznego motywu lokalizacji jądrowej NLS (ang. *Nuclear localisation signal*). Możliwe, że PD-L1 ulega translokacji do jądra w kompleksie z innymi białkami. Potwierdzono, że acetylacja lizyny K263 domeny cytozolowej białka PD-L1 jest niezbędna do interakcji z szeregiem białek zaangażowanych w zarówno endocytozę oraz import białek do jądra komórkowego. Jądrowy PD-L1 może z kolei pełnić rolę czynnika transkrypcyjnego i wpływać na regulację ekspresji genów związanych z odpowiedzią immunologiczną a także podtrzymywać proliferację komórek nowotworowych na drodze niezależnej od interakcji z PD-1 [65],

[66]. Jednak w tym miejscu należy dodać, że niektóre zespoły badawcze podają w wątpliwość jądrową lokalizację PD-L1 [67].

Stwierdzono, że w typach nowotworów, w których występuje niski poziom sororiny (stabilizator kohezyny), jądrowy PD-L1 może przejąć jej funkcję promując tworzenie pierścienia kohezyny odpowiedzialnej za utrzymywanie chromatyd siostrzanych przed rozpoczęciem profazy mitotycznej, co chroni komórki nowotworowe przed śmiercią [68], [69]. Ostatecznie jednak interakcja PD-L1 z PD-1 jest uznawana za najistotniejszy element mechanizmu pozwalającego na ucieczkę przed eliminacją guza głównie przez inaktywację limfocytów T cytotoksycznych oraz indukcję różnicowania tzw. naiwnych limfocytów T CD4⁺ oraz Th1 do limfocytów T regulatorowych pełniących funkcje supresorowe, co bezpośrednio przekłada się na rozwinięcie w pełni immunosupresyjnego środowiska nowotworowego [70]–[72].

4.3 Immunosupresyjne środowisko nowotworu

Komórki nowotworowe podlegają presji selekcyjnej w swoim najbliższym środowisku, w wyniku zmian takich jak m.in.: zmiany pH czy dostępność składników odżywczych, ale także presji ze strony układu immunologicznego [73]. W wyniku tej presji, niektóre z rosnącej liczby mutacji genetycznych i zmian epigenetycznych komórek nowotworowych, zostają utrwalone. Podczas tego złożonego procesu dochodzi do kształtowania trajektorii ewolucji guza i tworzenia odrębnych subpopulacji linii klonalnych komórek nowotworowych, co w konsekwencji doprowadza do heterogenności guza. W procesie ewolucji nowotworu dochodzi do wyselekcjonowania komórek nowotworowych najbardziej odpornych na działanie układu immunologicznego, które tworzą środowisko immunosupresyjne guza. W konsekwencji w wyniku działania wielu różnych presji na komórki nowotworowe, ich fenotyp może przejawiać się w różny sposób, m.in.: poprzez obniżoną prezentację antygenów czy ekspresję białek negatywnie regulujących odpowiedź immunologiczną np. PD-L1 [73]–[75].

Indukowana przez nowotwór immunosupresja opiera się na trzech głównych procesach: współzawodnictwa o dostępne związki odżywcze, ekspresji immunosupresyjnych cząsteczek na powierzchni komórek nowotworowych oraz

rekrutacji i akumulowaniu komórek układu immunologicznego, które w tkance guza hamują przeciwnowotworową odpowiedź immunologiczną. Zjawiska te ostatecznie prowadzą do znaczącego obniżenia antynowotworowej odpowiedzi immunologicznej [15]. Oś PD-1/PD-L1 wywiera wpływ na każdy z tych elementów.

4.3.1 Współzawodnictwo komórek nowotworowych i komórek immunologicznych o glukozę

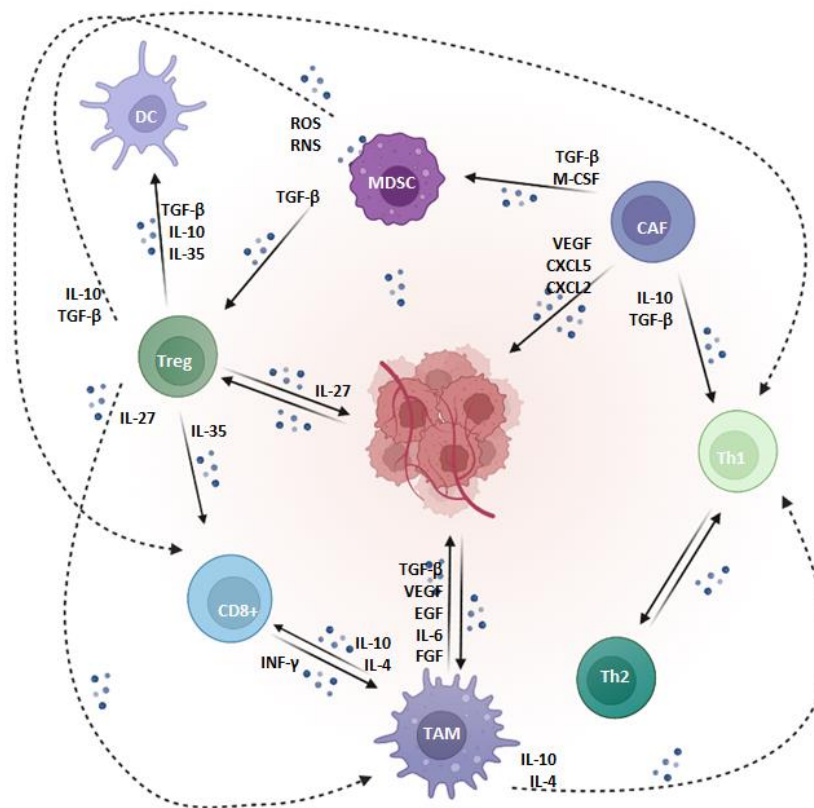
Wzrost liczby komórek nowotworowych, jaki ma miejsce podczas rozwoju guza wpływa bezpośrednio na indukcję immunosupresji. Szybka proliferacja komórek nowotworu wraz z niedostatecznym powstawaniem naczyń krwionośnych generuje różnice stężenia tlenu w tkance guza [76], [77]. Podczas hipoksji dochodzi do aktywacji czynnika transkrypcyjnego HIF-1 α , który indukuje transkrypcję genów białek transporterów glukozy i enzymów glikolizy. Intensywny metabolizm komórek nowotworowych lokalnie prowadzi do szybkiego zużycia substancji odżywczych takich jak glukoza. Czynniki transkrypcyjne HIF-1 α aktywuje także transkrypcję genu kodującego białko PD-L1 w komórkach nowotworowych. Chang i wsp. zauważyli, że na szybkość metabolizmu glukozy może dodatkowo mieć wpływ obecność błonowego PD-L1 komórek nowotworowych. Zauważono, że ekspresja PD-L1 zwiększa konsumpcję glukozy na drodze aktywacji ścieżki Akt/mTOR, co skutkuje stymulacją glikolizy [78]. W tym miejscu warto dodać, że w komórkach nowotworowych dochodzi do tzw. efektu Warburga, którego efektem jest wytwarzanie mleczanu z glukozy w warunkach dostępności tlenu [77], [79]. Rosnący poziom mleczanu w tkance guza wpływa na zakwaszenie środowiska. Kwon i wsp. zauważyli, że rosnące zakwaszenie środowiska tkanki guza zwiększa poziom powierzchniowego PD-L1 na komórkach potrójnie ujemnego raka piersi [80]. Intensywny metabolizm glukozy przez komórki nowotworowe doprowadza również do jej znacznego ubytku w lokalnym środowisku, co pośrednio hamuje aktywność limfocytów T. Testy *in vitro* pokazały, że limfocyty T są wrażliwe na ubytek glukozy w środowisku, co przejawia się znacznym obniżeniem poziomu produkcji IFN- γ [78], [81].

4.3.2 Rekrutacja komórek immunologicznych i ich funkcja w tkance nowotworowej

Podczas etapu eliminacji zarówno komórki odpowiedzi wrodzonej jak i nabytej układu immunologicznego wspólnie wykrywają i niszczą komórki na wczesnych stadiach nowotworzenia [82], [83]. Za nadzór immunologiczny odpowiadają m.in. komórki NK, które wywołują śmierć komórek nowotworowych np.: na drodze zależnej od przeciwciał rozpoznających antygeny nowotworowe wykorzystującej perforyny i granzym (mechanizm ADCC, ang. *antibody-dependent cellular cytotoxicity*) czynna drodze zależnej od ligandów TRAIL i FASL [84]. Ponadto w miejscu powstawania guza pojawiają się komórki APC, czyli komórki prezentujące antygen [85]. Komórki APC fagocytują i przetwarzają antygeny nowotworowe, które są następnie prezentowane w formie peptydów w kontekście kompleksu MHC limfocytom T. Naiwne limfocyty T CD8⁺ podlegają dojrzewaniu pod wpływem rozpoznanego antygeny do cytotoksycznych limfocytów T, które są zdolne do rozpoznawania i niszczenia komórek nowotworowych, z kolei limfocyty T CD4⁺ dojrzewają do limfocytów Th1, które produkują szereg cytokin, wzmagających aktywność limfocytów cytotoksycznych. Komórki Th1 produkując INF- γ rekrutują komórki NK i makrofagi o fenotypie M1, zaś w odpowiedzi na produkcję IL-2 dochodzi do dalszej rekrutacji komórek NK i limfocytów T cytotoksycznych w miejscu powstawania guza [85], [86]. Jednak w miarę immunoedycji, komórki nowotworowe stają się mniej immunogenne poprzez m.in.: obniżenie prezentacji antygenów czy produkcję TGF- β , IL-4, IL-13 i IL-10 co umożliwia rekrutację komórek Treg oraz które wykazują charakter immunosupresyjny [87]. Ponadto produkcja TGF- β , CSF-1, IL-4 czy IL-13 przez komórki nowotworowe promuje polaryzację makrofagów w kierunku fenotypu M2 [85], [88], [89].

W odpowiedzi na chroniczny stan zapalny występujący w początkowych stadiach rozwoju guza, do tkanki nowotworowej napływają komórki supresorowe linii mieloidalnej MDSCs (ang. *Myeloid-derived suppressor cells*), które są heterogenną populacją komórek o charakterze immunosupresyjnym [90]. Obecność prozapalnego INF- γ aktywuje ekspresję PD-L1 w komórkach MDSCs na drodze zależnej od ścieżki STAT1/IRF1 [91], [92]. Komórki MDSCs produkując reaktywne formy tlenu i azotu doprowadzają do modyfikacji białek MHC I i TCR, utrudniając rozpoznanie antygenów nowotworowych [93], [94]. Komórki MDSCs produkują także w nadmiarze enzym

2,3-dioksygenazę indoloaminy (IDO), który degraduje L-tryptofan pobierany ze środowiska, co w konsekwencji prowadzi do obniżenia lokalnego stężenia tego aminokwasu. Spadek stężenia L-tryptofanu prowadzi z kolei do zahamowania cyklu komórkowego limfocytów T i indukuje ich anergię a także wywołuje różnicowanie limfocytów CD4⁺ do limfocytów regulatorowych Tregs [95], [96]. Obecność MDSCs wywołuje także lokalny spadek stężenia L-cysteiny i L-argininy. Limfocyty T nie produkują L-cysteiny, a aminokwas ten jest dostarczany limfocytom T przez makrofagi i komórki dendrytyczne podczas prezentacji antygeny; obniżony poziom L-cysteiny w środowisku będzie w konsekwencji zaburzał syntezę białka i proliferację limfocytów T [96]–[101]. Z kolei spadek stężenia L-argininy, wywołany aktywnością arginazy produkowanej przez MDSCs, doprowadza do obniżenia ekspresji, bogatego w reszty argininy, łańcucha CD3 ζ limfocytów T, będącego głównym elementem przekazu sygnału receptora TCR [96], [102]. Ponadto MDSCs produkując TGF-β i IL-10 rekrutują Tregs [95].



Rysunek 2. Schematyczne przedstawienie wybranych zależności pomiędzy komórkami zasiedlającymi niszę nowotworu. Na rysunku wskazano niektóre z cząsteczek sygnałowych odpowiadających za podtrzymanie immunosupresyjnego środowiska nowotworu. Wszystkie skróty zostały wyjaśnione w tekście rozdziału 4.3.2. Rysunek utworzony przy użyciu Biorender.com na podstawie literatury [85]–[88], [90], [92], [95], [97], [103]–[109].

Komórki Tregs z kolei produkują m.in.: IL-27 indukującą ekspresję PD-L1 na powierzchni komórek nowotworowych i makrofagowych jak również IL-35, która wzmagą wyczerpanie limfocytów T poprzez stymulację ekspresji PD-1 (Rysunek 2) [103], [110]–[113]. Komórki te można podzielić na Tregs różnicujące w grasicy, które są rekrutowane do guza oraz takie Tregs, które różnicują w guzie. Jednym z czynników promujących różnicowanie naiwnych limfocytów CD4⁺ w guzie w kierunku Tregs, a także ekspresję receptora Foxp3 na ich powierzchni jest obecność PD-L1 na powierzchni komórek nowotworowych i komórek immunologicznych rezydujących w guzie [114], [115].

Limfocyty Tregs hamują odpowiedź immunologiczną skierowaną przeciwko nowotworom poprzez wiele mechanizmów. Odpowiadają za zmniejszenie ilości IL-2 w środowisku guza poprzez jej wychwytywanie za pomocą receptora CD25. Wpływa to hamująco na proliferację i aktywację limfocytów T cytotoksycznych, gdyż IL-2 jest czynnikiem wzrostu dla limfocytów T (a także dla komórek NK) [114], [116]. Tregs wykazują także konstytutywną produkcję białka CTLA-4, które zakłóca oddziaływanie cząsteczek kostymulujących CD80 i CD86 obecnych na komórkach APC z receptorem CD28 efektorowych limfocytów T. Takie zjawisko jest wynikiem wyższego powinowactwa CTLA-4 do CD80 i CD86 w stosunku do białka CD28. W wyniku interakcji z CTLA-4 cząsteczkami kostymulującymi CD80 i CD86 nie dochodzi do dostarczenia drugiego sygnału aktywującego efektorowe limfocyty T. Ponadto w wyniku interakcji z CTLA-4, białka CD80 i CD86 ulegają endocytozie przez komórki APC, co jeszcze bardziej zmniejsza ich dostępność dla aktywacji efektorowych limfocytów T [104], [117]. Limfocyty Tregs produkując cytokiny przeciwzapalne takie jak IL-10, TGF- β hamują również aktywność limfocytów T cytotoksycznych oraz limfocytów Th1, wspierających odpowiedź komórkową [104], [118]. Tregs mogą także wykorzystywać mechanizm zależny od kontaktu komórkowego i wywoływać śmierć cytotoksycznych limfocytów T oraz komórek NK przez działanie perforyny i granzymu B [119], [120]. Ponadto, receptory CD39 i CD73 obecne na Tregs posiadają aktywność ektonukleotydaz, które hydrolizują ATP i ADP do AMP oraz AMP do adenozyiny. Powstała adenozyina, działając na receptor A2AR i A2BR wycisza aktywność efektorową cytotoksycznych limfocytów T. Substratem dla CD39 i CD73 jest ATP uwolniony w wyniku nekrozy z cytozolu komórek

nowotworowych. Zewnątrzkomórkowy ATP stanowi jeden z sygnałów niebezpieczeństwa (znaczenie sygnałów niebezpieczeństwa zostanie opisane w dalszej części pracy) [104], [121].

W późnych etapach rozwoju guzów litych, w rejonach o obniżonym stężeniu tlenu, dochodzi do akumulacji makrofagów TAM (ang. *Tumor-associated macrophages*) o fenotypie M2 [88], [89]. Obecnie uważa się, że głównym źródłem TAMs są obwodowe monocyty, które są rekrutowane do guza przez chemotaktyczne czynniki wydzielane przez nowotwór [88], [122]. Pod wpływem mikrośrodowiska guza w odpowiedzi na TGF- β , CSF-1, IL-4 czy IL-13 monocyty przekształcają się w makrofagi o fenotypie M2 [85], [88], [89]. Jednak w guzach takich jak nowotwory trzustki i glejaki, TAMs mogą wywodzić się również z makrofagów embrionalnych [88]. TAMs pełnią szereg funkcji sprzyjających wzrostowi guza. Przede wszystkim produkują VEGF (ang. *Vascular endothelial growth factor*) na drodze zależnej od HIF-1 α , w wyniku czego dochodzi do indukcji angiogenezy w miejscach hipoksji (Rysunek 2) [105], [123]. Makrofagi produkują czynniki wzrostu EGF, FGF podtrzymując proliferację komórek nowotworowych i zapobiegając apoptozie [124]. TAMs wykazują szerokie działanie na komórki tkanki nowotworowej poprzez produkcję TGF- β . Wśród jego efektów można wymienić: indukcję generowania Tregs poprzez wzrost ekspresji Foxp3 w komórkach CD4⁺, hamowanie funkcji efektorowych limfocytów T cytotoksycznych oraz podtrzymywanie ekspresji czynnika transkrypcyjnego HIF1 α w komórkach nowotworowych, co również promuje rozwój nowotworu a także przerzutowanie [123], [125], [126]. W środowisku nowotworowym TAMs odpowiadają za produkcję IL-6, której działanie ma charakter antyapoptotyczny dla komórek nowotworowych [103], [123], [127]. TAMs są również źródłem wielu enzymów proteolitycznych, które degradując macierz zewnątrzkomórkową uwalniają związane z nią czynniki wzrostu oraz torują drogę dla komórek metastatycznych [128]. Podobnie jak limfocyty Tregs, TAMs produkują cytokiny przeciwzapalne IL-4, IL-10, które hamują aktywność limfocytów T cytotoksycznych, a także prowadzą do różnicowania limfocytów do fenotypu Th2-[123], [129]. TAMs wraz z MDSCs poprzez produkcję i wydzielanie arginazy, redukują poziom zewnątrzkomórkowej L-argininy i tym samym hamują proliferację limfocytów T [129].

W tym miejscu warto również wspomnieć, że w rozwoju tkanki guza istotną rolę pełnią również komórki nieimmunologiczne. Obecność nie tylko komórek nowotworowych, ale również fibroblastów CAFs (ang. *Cancer Associated Fibroblasts*) prowadzi do produkcji czynników wzrostu takich jak HGF, FGF, TGF- β , M-CSF. W szczególności TGF- β i M-CSF silnie promują rozwój MDSCs. Ponadto, pod wpływem hipoksji dochodzi do ekspresji czynnika transkrypcyjnego HIF-1 α w komórkach CAFs, który indukuje ekspresję VEGF aktywującego angiogenezę [106], [130], [131]. CAFs hamują przeciwnowotworową odpowiedź immunologiczną poprzez produkcję szerokiej gamy cytokin i chemokin w tym CXCL5 oraz CXCL2, które wiążąc CXCR2 na powierzchni komórek nowotworowych aktywują ścieżkę sygnału PI3K/ATK prowadząc do powstania STAT3, który aktywuje ekspresję PD-L1 [108], [109].

Doniesienia z ostatnich lat wskazują, że wzrost ekspresji PD-L1 zachodzi nie tylko w komórkach nowotworowych, ale także w komórkach układu odpornościowego. Do tej pory potwierdzono, że komórki DCs wykazujące ekspresję PD-L1 hamują aktywność komórek NK oraz stymulują ekspresję czynnika Foxp3 w limfocytach T CD4⁺ prowadząc do ich różnicowania w kierunku limfocytów Tregs w tkance guza [114], [132]–[134]. Obecność PD-L1 na powierzchni komórek Tregs, podobnie jak w przypadku innych komórek immunologicznych i nowotworowych wykazujących ekspresję PD-L1, doprowadza do aktywacji ścieżki apoptozy limfocytów T CD8⁺ na drodze zależnej od PD-1 [135]. Pod wpływem działania IL-10, IL-4, IL-6 oraz IL-27 wzrasta również poziom ekspresji receptora PD-L1 na powierzchni makrofagów TAMs, a jego obecność jest skorelowana z utrzymaniem fenotypu M2. Ekspresja PD-L1 przez TAMs jest także aktywowana w odpowiedzi na IFN- γ produkowany przez limfocyty CD4⁺ Th1 [107], [136]. Z kolei populacja TAMs posiadających na swojej powierzchni PD-L1 nie tylko doprowadza do anergii limfocytów CD4⁺ i CD8⁺ w guzie, ale również aktywuje dalszą ekspresję PD-L1 na powierzchni komórek nowotworowych, co w niektórych typach nowotworów koreluje z obniżoną prognozą czasu przeżycia pacjentów [107], [137], [138].

Zaobserwowano, że w niektórych typach nowotworów, poziom PD-L1 produkowanego przez komórki immunologiczne podtrzymujące immunosupresyjne

środowisko może znacznie przekraczać poziom PD-L1 produkowanego przez komórki nowotworu [139]. W badaniach na mysich modelach nowotworów, takich jak nowotwór trzustki czy mięsaka odnotowano, że głównym źródłem PD-L1 w tkance guza są komórki TAMs. Takie zjawisko jest wynikiem kilku zdarzeń, do których dochodzi podczas rozwoju nowotworu. Podczas etapu równowagi dochodzi do ekspresji PD-L1 na powierzchni komórek nowotworowych w odpowiedzi na INF- γ produkowany przez limfocyty T. Podwyższony poziom PD-L1 w tkance guza doprowadza do lokalnego zahamowania aktywności limfocytów T infiltrujących nowotwór. Doprowadza to do zahamowania produkcji INF- γ przez limfocyty T i w konsekwencji obniżenia INF- γ -zależnej ekspresji PD-L1 na powierzchni komórek nowotworowych. Z kolei ekspresja PD-L1 na powierzchni TAMs jest częściowo stymulowana poprzez INF- γ , ale także przez IL-10, IL-4, IL-6 i IL-27. Dlatego ekspresja PD-L1 na powierzchni TAMs jest bardziej stabilna i długotrwała niezależnie od poziomu INF- γ [140]–[142]. Chroniczny stan zapalny i obecność INF- γ aktywuje ekspresję PD-L1 na powierzchni komórek MDSCs, które podobnie jak TAMs inaktywują limfocyty T CD8⁺ doprowadzając do ich anergii zależnej od PD-1 [143], [144] a także indukują dalszą ekspresję PD-L1 na powierzchni komórek nowotworowych [145]. Dodatkowo, w warunkach hipoksji, która występuje przy intensywnym wzroście guza, dochodzi do stabilizacji czynnika transkrypcyjnego HIF-1 α w komórkach MDSCs i TAMs. Czynniki transkrypcyjne HIF-1 α jest transportowany do jądra komórkowego gdzie oddziałuje z HIF-1 β (będącym konstytutywnie produkowanym białkiem) po czym powstały dimer bezpośrednio rozpoznaje sekwencje HRE (ang. *hypoxia response element*) promotora genu CD274 kodującego białko PD-L1 i wzmacnia jego ekspresję m.in. w komórkach nowotworu [146].

4.4 Immunoterapia przeciwnowotworowa

W 2020 roku około 23% zgonów w Europie było wynikiem chorób nowotworowych, co czyni je drugą, wiodącą przyczyną śmierci, po chorobach układu krążenia [147]. Wraz z postępem medycyny i nauki rozwijane się coraz to nowsze techniki terapii przeciwnowotworowych, wśród których immunoterapia nabiera coraz większego znaczenia. W odróżnieniu do radioterapii czy chemioterapii, immunoterapia umożliwia odtworzenie i wzmocnienie odpowiedzi przeciwnowotworowej układu odpornościowego. Do tej pory powstało wiele strategii immunoterapii opartych

o działanie m.in.: przeciwciał monoklonalnych, terapii komórkowych, w tym terapii z wykorzystaniem stworzonych w laboratorium limfocytów CAR-T, szczepionek przeciwnowotworowych, a także inhibitorów białek punktów kontrolnych odpowiedzi immunologicznej [148]. Ze względu na różnorodność nowotworów, złożoność regulacji odpowiedzi immunologicznej i różnice osobnicze pomiędzy pacjentami skuteczna immunoterapia wciąż stanowi wyzwanie [149]–[151]. Rozwijane obecnie strategie immunoterapeutyczne skupiają się na uniwersalnych elementach układu immunologicznego takich jak oś CTLA-4/CD80 i CD86 czy PD-1/PD-L1 [152]–[157]. Jak wspomniano w poprzednim rozdziale aktywacja ścieżki PD-1/PD-L1 umożliwia komórkom nowotworowym osłabienie antygenowo-specyficznej odpowiedzi efektorowych limfocytów T i występuje w wielu rodzajach nowotworów, co pozwala na zastosowanie tego typu terapii u szerszej liczby pacjentów.

Mechanizmy odpowiedzi immunologicznej oparte są na oddziaływaniach pomiędzy białkowymi partnerami (ang. *Protein-protein interaction*, PPI) takimi jak wspomniane CTLA-4/ CD80 i CD86 czy PD-1/PD-L1, co uruchamia kaskadę sygnałową i prowadzi do aktywacji i prawidłowego przebiegu procesów biologicznych, które podczas choroby nowotworowej następują w nieprawidłowym dla organizmu kontekście [158]. Dlatego PPI występujące w patofizjologicznych stanach mogą stanowić potencjalny cel terapii opartej na blokowaniu interakcji białko-białko.

Początkowo terapie przeciwnowotworowe wykorzystujące przeciwciała monoklonalne miały na celu wiązanie receptorów, które ulegają nadekspresji na komórkach nowotworowych. Pod koniec lat 90. ubiegłego wieku dopuszczono do obrotu jeden z pierwszych leków przeciwnowotworowych, które wykorzystywały PPI jako cel terapeutyczny. W 1997 roku Amerykańska Agencja Żywności i Leków FDA (ang. *U.S. Food and Drug Administration*) zarejestrowała przeciwciało monoklonalne anty-CD20 (rytuksymab) w terapii chłoniaków indolentnych i agresywnych [159]. W kolejnym roku zatwierdzono przeciwciało monoklonalne anty-HER2 (herceptyna) [160]. Równocześnie, rozwój biochemii strukturalnej przyczynił się do zdefiniowania profilu PPI, wedle którego interakcja dwóch białek opiera się nie na tworzeniu dobrze zdefiniowanych, głębokich kieszeni wiążących (jak w przypadku enzymów) lecz na

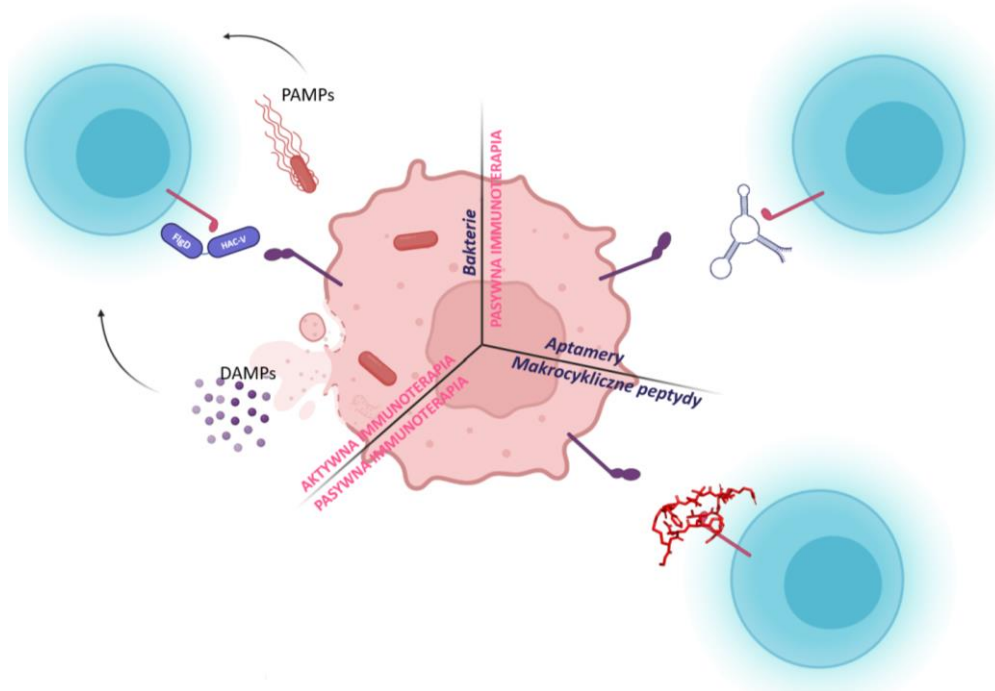
subtelnych oddziaływaniach powierzchni obu partnerów tworzących co najwyżej płytkie złożenia [161].

Pierwszym terapeutycznym przeciwciałem skierowanym przeciwko białkom kontroli odpowiedzi immunologicznej dopuszczonym przez FDA w 2011 r. był Ipilimumab wyprodukowany przez firmę Bristol Meyer Squibb. Ipilimumab wiąże antygen CTLA-4, przez co zapobiega wygaszaniu specyficznej, cytotoksycznej odpowiedzi limfocytów T [154], [162]. Ipilimumab jest z powodzeniem stosowany w leczeniu przerzutującego czerniaka złośliwego [154], [163], przerzutującego nowotworu prostaty [164], jasnokomórkowego raka nerki [165], a także w terapiach łączonych przeciwko niedrobnokomórkowemu nowotworowi płuc NSCLC (ang. *Non-small-cell lung carcinoma*) z dużym obciążeniem mutacjami somatycznymi (ang. *Tumor mutational burden, TMB*) [166], [167]. To otworzyło drogę do opracowania kolejnych przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko białkom kontrolującym odpowiedź immunologiczną w tkance nowotworowej, takim jak PD-1 (Pembrolizumab, Nivolumab, Cemiplimab) czy PD-L1 (Atezolizumab, Avelumab, Durvalumab) [168], [169].

Pomimo niewątpliwej skuteczności wykorzystywanych przeciwciał monoklonalnych w dalszym ciągu poszukuje się cząsteczek terapeutycznych nowszych generacji. Skuteczną alternatywą może okazać się zastosowanie znacznie mniejszych cząsteczek w porównaniu do przeciwciał, takich jak aptamery czy inhibitory peptydowe lub wykorzystanie immunoterapii aktywnej z użyciem żywych mikroorganizmów do immunostymulacji przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej, co zostanie przedstawione w kolejnym rozdziale pracy.

4.5 Strategie immunoterapii przedstawione w pracy

W niniejszej pracy przedstawiono trzy alternatywne strategie, które mogą być wykorzystane do hamowania interakcji PD-1/PD-L1. Pierwsza z nich należy do grupy immunoterapii aktywnych, a jej koncepcja zakłada wykorzystanie bakterii *Salmonella* jako nośnika dostarczającego białek fuzyjnych do tkanki guza, które mogą skutecznie hamować interakcję PD-1/PD-L1. Dwie pozostałe opierają się na wykorzystaniu właściwości małych cząsteczek: aptamerów i makrocyclicznych peptydów jako inhibitorów interakcji PD-1/PD-L1 (Rysunek 3).



Rysunek 3. Immunoterapie przeciwnowotworowe opisane w niniejszej pracy. Immunoterapia aktywna z wykorzystaniem bakterii *Salmonella*, prowadząca do wyindukowania przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej oraz immunoterapie pasywne wykorzystujące cząsteczki aptamerów i makrocyclicznych peptydów, które mechanicznie blokując interakcję białek PD-L1 i PD-1 zapobiegają inaktywacji limfocytów T rezydujących w tkance guza. Rysunek utworzony przy użyciu Biorender.com.

4.6 Wykorzystanie bakterii rodzaju *Salmonella* w aktywnej immunoterapii przeciwnowotworowej

Pierwsze próby wykorzystania bakterii w terapii przeciwnowotworowej były prowadzone w latach 90. XIX wieku przez Dra Wiliama Coleya, który podawał pacjentom cierpiącym na nieoperacyjne choroby nowotworowe mieszkankę martwych bakterii *Streptococcus pyogenes* i *Serratia marcescens*, znanej później jako toksyna Coleya [170]. Dr Coley opierał swoje działania na hipotezie, która mówi, że wyidukowana infekcja bakteryjna może wpływać na zmniejszenie się nowotworów i takie zjawisko obserwował u wielu pacjentów [170], [171]. Pomimo świetnych rezultatów, użycie toksyny Coleya spotkało się z krytyką, ponieważ wielu lekarzy nie wierzyło w otrzymane przez Coleya wyniki. Dr Coley opisywał, co prawda, przypadki regresu choroby nowotworowej u wielu swoich pacjentów, niemniej jednak eksperymentował on z dawkami, metodami podania i składem preparatu, co było konsekwencją indywidualnego podejścia do potrzeb pacjenta, określanego dziś mianem medycyny personalizowanej. Istniało co najmniej 13 preparatów toksyn o różnej skuteczności jak również wiele metod podawania toksyny

(domięśniowo, dożylnie lub bezpośrednio do guza). Dlatego część lekarzy, która stosowała toksynę, ale nie uwzględniła wyżej wymienionych zmiennych nie otrzymała wystarczająco dobrych wyników lub nie zauważyła żadnego efektu. Ostatecznie doprowadziło to do zaniechania szerszego stosowania metody Coleya na rzecz rozwijającej się wówczas dziedziny radioterapii i chemioterapii. Dopiero opublikowanie przez Helen Coley Nauts w 1990 roku usystematyzowanych danych i obserwacji przeprowadzonych przez Dr Coleya (jak również jego syna, który kontynuował pracę nad toksyną Coleya i jej wpływem na nowotwory) wzbudziło szersze zainteresowanie naukowców i przyczyniło się do rozwoju bakteryjnej immunoterapii [170]–[174].

Od czasów dra Coleya po dzień dzisiejszy przebadano wiele szczepów bakteryjnych pod kątem aktywności przeciwnowotworowej jednak tylko kilka z nich znajduje się w trakcie badań klinicznych. Jednym z wyzwań stosowania bakterii w immunoterapiach jest dostosowanie niskiej cytotoksyczności preparatu do dawki wykazującej skuteczność terapeutyczną. Do tej pory istnieje tylko jeden przeciwnowotworowy preparat bakteryjny zatwierdzony przez FDA, który jest standardowo stosowany w leczeniu raka pęcherza moczowego nienaciekającego mięśniówkę NMIBC (ang. *Non-muscle Invasive Bladder Cancer*). Preparat ten zawiera żywe, atenuowane bakterie *Mycobacterium bovis* stosowane powszechnie jako szczepionka BCG (*Bacillus Calmette-Guerin*) przeciw gruźlicy [175], [176]. Odkrycie, że preparat BCG stymuluje przeciwnowotworową odpowiedź immunologiczną, dało podstawy do przeprowadzenia badań klinicznych i zatwierdzenia preparatu jako leku przeciwnowotworowego w wymienionym typie nowotworu. Dane kliniczne wskazują jednak, że ok. 30-50% pacjentów nie odpowiada na stosowaną terapię [175]. Ponieważ preparat BCG działa tylko na jeden typ nowotworu, testuje się kolejne szczepy bakteryjne, które mogą wykazywać efekt terapeutyczny również w innych typach nowotworów. Wiele szczepów bakteryjnych z rodzaju *Bifidobacterium* (*B. breve*), *Salmonella* (*S. Typhi*, *S. CVD908ssb*, *S. Typhimurium* VNP20009), *Escherichia* (*E. coli* MG1655), *Clostridium* (*C. novyi-NT*, *C. butyricum* M55), czy *Listeria* (*L. monocytogenes*) są brane pod uwagę jako kandydaci do zastosowania w immunoterapii przeciwnowotworowej [171], [177]–[182].

Szczepy bakteryjne, które są rozpatrywane jako kandydaci do immunoterapii przeciwnowotworowej należą do grupy bakterii anaerobowych lub fakultatywnie anaerobowych [178], [183]–[185]. Hipoksja występująca w tkance guza zapewnia im odpowiednie środowisko życia a związki odżywcze uwalniane z nekrotycznych komórek guza są dla nich silnym atraktantem, a ponieważ bakterie mają zdolność do aktywnego przemieszczania się, mogą penetrować tkankę nowotworu w wyniku chemotaksji i lokalizować się w miejscach niedostępnych dla pasywnie transportowanych terapeutyków [186]. Dzięki rozwojowi inżynierii genetycznej, terapeutyczne bakterie mogą zostać wyposażone w geny kodujące białka terapeutyczne. Ponadto do takich bakterii można wprowadzić modyfikacje promujące lub warunkujące syntezę białek terapeutycznych tylko w tkance guza [186]–[189].

Istnieją dwie koncepcje wykorzystania bakterii w immunoterapii przeciwnowotworowej. W pierwszej, bakterie mogą być wykorzystywane jako atenuowane szczepionki pełniące rolę wektora niosącego np.: geny neoantygenów nowotworowych. Wówczas obecność mikroorganizmów nie jest konieczna w miejscu rozwoju guza, a bakterie stanowią dodatkowe źródło antygenów nowotworowych. Ponieważ bakterie dostarczają silnych egzogennych sygnałów niebezpieczeństwa poprzez ekspozycję molekularnych wzorców patogenności PAMPs (ang. *Pathogen Associated Molecular Pattern*) takich jak lipopolisacharydy (LPS) czy flagelina (Rysunek 3), które silnie mobilizują układ immunologiczny stanowią doskonały adiuwant dla szczepionki [190], [191]. Według drugiej koncepcji bakterie mogą zostać wykorzystane do immunomodulacji środowiska supresorowego guza. Do tego celu często wybierane są bakterie należące do wewnątrzkomórkowych patogenów. Bakterie zakażając komórki nowotworowe doprowadzają do ich uszkodzenia i uwolnienia cząsteczek pochodzenia endogennego. Cząsteczki te stanowią tzw. sygnały niebezpieczeństwa DAMPs (ang. *Danger Associated Molecular Pattern*), do których należą m.in.: nukleotydy czy białka szoku cieplnego [192], [193]. Wraz z uwolnieniem zawartości cytoplazmy dochodzi do zwiększenia dostępności DAMPs oraz antygenów nowotworowych dla komórek dendrytycznych. Komórki DCs mogą teraz prezentować antygeny nowotworowe w kontekście MHC I limfocytom T CD8⁺ w wyniku krzyżowej prezentacji antygenów [194], [195]. Ponadto zakażając komórki immunologiczne rezydujące

w tkance guza, bakterie mogą przyczynić się do przełamania immunosupresyjnego działania tych komórek [191].

Bakterie *Salmonella* należą do wewnątrzkomórkowych patogenów aktywnie zakażających komórki nefagocytyjające oraz makrofagi. Niektóre badania prowadzone z użyciem ludzkiej linii komórkowej raka szyjki macicy HeLa potwierdzają, że bakterie *Salmonella*, które opuściły SCV (ang. *Salmonella-containing vacuole*) i znalazły się w cytoplazmie ulegają intensywnej replikacji (nazywanej w przez niektórych hiperreplikacją), która może prowadzić do rozerwania komórek, uwolnienia kolejnych molekuł DAMP, co dodatkowo wzmacnia efekt przeciwnowotworowy (Rysunek 3) oraz kolejnych bakterii, które mogą zakażać kolejne komórki [196]–[199].

Atenuowane szczepy bakterii *Salmonella* preferencyjnie lokalizują się w tkance guza, czemu towarzyszy zahamowanie wzrostu nowotworów, co wielokrotnie obserwowano w modelach zwierzęcych [200]–[203]. Dotychczas udało się jednoznacznie potwierdzić, że „zwabione” przez bakterie do guza prozapalne komórki DC i makrofagi M1 produkują IL-1 β i TNF- α prowadząc do polaryzacji limfocytów CD4⁺ do Th1. Limfocyty Th1 z kolei promują komórkową odpowiedź przeciwnowotworową [202]. Obecność bakterii *Salmonella* w tkance nowotworowej hamuje ekspresję cytokin przeciwzapalnych IL-4, TGF- β a także czynnika VEGF oraz PD-L1 przy równoczesnej stymulacji ekspresji IFN- γ . Z kolei obecność IFN- γ indukuje aktywację limfocytów T CD8⁺ oraz napływ kolejnych limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ do tkanki guza [203]. Wiele badań potwierdziło również, że *Salmonella* wpływa na podwyższony stosunek makrofagów M1/M2 w tkance nowotworowej zarówno przez napływ makrofagów M1 jak i konwersję TAMs o fenotypie M2 do M1 [204]. Jednak mechanizm immunomodulacji konwersji makrofagów TAMs przez bakterie *Salmonella* jest wciąż nie do końca poznany, głównie ze względu na fakt, że w tkance niebędącej guzem bakterie *Salmonella* promują polaryzację makrofagów M1 do M2, co hamuje odpowiedź zapalną i zwiększa szansę ich przeżycia [204]–[207].

Bakterie z potwierdzoną zdolnością do zasiedlania tkanki guza mogą być poddane modyfikacjom genetycznym, które umożliwią produkcję białek terapeutycznych np. liganda dla receptora TRAIL czy domeny białka FADD,

odpowiadających za indukcję apoptozy komórek nowotworowych; cytokin prozapalnych np. IL-18 czy IL-2 stymulujących przeciwnowotworową odpowiedź immunologiczną, toksyn bakteryjnych takich jak cytolizyna A czy listeriolizyna, które tworzą pory w błonie komórkowej komórek eukariotycznych czy fragmentów przeciwciał wiążących czynniki transkrypcyjne np. HIF-1 α [187], [188], [208], [209].

4.7 Atenuowany szczep bakterii *Salmonella* Typhimurium VNP20009 o potencjale terapeutycznym

Bakterie wykorzystywane w terapii przeciwnowotworowej muszą wykazywać obniżoną wirulencję przy jednoczesnym zachowaniu immunogenności. Osłabienia zjadliwości bakterii można dokonać wprowadzając mutacje genów, których produkty są niezbędne w sprawnym działaniu szlaków metabolicznych takich jak np. produkcja aminokwasów czy nukleotydów. Umożliwia to wzrost bakterii dopiero po dostarczeniu brakujących związków pośrednich końcowych produktów danego szlaku.

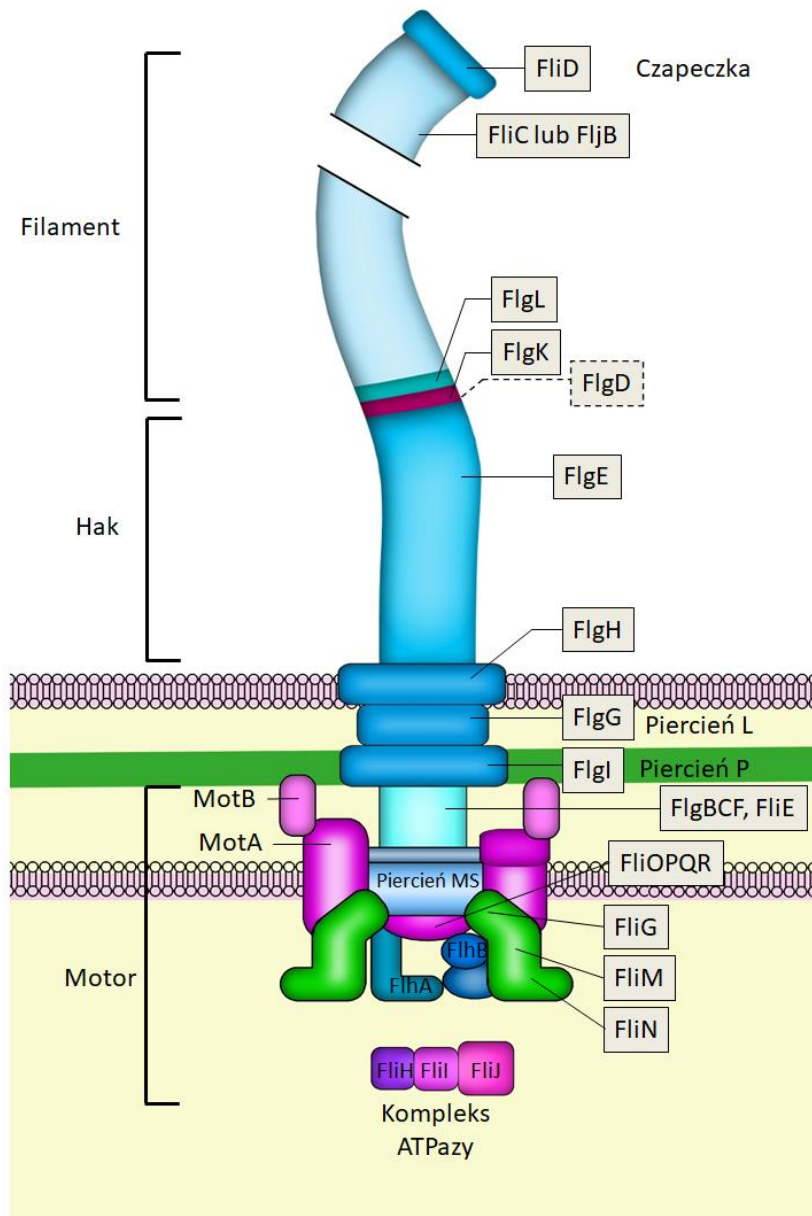
Dotychczas na drodze nieukierunkowanej mutagenyzy chemicznej z użyciem nitrozoguanidyny uzyskano kilka atenuowanych szczepów bakterii *Salmonella*. Ponieważ wskazany proces jest nieukierunkowany w zakresie wyboru miejsc ulegających mutacji, a powstałe szczepy bakteryjne różnią się poziomem immunogenności i nie wszystkie z nich są użyteczne w terapiach przeciwnowotworowych, konieczna jest selekcja odpowiednich bakterii, aby uzyskać szczep auksotroficzny o pożądanym cechach [171], [190], [210], [211]. Jednym ze szczepów *Salmonella*, który powodował zahamowanie wzrostu guzów nowotworowych w modelu mysim jest *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotyp Typhimurium VNP20009 należący do atenuowanych auksotrofów [212]. Analiza *ex post* mutagenyzy VNP20009 wykazała, że szczep ten charakteryzuje się między innymi delecją genu *purl*, którego produkt jest enzymem szlaku syntezy nukleotydów purynowych [213]. Ponadto, ze względu na częściową delecję genu *msbB*, bakterie szczepu VNP20009 utraciły zdolność do produkcji w pełni funkcjonalnego lipopolisacharydu. To z kolei powoduje osłabienie stymulacji syntezy TNF- α , głównej cytokiny prozapalnej, w zakażonych organizmach, a przez to zwiększenie tolerancji immunologicznej w stosunku do bakterii [214]. Należy dodać, że nie są znane wszystkie mutacje w genomie bakterii szczepu VNP20009 ani ich potencjalny wpływ na ich fizjologię, a także na przeciwnowotworową aktywność [213].

Badania prowadzone na myszach i psach wykazały, że bakterie szczepu VNP20009 zachowały zdolność do preferencyjnego zasiedlania tkanki nowotworowej i zahamowania wzrostu guza bez rewersji ich genotypu do typu dzikiego [215], [216]. Przeprowadzono badania kliniczne I fazy z użyciem bakterii VNP20009 na pacjentach z zaawansowanym stadium czerniaka złośliwego, podczas których ustalono poziom bezpiecznej dawki bakterii VNP20009 podanej we wlewach dożylnych. Pewną kolonizację guzów przez bakterie obserwowano przy najwyższej tolerowanej dawce, która wynosiła 10^9 CFU/m². Jednak nie zaobserwowano efektów przeciwnowotworowych [217], [218]. Dlatego też bakterie szczepu VNP20009 mogą być bezpiecznie stosowane, jednak należy je wyposażyć w dodatkowe cechy w celu osiągnięcia efektu przeciwnowotworowego. Dotychczas podjęto próby zwiększenia lokalizacji bakterii szczepu VNP20009 w guzie poprzez ekspresję fragmentu scFv skierowanego przeciw nowotworowemu antygenowi CEA (ang. *carcinoembryonic antigen*). Tak zmodyfikowane bakterie szczepu VNP20009 były zdolne do lokalizowania się w guzie, którego komórki produkowały antygen CEA, co potwierdzono w badaniach *in vivo* na mysim modelu nowotworu jelita grubego [219]. Bakterie szczepu VNP20009 były również poddane modyfikacjom prowadzącym do zwiększenia ich cytotoksycznego wpływu na komórki guza poprzez wprowadzenie nadekspresji białka SipB, które indukuje śmierć zakażonych komórek gospodarza [220]. Pomimo, że obserwowano zwiększenie lokalizacji w guzie na modelach mysich oraz wyższą skuteczność w hamowaniu wzrostu nowotworów, to efektywność zastosowanego szczepu nie była wystarczająca, aby można było rozważyć próby kliniczne z jego zastosowaniem (wyniki badań zespołu). Opisaną w niniejszej pracy alternatywną propozycją zwiększenia potencjału przeciwnowotworowego bakterii szczepu VNP20009 jest jego zastosowanie jako wektora dostarczającego inhibitora osi PD-1/PD-L1 do miejsca rozwoju guza. Podczas projektowania modyfikacji genetycznych bakterii, które mają zostać wykorzystane do produkcji białka wywierającego efekt na komórki gospodarza, należy uwzględnić zdolność bakterii do sekrecji takich białek. Systemy sekrecyjne są niezbędne do przeżycia bakterii, rozprzestrzeniania się czy zakażenia komórek gospodarza. Bakterie *Salmonella* posiadają m.in.: trzeci system sekrecyjny T3SS (ang. *Type 3 Secretion System*), który jest charakterystyczny dla bakterii Gram-ujemnych i który jest

interesujący z powodu jego potencjalnego wykorzystania w immunoterapii przeciwnowotworowej. System T3SS dzieli się na flagelinowy T3SS (F-T3SS) i nieflagelinowy T3SS (NF-T3SS). Jak wspomniano wcześniej, potencjalny inhibitor osi PD-1/PD-L1 musi być wydzielany, a jedną z możliwości było zastosowanie F-T3SS bakterii szczepu VNP20009.

Flagelinowy system sekrecyjny F-T3SS jest zbudowany z części wydzielniczej, pozwalającej na zbudowanie wici (flageli), która wraz z wewnątrzkomórkowym motorem umożliwia ruch. Cały system jest zbudowany z trzech głównych elementów: wewnątrzkomórkowego ciała podstawowego (w którym zlokalizowany jest motor), zewnątrzkomórkowego haka oraz długiego filamentu flagelinowego (Rysunek 4). Filament flagelinowy (wić) jest rotującą strukturą zakotwiczoną w błonie komórki za pomocą haka, którego obrót jest generowany poprzez napływ protonów w poprzek błony komórkowej. Filament flagelinowy jest największą częścią systemu flagelinowego i tworzy długą helikalną strukturę. Filament jest zbudowany z ok. 20 000 monomerów flageliny. Jest to, w zależności od panujących warunków, flagelina FliC lub FljB [221]–[223]. Wić bakterii *S. Typhimurium* jest zazwyczaj zbudowana z monomerów FliC, jednak w niektórych przypadkach dochodzi do zmiany monomerów białka budującego wić z FliC na FljB. Zjawisko to nosi nazwę zmienności fazowej wici (ang. *Flagellar Phase Variation*). Pomimo, że molekularny mechanizm tego procesu jest dość dobrze poznany, to jego biologiczna funkcja w dalszym ciągu pozostaje niejasna. Postuluje się, że zmienność fazowa wici może mieć związek z patogennością bakterii [224], [225]. Co ciekawe, podczas produkcji FljB dochodzi do ekspresji represora transkrypcyjnego genu *fliC*, co zapobiega równoczesnej syntezie białek FliC i FljB [224], [225]. Na szczycie filamentu flagelinowego znajduje się struktura zwana czapeczką, która jest zbudowana z monomerów białka FliD. Co istotne z punktu widzenia przedstawionej pracy, filament flagelinowy ulega ciągłemu złuszczeniu się, nawet pomimo obecności czapeczki. Uzupełnianie monomerów w strukturze wici i czapeczki odbywa się poprzez wydzielanie białek kanałem znajdującym się wewnątrz wici [226]–[229]. Oznacza to, że funkcja motoryczna F-T3SS jest zapewniona przez zdolność systemu do wydzielania tworzących go białek takich jak np.: białka haka (FlgE), łącznika (FlgK i FlgL) czy też białka regulatorowe systemu flagelinowego (m.in. FlgM). W tym miejscu należy również dodać,

że wykorzystane w pracy wydzielnicze białko FlgD tworzy czapkę haka, która jest obecna zanim dojdzie do powstania filamentu wici (Rysunek 4; zaznaczono przerywaną linią)[227]. Do tej pory różne grupy badawcze badały możliwość wykorzystania systemu F-T3SS do sekrecji rekombinowanych białek [230]–[235]. W ramach niniejszej podjęłam działania, które pozwoliły mi zweryfikować możliwość wykorzystania F-T3SS do sekrecji białka rekombinowanego, którego rolą jest interakcja z PD-L1.



Rysunek 4. Budowa struktury systemu flagelinowego bakterii *S. Typhimurium*. W budowie F-T3SS wyróżnia się wewnątrzkomórkowy motor oraz zewnątrzkomórkowy hak utrzymujący filament flageliny na powierzchni komórki. Cały system jest zakotwiczony w wewnętrznej jak i zewnętrznej błonie komórkowej bakterii. Opis systemu zawarto w tekście. Rysunek utworzony z wykorzystaniem programu Photoshop 7.0 na podstawie literatury [236], [237].

4.8 Zastosowanie aptamerów oligonukleotydowych w terapii i diagnostyce

Pomimo niewątpliwego sukcesu zastosowania przeciwciał w celach diagnostycznych oraz terapeutycznych a także w celach badawczych, w dalszym ciągu poszukuje się cząsteczek nowszych generacji o niewielkich rozmiarach, które wykazują specyficzność względem liganda, stabilność czy niską toksyczność. Odkąd zautomatyzowane syntezatory kwasów nukleinowych stały się dostępne w latach 80. XX wieku, znacznie wzrosło zainteresowanie wykorzystaniem syntetycznych oligonukleotydów jako potencjalnych terapeutyków. Wykorzystanie oligonukleotydów jako czynników zdolnych do specyficznego oddziaływania z różnymi ligandami było możliwe dzięki opracowaniu przez dwie niezależne grupy metody SELEX (ang. *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*) [238]–[240]. Wówczas został ukuty termin „aptamer”, który pochodzi od łacińskich słów *aptus* i *meros* oznaczających odpowiednio „dopasowany” i „część”. Proces SELEX był silnie chroniony patentami od roku 1993, co ograniczyło komercyjne inwestycje w rozwój aptamerów aż do początku XXI wieku [241].

Aptamery są krótkimi fragmentami (ok. 20-100 nukleotydów) jednoniciowych kwasów nukleinowych ssDNA lub RNA, które mogą wiązać ligand z powinowactwem porównywalnym niekiedy do oddziaływania antygen-przeciwciała [242], [243]. Tworzenie struktur drugo- i trzeciorzędowych takich jak pętle, struktury spinki do włosów (ang. *hairpin*), pseudowęzłów (ang. *pseudoknots*) czy tripleksów i kwadrupleksów zapewnia wysoką selektywność i powinowactwo aptamerów do swoich ligandów. Interakcja z ligandem jest wynikiem szerokiej gamy oddziaływań takich jak wiązania hydrofobowe, oddziaływania dipol-dipol czy jonowe, a także sił dyspersyjnych Londona oraz hydrofobowych oddziaływań typu π [244]–[247]. Chemiczna synteza aptamerów umożliwia bezpośrednie wprowadzenie pożądanych modyfikacji, co przekłada się na zminimalizowanie kosztów produkcji [243], [248]. Raz uzyskane metodą SELEX i scharakteryzowane aptamery, mogą być, w przeciwieństwie do terapeutyków białkowych jak np. przeciwciała, wytwarzane na drodze chemicznej syntezy w dużej skali. Dużym atutem tego rodzaju masowej produkcji, jest fakt, że odbywa się ona bez udziału czynnika biologicznego np. takiego jak bakterie czy komórki eukariotyczne, co minimalizuje ryzyko kontaminacji preparatu czynnikiem

immunogennym. Ponadto niższe koszty produkcji aptamerów mogą przekładać się na ich dostępność dla szerszej grupy pacjentów [248]–[250].

Powszechną metodą pozyskania aptamerów jest technika SELEX, która opiera się na selekcji i wybiórczej amplifikacji oligonukleotydów z puli kwasów nukleinowych znajdujących się w bibliotece RNA lub ssDNA w oparciu o interakcję z ligandem, w stosunku, do którego mają wykazywać specyficzność. W skład biblioteki wchodzi ok. 10^{11} - 10^{16} różnych sekwencji, których końce są takie same (tzw. regiony stałe) i służą do amplifikacji aptamerów po każdej rundzie selekcji [251], [252]. Specyficznie związane aptamery są amplifikowane w kolejnych cyklach procesu wzbogacając pulę w te oligonukleotydy, które rozpoznają ligand z wysokim powinowactwem. Aptamery uzyskane metodą SELEX są zbudowane z ok. 80-100 nukleotydów, z który każdy jest przypisany do kategorii niezbędnych, wspomagających lub nieistotnych ze względu na rolę strukturalną i funkcjonalną. Dwie pierwsze kategorie są decydujące dla prawidłowego oddziaływania aptameru z ligandem, zaś nukleotydy ostatniej grupy nie mają wpływu w strukturę aptameru i jego interakcję z ligandem. Ich usunięcie w procesie zwanym skracaniem sekwencji aptamerów (ang. *downstream aptamer truncation*) nie tylko nie wpływa negatywnie na działanie aptameru, lecz przeciwnie, zazwyczaj prowadzi do wzrostu powinowactwa aptameru do liganda. Skróceniu często ulegają końce aptamerów tj. regiony stałe [253], [254].

Aptamery mogą być w łatwy sposób poddawane modyfikacjom chemicznym, które poprawiają ich właściwości fizykochemiczne. Wprowadzenie szkieletu fosforotioanowego czy modyfikacji w pozycji 2'C reszty cukrowej (poprzez dołączenie grup takich jak metoksy-, fluoro-, amino- i metoksyetoksy-) prowadzi do zwiększenia odporności aptamerów na działanie nukleaz i wzrostu ich stabilności [255], [256]. Modyfikacje aptamerów mogą być także ukierunkowane na zwiększenie ich powinowactwa do cząsteczki docelowej. Obejmują wówczas m.in.: wprowadzenie grup funkcyjnych mogących uczestniczyć w interakcji z ligandem takich jak np. grupy benzylowej w pozycji C5 zasady azotowej [246], [257], [258]. Zwiększenie powinowactwa aptameru do liganda można również uzyskać przez wprowadzenie ugrupowań stabilizujących cząsteczkę aptameru, powodujących przesunięcie stanu

równowagi struktury aptameru w stronę stanu zdolnego do wiązania ligandu (ang. *binding competent state*) [247]. Przykładem aptameru zawierającego opisane modyfikacje jest Macugen™ (Pfizer) skierowany przeciwko VEGF. W celu otrzymania aptameru o podwyższonym powinowactwie w metodzie SELEX wykorzystano bibliotekę ssRNA zawierających nukleotydy 2'-fluoropirymidynowe. Aby zmniejszyć wrażliwość aptameru na działanie nukleaz w większości budujących go nukleotydów purynowych zmetylowano grupy hydroksylowe przy 2C' oraz dołączono cząsteczkę PEG na jego końcu 5' [259], [260]. Modyfikacje aptamerów wprowadza się również w celu wydłużenia ich czasu półtrwania w krwiobiegu. Nową metodą podwyższania okresu półtrwania aptamerów w krwiobiegu jest ich połączenie z nukleotydowymi strukturami Hollidaya. Metoda ta polega na takim zaprojektowaniu sekwencji, aby aptamery były połączone z sekwencjami zdolnymi do utworzenia struktury Hollidaya. Umożliwia to złożenie tetrawalentnej struktury DNA. Dzięki temu wielkość polimeru zmienia się na tyle, aby zapobiegać usuwaniu go z organizmu przez klirens nerkowy [261], [262].

Poza modyfikacjami, które polegają na optymalizacji siły interakcji pojedynczych cząsteczek aptameru z ligandem, dokonuje się modyfikacji polegających na połączeniu cząsteczek aptamerów ze sobą. Wybierając odpowiedni rodzaj linkera, jego długość oraz plastyczność można otrzymać cząsteczkę o zwiększonej awidności [263]–[265]. Do tej pory biwalentne aptamery znalazły zastosowanie w testach biosensorycznych wykrywających obecność komórek nowotworowych czy wirusa H1N1 [266], [267].

Aptamery charakteryzują się niską immunogennością. Ich podanie praktycznie nie wywołuje odpowiedzi immunologicznej i związanych z nią niepożądanych skutków ubocznych [243], [268]–[271]. Jednak potencjalnie może dochodzić do niezamierzonego oddziaływania aptamerów z innymi białkami, co może generować zdarzenia niepożądane (ang. *off-target side effects*). Problem ten może być wyeliminowany poprzez wprowadzenie do procesu SELEX pośredniego etapu selekcji – selekcji negatywnej z użyciem cząsteczek o podobnej strukturze do wybranego targetu i występujących w organizmie [272]. Aptamery o potencjale terapeutycznym muszą spełniać ściśle określone warunki, aby mogły pełnić rolę skutecznych leków. Długość funkcjonalnych aptamerów o wysokim powinowactwie to ok. 30-80 nukleotydów, co

przekłada się na ich niewielkie rozmiary, dzięki którym aptamery mogą docierać do głębszych części tkanek np. guza [273]. Jednak niewielkie rozmiary mogą powodować ich szybszy metabolizm i filtrację nerkową, podczas której są usuwane z organizmu [274], [275]. Z tego powodu zastosowanie aptamerów jako terapeutyków niekiedy wymaga ich sprzęgnięcia z cząsteczkami zwiększającymi ich rozmiary, takimi jak np. PEG czy cholesterol [276]–[278].

Aptamery charakteryzują się również wysoką stabilnością oraz odpornością na działanie czynników, które w sposób nieodwracalny mogą denaturować białka. W porównaniu do białek, aptamery mogą łatwiej odzyskać swoją natywną konformację w procesie renaturacji. Utrata struktury wyższego rzędu spowodowana np. zmianami temperatury może z powodzeniem ulec rewersji, czyli odtworzeniu pierwotnych wiązań wodorowych, z zachowaniem funkcji aptameru, poprzez odpowiednie podgrzewanie i ochładzanie próbki lub zmiany pH. Możliwość renaturacji aptamerów próbuje się wykorzystać w celu ich wielokrotnego użycia w chromatografii powinowactwa. Na przykład Hu i wsp. opisują złożę sefarozowe z dołączonymi aptamerami, którego funkcją jest usuwanie farmaceutyków z wody pitnej. Złożę wykazywało zdolność do selektywnego wychwytywania cząsteczek docelowych z preparatu wody nawet po kilku cyklach regeneracji wykonanej poprzez przepłukiwanie kolumny wodą o temperaturze 50°C. Dopiero po dziesięciu cyklach regeneracji wydajność absorpcji farmaceutyków spadła o 10% [279].

Mimo, iż pierwszy aptamer, Macugen™, został zatwierdzony do użytku terapeutycznego już w 2004 r., to do chwili obecnej na rynku farmaceutycznym nie pojawiły się inne preparaty oparte na aptamerach. Niektóre z otrzymanych aptamerów zostały poddane badaniom klinicznym [280]–[282]. Jednym z nich jest pegylowany aptamer DNA E10030 (Novartis), który wiążąc PDGF-B (ang. *Platelet-derived growth factor subunit B*), blokuje jego oddziaływanie z receptorem PDGFR-B, obniżając proces neowaskularyzacji siatkówki oka [283]. Wyniki z II fazy badań klinicznych z zastosowaniem E10030 w terapii kombinowanej wraz z ranibizumabem czyli przeciwciałem anti-VEGF, wykazały 62% poprawy ostrości widzenia w porównaniu do grupy pacjentów leczonych samym ranibizumabem [283], [284]. Badaniom klinicznym

poddano również pegylowany aptamer NOX-A12 (Noxxon Pharma), będący enancjomerem naturalnie występującego D-RNA. L-RNA ze względu na konformację ryboz, które go budują wykazuje wyższą odporność na działanie nukleaz w porównaniu do D-RNA. Aptamer NOX-A12 rozpoznaje chemokinę CXCL12, która wiążąc CXCR4 na powierzchni komórek odpowiada za przeżycie czy proliferację na drodze zależnej od PI3K/Akt czy MAPK[283], [285]. Zboralski i wsp. pokazali, że podskórne podanie NOX-A12 w obecności przeciwciał anti-PD-1 pozwala na synergistyczną aktywację limfocytów T CD8⁺ i CD4⁺ w mysim modelu nowotworu jelita grubego [286]. Przeprowadzono badania kliniczne I i II fazy nad NOX-A12, które miały na celu określenie farmakodynamiki i bezpieczeństwa przyjmowanego leku u pacjentów z nowotworami trzustki i jelita grubego. NOX-A12 w połączeniu z pembrolizumabem wykazywał indukcję odpowiedzi immunologicznej u 25% pacjentów, u których nie powiodło się wcześniejsze leczenie i którzy wykazywali upośledzenie układu immunologicznego [287], [288]. Ponadto, NOX-A12 był badany podczas II fazy badań klinicznych w połączeniu z bendamustyną i rytusymabem u pacjentów z nawracającą białaczką limfoblastyczną, gdzie odnotowano ogólny wskaźnik odpowiedzi na leczenie na poziomie 86% [283], [288], [289].

Co więcej, aptamery, rozpoznające antygeny nowotworowe mogą być wykorzystywane jako niewielkie nośniki leków cytotoksycznych umożliwiające lokalny wzrost ich stężenia w tkance guza i w konsekwencji silniejsze działanie. Efekt taki obserwowano w badaniach *in vitro*, w których komórki ostrej białaczki szpikowej ekspozowano na działanie aptameru rozpoznającego protoonkogen c-KIT sprzęgniętego z metotreksatem, który hamując syntezę nukleotydów pośrednio wpływa na zahamowanie cyklu komórkowego [290]. Zahamowanie wzrostu guza w badaniach *in vivo* na szczurzym modelu glejaka było również obserwowane po zastosowaniu konstruktu aptamer-nanocząstki. W tym celu użyto aptameru rozpoznającego nukleolinę, ulegającą wysokiej ekspresji na komórkach nowotworowych oraz komórkach śródbłonkowych tworzących się naczyń krwionośnych, sprzęgniętego z nanocząstkami zawierającymi paklitaksel, który zatrzymuje cykl komórkowy poprzez oddziaływanie z mikrotubulami [291].

4.9 Aptamery blokujące oddziaływanie PD-1/PD-L1

Z uwagi na swoją rolę w rozwoju nowotworu oś PD-1/PD-L1 stanowi potencjalny target dla aptamerów blokujących interakcję obu białek. W 2015 r. Prodeus i wsp. opracowali aptamer ssDNA MP7, który specyficznie rozpoznawał i wiązał zewnątrzkomórkową domenę mysiego PD-1 [292]. Autorzy zaobserwowali, że MP7 jest funkcjonalnym antagonistą interakcji PD-1/PD-L1, którego działanie prowadzi do przywrócenia aktywności i proliferacji limfocytów T w badaniach *in vitro*. Następnie, badania *in vivo* prowadzone na modelu mysim nowotworu jelita grubego wykazały, że podanie MP7 znacząco hamuje wzrost guza [292]. Już w kolejnym roku Lai i wsp. opracowali pierwszy aptamer ssDNA – aptPD-L1, rozpoznający ludzki PD-L1. Autorzy pracy stwierdzili, że aptamer aptPD-L1 oddziałuje silnie nie tylko z ludzkim PD-L1 (Kd = 4,7 nM) ale także z mysim PD-L1 (Kd = 72 nM). Przeprowadzone badania wykazały, że aptPD-L1 oddziałuje z PD-L1 na powierzchni ludzkich komórek linii niedrobnokomórkowego raka płuc oraz gruczolaka płuc [243]. Aktywność biologiczna aptameru aptPD-L1 została również przebadana w mysich modelach nowotworów jelita grubego i raka płuc [243]. Efekt supresji wzrostu nowotworów po zastosowaniu aptPD-L1 był porównywalny z poziomem supresji otrzymanym w wyniku zastosowania przeciwciał anty-PD-L1 [243]. Aptamer aptPD-L1 wzmacniał proliferację limfocytów T wyizolowanych z myszy BALB/c oraz C57BL/6 w testach *in vitro* oraz poprawiał infiltrację tkanki guza przez limfocyty T CD8⁺ i CD4⁺ w badaniach *in vivo* [243]. Obecnie aptamer aptPD-L1 opracowany przez Lai i wsp. jest poddawany kolejnym modyfikacjom i jest potencjalnym kandydatem do użycia w badaniach klinicznych [293]–[295]. W 2021 r. aptamer aptPD-L1 został osadzony na strukturze Hollidaya, który wykazywał wzmożoną w stosunku do wolnego aptameru, aktywność przeciwnowotworową w badaniach *in vivo* z użyciem modelu mysiego raka jelita grubego [296]. W 2022 r. opublikowano wyniki badań bispecyficznego aptameru CP-bi-apt rozpoznającego CD16 na powierzchni komórek NK oraz PD-L1 na powierzchni komórek nowotworowych [294]. Do rozpoznawania PD-L1 użyto sekwencji aptameru aptPD-L1. Bispecyficzny aptamer CP-bi-apt umożliwiał rekrutowanie komórek NK do bezpośredniego kontaktu z komórkami linii ludzkiego raka szyjki macicy oraz linii ludzkiego nowotworu wątroby wykazującymi ekspresję PD-L1, co wzmacniało śmierć komórek nowotworowych

w badaniach *in vitro* [294]. W badaniach *in vivo* zaobserwowano, że podanie komórek NK i CP-bi-apt myszom wzmacnia apoptozę i nekrozę komórek nowotworowych. Ponadto potwierdzono bezpieczeństwo CP-bi-apt w badaniach *in vivo* poprzez monitorowanie funkcji wątroby i nerek. Przedstawione wyniki wykazują obiecującą perspektywę zastosowania aptameru CP-bi-apt w terapiach [294]. Tylko dwa miesiące później An i wsp. opublikowali wyniki badań, w których aptamer aptPD-L1 został zmodyfikowany w celu zminimalizowania jego usuwania z organizmu poprzez filtrację nerkową [293]. Aptamer aptPD-L1 został poddany procedurze kompleksowania z albuminą bydlęcą za pomocą linkera sulfo-SMCC. Do dalszych badań wybrano kompleksy, które miały przyłączone średnio jedną cząsteczkę aptameru na jedną cząsteczkę albuminy (kompleks o nazwie BSA-Apt) [293]. Utworzenie kompleksu aptameru z albuminą zapewnia mu długi czas życia, ponieważ albumina jest białkiem o długim czasie półtrwania w osoczu. Utworzony kompleks posiadał wystarczająco duże rozmiary, aby zapobiegać jego usunięciu poprzez filtrację nerkową. W mysim modelu nowotworu jelita grubego zastosowanie BSA-Apt generowało znacznie silniejsze zahamowanie wzrostu guza w porównaniu do aptameru niebędącego w kompleksie z albuminą [293]. Autorzy pracy wyjaśniają, że taki efekt może być wywołany poprzez (i) wydłużony czas krążenia BSA-Apt we krwi lub (ii) efekt EPR (ang. *enhanced permeability and retention effect*), który polega na zwiększonej przepuszczalności naczyń krwionośnych oraz retencji w obrębie guzów litych. Zjawisko EPR może zwiększać skuteczność terapii przeciwnowotworowej dla cząsteczek o masie cząsteczkowej w zakresie 15-70 kDa, co wynika z ich akumulacji w obrębie guzów. Efekt ten wynika z nieszczelności pomiędzy komórkami śróbłonka naczyń krwionośnych guzów w porównaniu do prawidłowych tkanek, dużej gęstości naczyń krwionośnych w wyniku angiogenezy czy zaburzonej budowy błony podstawnej naczyń krwionośnych [297]–[299].

W roku 2018 r. zaprezentowano aptamery rozpoznające ludzkie białka PD-L1 oraz PD-1, pozyskane z wykorzystaniem biblioteki X-Aptamer (XA), co stanowi alternatywę dla metody SELEX [300]. Selekcja metodą XA opiera się na rozpoznaniu targetu (celu molekularnego) wyznakowanego biotyną przez sekwencje oligonukleotydowe związane z kulkami złoża (jedna kulka jest opłaszczona wieloma cząsteczkami takiego samego oligonukleotydu). Następnie za pomocą kulek

magnetycznych opłaszczonych streptawidyną, selekcjonuje się oligonukleotydy, które związały ligand wyznakowany biotyną. W kolejnym kroku oligonukleotydy zostają odseparowane od kulek złoża i uwolnione do roztworu, po czym następuje druga runda selekcji, w której sekwencje oligonukleotydowe są poddane wiązaniu z ligandem wyznakowanym biotyną. Ligand znakowany biotyną ponownie jest wiązany z kulkami magnetycznymi opłaszczonymi streptawidyną, a niezwiązane oligonukleotydy usuwane z roztworu. W ostatnim kroku związane sekwencje oligonukleotydów są powielane metodą PCR, sekwencjonowane i ostatecznie analizowane bioinformatycznie [300]–[302]. Metodą XA otrzymano aptamery wykazujące powinowactwo do ludzkiego PD-L1 oraz PD-1, co potwierdzono w badaniach *in vitro* z wykorzystaniem ludzkiej tkanki gruczołaka przewodowego trzustki. Niemniej jednak autorzy pracy nie przedstawili badań dotyczących skuteczności hamowania interakcji PD-1/PD-L1 [300], [302]. W 2020 r. Gao i wsp. przedstawili aptamer ssDNA specyficzny w stosunku do ludzkiego i mysiego PD-1 połączony z cząsteczką cholesterolu w celu wydłużenia czasu półtrwania aptameru w osoczu. W badaniach *in vitro*, w których badano poziom sygnału fluorescencyjnego pochodzącego od wyznakowanego aptameru (kandydata wytypowanego do dalszej modyfikacji), zaobserwowano ok. 30% wyższy sygnał podczas wiązania ludzkiego PD-1 w porównaniu do mysiego PD-1. Konstrukc aptamer-cholesterol wykazywał aktywność przeciwnowotworową w testach na mysim modelu raka jelita grubego [269].

Nadal prowadzone są badania mające na celu otrzymanie aptamerów rozpoznających białka osi PD-1/PD-L1, skuteczniejszych w terapiach nowotworowych niż dotychczasowo badane. Niektóre z uzyskanych aptamerów wiążących ludzkie i mysie białka osi PD-1/PD-L1, nie wykazywały aktywności przeciwnowotworowej pomimo potwierzonego oddziaływania z białkiem docelowym, stąd znalazły zastosowanie nie jako potencjalny terapeutyk, lecz jako narzędzie służące do wykrywania PD-1 lub PD-L1 na powierzchni komórek [292], [303]–[305]. Mimo niepełnego sukcesu w opracowaniu terapeutycznych aptamerów skierowanych przeciwko białkom osi PD-1/PD-L1 w dalszym ciągu są prowadzone próby uzyskania skutecznego terapeutycznego aptameru.

Aptamery z dołączonymi znacznikami fluorescencyjnymi mogą być wykorzystane do śledzenia dystrybucji w organizmie cząsteczki docelowej, przeciwko której aptamer jest skierowany, co czyni je narzędziem molekularnym użytecznym w diagnostyce obrazowej [306]. Obecnie na rynku dostępnych jest kilka komercyjnych zestawów wykorzystujących aptamery, opracowanych jedynie do zastosowań w cytometrii przepływowej. Zestawy do separacji komórek AptoCyto (ASMBIO) czy AptoPrep wykorzystują zestaw aptamerów rozpoznających m.in. EGFR, HGFR, ICAM-2, VEGFR-2 i HER-2 i pozwalają na wyizolowanie z wysoką wydajnością komórek posiadających wyżej wymienione markery [284], [307]. Inny produkt, SOMAScan (SomaLogic) będący platformą diagnostyczną zawiera panel aptamerów pozwalających wykryć biomarkery charakterystyczne dla gruźlicy, niedrobnokomórkowego raka płuc, choroby Alzheimerera, chorób układu sercowo-naczyniowego czy nieswoistego zapalenia jelit [284], [308]–[312]. Prowadzone są również badania nad systemami detekcji toksyn, jonów metali ciężkich czy patogenów znajdujących się w pożywieniu i wodzie, często w oparciu o układy elektrochemiczne, w których główną rolę odgrywa aptamer z dołączonym detektorem REDOX [313]–[315]. Związanie liganda generuje zmianę kształtu aptameru skutkując zmniejszeniem odległości pomiędzy aptamerem a elektrodą co z kolei prowadzi do zmiany potencjału elektrycznego, którą można ilościowo rejestrować [315].

Do tej pory różne grupy badawcze podejmowały próby opracowania aptamerów terapeutycznych skierowanych przeciwko białkom osi PD-1/PD-L1. W ramach niniejszej pracy poddałam charakterystyce aptamery ssDNA, które zostały otrzymane w procesie selekcji względem zewnątrzkomórkowych domen ludzkich PD-L1 i PD-1 z użyciem metody SELEX.

4.10 Terapeutyczne inhibitory peptydowe i makrocykliczne peptydy

Obecnie stosowane terapie przeciwnowotworowe możemy podzielić na niskocząsteczkowe inhibitory chemiczne, których masa cząsteczkowa nie przekracza 500 Da oraz terapie biologiczne oparte na białkach o masie cząsteczkowej powyżej 5000 Da. Pośrednią pozycję stanowią peptydy, których masa cząsteczkowa mieści się w zakresie 500-5000 Da.

Jednym z powszechnie stosowanych w onkologii terapeutyków biologicznych są przeciwciała monoklonalne. Od momentu zatwierdzenia pierwszego przeciwciała monoklonalnego jako środka terapeutycznego przez FDA w roku 1986, gałąź nauki zajmująca się przeciwciałami uległa znacznemu rozwojowi prowadząc do zatwierdzenia aż 162 terapii wykorzystujących przeciwciała monoklonalne (do roku 2022) [316]. Jednak historycznie starsze są niskocząsteczkowe inhibitory chemiczne, które zapoczątkowały przełom w leczeniu chorób człowieka i są szeroko stosowane nieprzerwanie od końca XIX wieku. Jednym z pierwszych niskocząsteczkowych inhibitorów chemicznych jest aspiryna wyprodukowana przez firmę Bayer, która została zarejestrowana jako terapeutyk w roku 1899 [317]. Od tamtej pory uzyskano szereg cząsteczek, które z powodzeniem wiążą wiele różnych targetów, z czego ponad 100 z powstałych inhibitorów jest stosowanych w terapiach przeciwnowotworowych [318]. Niektóre niskocząsteczkowe inhibitory chemiczne charakteryzują się wysoką biodostępnością po doustnym podaniu, jednak w przypadku chemioterapeutyków są one podawane we wlewach dożylnych [319], [320]. Ponadto synteza niskocząsteczkowych inhibitorów chemicznych charakteryzuje się niskimi kosztami produkcji, zaś modyfikacja terapeutyku jest stosunkowo prosta. Chemicznie inhibitory mogą być zaprojektowane tak, aby były metabolizowane z nieaktywnego proleku do aktywnego związku. Niektóre z nich mają zdolność do przekraczania błony komórkowej dzięki czemu mogą być skierowane przeciwko wewnątrzkomórkowym ligandom [260]. Jednak niezależnie od rodzaju chemioterapeutyku ich działanie polega na zahamowaniu funkcji targetu, która jest realizowana przez m.in.: interakcje z innymi białkami (PPI) lub ligandami.

W tym miejscu należy zaznaczyć, że PPI mogą zachodzić na dwa sposoby: poprzez oddziaływanie peptyd-rowek oraz oddziaływanie płaszczyzna-płaszczyzna [321]. W pierwszym przypadku białka oddziałują ze sobą poprzez dobrze zdefiniowany rowek jednego partnera i, pasujący do rowka wielkością i rozmieszczeniem ładunków, wyeksponowany peptyd drugiego partnera interakcji. W drugim przypadku, białka partnerskie charakteryzują się stosunkowo rozległą i płaską powierzchnią oddziaływania; powierzchnie oddziaływań partnerów także są dopasowane do siebie

kształtem i rozmieszczeniem ładunków, lecz w porównaniu do oddziaływania peptydów miejsc oddziaływania jest więcej [321].

Mechanizm hamowania funkcji targetu przez niskocząsteczkowe związki chemiczne polega na interakcji z dobrze zdefiniowaną i niewielką kieszenią takiego białka, co doskonale sprawdza się w przypadku hamowania aktywności enzymatycznej [322], [323]. Dlatego zastosowanie chemicznych związków jako inhibitorów PPI może napotykać poważne trudności, gdy interakcja odbywa się poprzez stosunkowo rozległe powierzchnie o płaskiej topologii. Z tego powodu niskocząsteczkowe związki chemiczne są skuteczniejsze jako antagonisty białek o dobrze zdefiniowanych (i niewielkich) kieszeniach wiążących (choć nie oznacza to, że nie podejmuje się prób otrzymania takich związków chemicznych skierowanych przeciwko PPI zachodzących przez oddziaływanie płaszczyzna-płaszczyzna) [324]. Przykładem PPI, w której białka nie posiadają dobrze zdefiniowanych kieszeni wiążących są białka kontroli odpowiedzi immunologicznej w tym PD-1/PD-L1 (w dalszej części pracy odnosząc się do interakcji białko-białko lub używając skrótu PPI tekst będzie dotyczył oddziaływania typu powierzchnia-powierzchnia, chyba że wskazano inaczej).

Główną trudnością jest uzyskanie inhibitora o wielu punktach oddziaływania z powierzchnią PPI jednego z partnerów, co może wpływać na skuteczność hamowania interakcji. Ponadto, obniżona ilość miejsc kontaktu może prowadzić do niższej selektywności niskocząsteczkowego inhibitora chemicznego względem białka targetowego biorącego udział w PPI, co generuje skutki uboczne [317], [325]–[327]. Dlatego w dalszym ciągu prowadzi się badania nad opracowaniem alternatywnych cząsteczek nowszych generacji, które wykazują aktywność hamującą interakcję PPI z wysoką selektywnością, a jednymi z potencjalnych kandydatów są makrocycliczne peptydy [326], [328], [329].

W porównaniu do niskocząsteczkowych inhibitorów chemicznych, peptydy, m.in. ze względu na większe rozmiary, mogą skutecznie blokować PPI z wysoką specyficznością, ponieważ wykorzystują dużo większe obszary oddziaływania z targetami, zaś odpowiednio zaprojektowane, wiążą je z wysokim powinowactwem [330]–[332]. Z kolei wyższa specyficzność wiązania liganda obniża skutki uboczne [333].

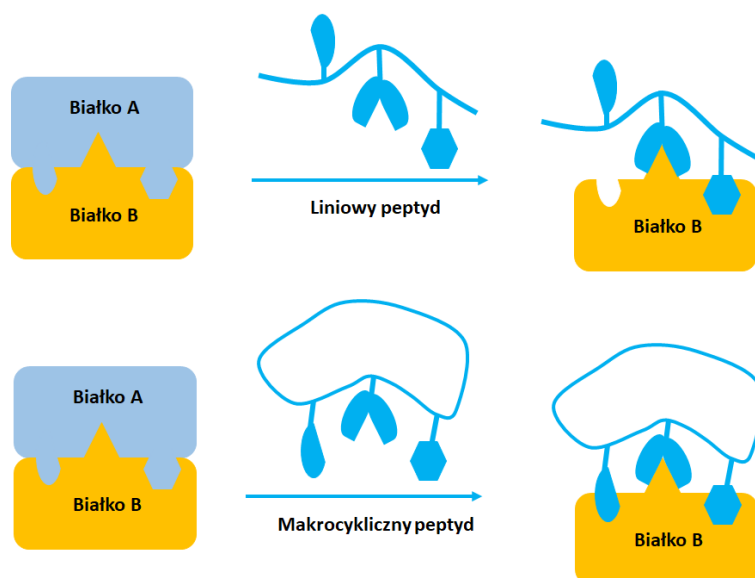
Niższa, w porównaniu z niektórymi niskocząsteczkowymi inhibitorami, toksyczność peptydów wynika z faktu, że podobnie jak przeciwciała, są metabolizowane do nietoksycznych aminokwasów. Zarówno niskocząsteczkowe inhibitory chemiczne jak i inhibitory peptydowe są skierowane przeciwko białkom zewnątrzkomórkowym. Jednak niekiedy mogą przekraczać barierę błony komórkowej i poprzez oddziaływanie z białkami szlaków sygnałowych, hamować przekaz sygnałów, np. sygnału stymulującego proliferację komórek nowotworowych [325], [334]–[336]. W odróżnieniu od chemicznych inhibitorów, peptydy nie mogą być przyjmowane doustnie ze względu na niski poziom wchłaniania przez błonę śluzową jelit oraz podatność na proteolizę. Podejmowane są jednak próby modyfikacji peptydów i stosowania specjalnych formułacji, umożliwiających doustne ich podawanie. Przykładem takich modyfikacji jest obiecująca metoda tworzenia kompleksów peptydów z nośnikami lipidowymi [337].

Podobnie do przeciwciał, peptydy wykazują wysokie powinowactwo i specyficzność względem białka, z którym oddziałują podczas hamowania PPI. W odróżnieniu od przeciwciał, produkcja peptydów jest stosunkowo tania, co wpływa na cenę leku i dostępność dla szerszej grupy pacjentów [333]. Inhibitory peptydowe charakteryzują się często krótkim okresem półtrwania w organizmie człowieka, co może ograniczać ich efektywność. Dlatego podczas opracowywania inhibitorów peptydowych dokonuje się modyfikacji, które pozwalają na wydłużenie czasu półtrwania. Modyfikacje strukturalne takie jak acetylacja N-końca peptydu lub amidacja C-końca peptydu czy wprowadzenie D-aminokwasów prowadzi do zmniejszenia wrażliwości peptydów na aktywność proteolityczną i wydłuża ich okres półtrwania w organizmie, choć w dalszym ciągu jest on dużo niższy niż okres półtrwania przeciwciał (dni vs. tygodnie) [338]–[341]. Ponadto wprowadzając D-aminokwasy do sekwencji peptydu można zwiększać zdolność do przenikania inhibitora przez błonę komórkową [340]. Wynika to z faktu, że wprowadzenie D-aminokwasów może wpływać na zmiany konformacyjne peptydu promujące tworzenie wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych. Tworzenie wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych zmniejsza polarność powierzchniową peptydu tym samym poprawiając zdolność przekraczania błony komórkowej [342]–[344]. Właściwości peptydów można skutecznie poprawiać poprzez ich makrocyclizację [345]. Makrocyclizacja peptydów może pozytywnie wpłynąć nie tylko na stabilność

i zdolność do przekraczania błony komórkowej peptydów, ale również na powinowactwo i selektywność względem liganda [345]–[347].

4.11 Makrocykliczne peptydy

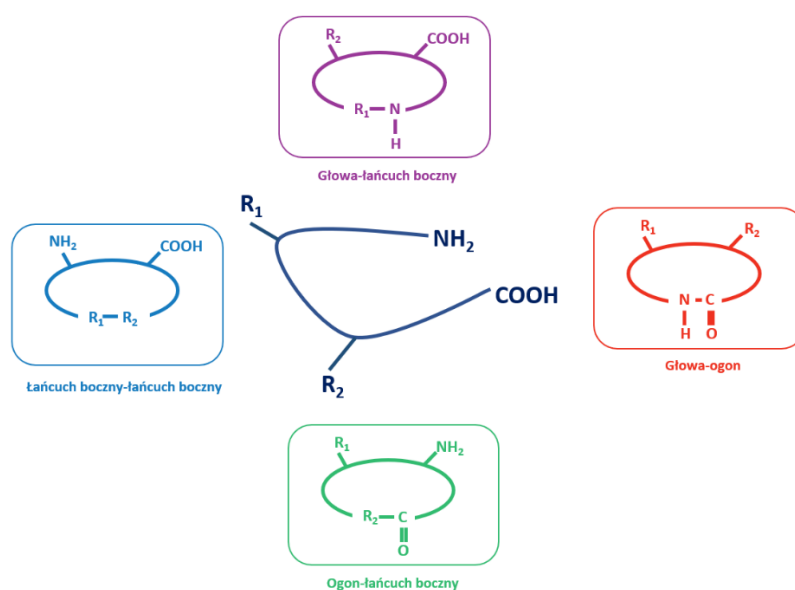
Makrocyklizacja peptydów polega na zamykaniu łańcucha polipeptydowego w formę pierścienia, a powstałe struktury nazywane są makrocyklicznymi peptydami. Udowodniono, że makrocyklizacja zmniejsza wrażliwość peptydów na degradację proteolityczną jak również wpływa na ich zdolność do przekraczania błony komórkowej [345]. Ponadto liniowe oligopeptydy zazwyczaj nie tworzą termodynamicznie stabilnych struktur w roztworach wodnych. Utworzenie oligopeptydowego pierścienia wprowadza pewien stopień ograniczenia konformacyjnego reszt aminokwasowych [347], [348]. Wstępna organizacja grup funkcyjnych cyklicznego peptydu powoduje, że łatwiej dochodzi do wiązania liganda w porównaniu do peptydu liniowego o tej samej sekwencji (Rysunek 5). W konsekwencji cyklizacja przyczynia się do bardziej selektywnej i silniejszej interakcji peptydu z białkiem [346], [347], [349]. Istotnym z punktu widzenia hamowania PPI jest fakt, że cyklizacja peptydów jest powszechnie stosowana do stabilizacji struktury drugorzędowej jaką przybiera peptyd. Przyjmowanie przez peptyd struktury α -helisy czy β -kartki, która jest podobna do fragmentu jednego z białek tworzących kompleks zaburza oddziaływanie między białkami kompleksu [350]–[352].



Rysunek 5. Schemat wpływu makrocyklizacji peptydu na jego efektywność wiązania białka. Rysunek utworzony przy użyciu programu PowerPoint na podstawie [347].

Koncepcja makrocyklizacji jest powszechna w przyrodzie. Jak do tej pory makrocykliczne peptydy zostały wyizolowane z roślin, grzybów, bakterii oraz zwierząt [353], [354]. W bakteriach i grzybach odkryto należące do makrocyklicznych peptydów, toksyny, siderofory czy barwniki jak również antybiotyki. Również wśród defensyn, powszechnie występujących wśród wielu różnych organizmów peptydów o działaniu przeciwbakteryjnym, wyróżnia się dużą grupę peptydów makrocyklicznych [353]–[355].

W roku 1942 Gause i Brazhnikova wyizolowali pierwszy makrocykliczny oligopeptyd – gramicydynę S, będący antybiotykiem produkowanym przez Gram-dodatnią bakterię *Bacillus brevis* [356]. Od tamtej pory odkryto wiele makrocyklicznych peptydów, które stanowią bardzo zróżnicowaną grupę związków. Jednym z popularnych sposobów klasyfikowania makrocyklicznych peptydów jest ich podział w zależności od rodzaju grup funkcyjnych biorących udział w utworzeniu pierścienia. Podział ten wyróżnia cztery następujące sposoby tworzenia pierścienia: głowa-ogon (ang. *head-to-tail*), głowa-łańcuch boczny (ang. *head-to-side chain*), łańcuch boczny-ogon (ang. *side chain-to-tail*) oraz łańcuch boczny-łańcuch boczny (ang. *side chain-to-side chain*) (Rysunek 6) [357]. Sposoby cyklizacji naturalnych peptydów zostały zaadaptowane do opracowywania syntetycznych makrocyklicznych peptydów o potencjale terapeutycznym [291].



Rysunek 6. Sposoby makrocyklizacji peptydów ze względu na rodzaj grup funkcyjnych zaangażowanych w utworzenie pierścienia. Rysunek utworzony w programie PowerPoint na podstawie [357].

4.12 Makrocyklizacja peptydów

Jedną z metod cyklizacji peptydów jest tzw. metoda zszywania (ang. *stapling*) [358]. Metoda zszywania polega na tworzeniu wiązania kowalencyjnego pomiędzy łańcuchami bocznymi określonych reszt aminokwasów, co ogranicza liczbę konformacji cząsteczki (większa sztywność cząsteczki) i stabilizuje strukturę drugorzędową peptydu – zazwyczaj α -helisy [358]. W metodzie zszywania, do peptydu są wprowadzone niewystępujące naturalnie reszty aminokwasowe, które muszą znajdować się po tej samej stronie α -helisy. Powstałe makrocykliczne peptydy noszą nazwę „zszytych peptydów” (ang. *stapled peptides*) [346], [358], [359]. Strategia ta pozwoliła otrzymać m.in.: inhibitor ALRN-6924 (Aileron Therapeutics) hamujący interakcję MDM2 oraz MDMX z p53. Wyniki fazy I badań klinicznych pokazują, że ALRN-6924 wykazuje obiecującą aktywność przeciwnowotworową u pacjentów z guzami litymi oraz chłoniakami [360]. Do metody zszywania zalicza się cyklizację typu łańcuch boczny-łańcuch boczny. Ten rodzaj makrocyklizacji może być otrzymany np. w wyniku wprowadzenia mostka laktamowego pomiędzy dwoma resztami bocznymi aminokwasów [345], [361]. Typ cyklizacji łańcuch boczny-łańcuch boczny został użyty przez Millsa i wsp. do otrzymania pierwszego makrocyklicznego peptydu o strukturze α -helisy, który oddziałuje z RNA wirusa HIV [362]. Kolejnym przykładem wiązania prowadzącego do cyklizacji typu łańcuch boczny-łańcuch boczny jest utworzenie mostka disulfidowego pomiędzy dwoma resztami cysteiny peptydu, który stabilizuje jego strukturę drugorzędową. Niemniej jednak w warunkach redukujących mostki disulfidowe są niestabilne, przez co często są zamieniane przez twórców na tioeterowy linker [345]. Taka zmiana wiązania została zastosowana przez Navarro i wsp. podczas optymalizacji struktury makrocyklicznego peptydu rozpoznającego białko CBP (ang. *CREB-binding protein*) [363]. Cyklizacja łańcuch boczny-łańcuch boczny może także opierać się na tworzeniu wiązań pomiędzy łańcuchami bocznymi innych reszt aminokwasowych w peptydzie np. grupą aminową łańcucha bocznego lizyny i grupą tiolową cysteiny [364], [365]. Za pomocą cyklizacji typu łańcuch boczny-łańcuch boczny są również otrzymywane peptydy bicykliczne – zbudowane z dwóch pierścieni [361]. Atrakcyjną cechą bicyklicznych peptydów jest to, że każdy z pierścieni jest nieco mniejszy niż pierścień monomakrocyklicznego peptydu. Mniejsze rozmiary pierścieni generują

większą ich sztywność konformacyjną, która z kolei może zwiększać powinowactwo i selektywność wiązania z danym białkiem. Ponadto każdy z pierścieni może funkcjonować niezależnie od drugiego i mogą pełnić różne funkcje np. jeden pierścień może oddziaływać z ligandem, zaś drugi odpowiadać za przekraczanie błony komórkowej [366]. Podobne wiązanie jak w typie cyklizacji łańcuch boczny-łańcuch boczny, pomiędzy grupą tiolową reszty cysteiny znajdującej się w peptydzie i grupą aminową może być obecne w typie cyklizacji łańcuch boczny-głowa. Jednak w tym przypadku grupa aminowa nie znajduje się w obrębie łańcucha bocznego reszty aminokwasowej a na N-końcu peptydu [345], [357]. Z kolei cyklizacja typu łańcuch boczny-ogon może być wprowadzona z udziałem grupy karboksylowej na C-końcu łańcucha polipeptydowego i łańcucha bocznego lizyny, seryny lub treoniny [345], [360].

Makrocyklizacja typu głowa-ogon jest powszechnie występującym typem cyklizacji naturalnych peptydów. Odbywa się poprzez utworzenie wiązania amidowego pomiędzy grupą aminową na N-końcu i grupą karboksylową na C-końcu peptydu. Brak wolnych końców N i C peptydu powoduje jego odporność na hydrolizę poprzez egzopeptydazy. Wspomniany typ makrocyklizacji został wykorzystany do opracowania m.in. peptydu hamującego dimeryzację białka CtBP (ang. *C-terminal binding protein*), którego aktywność promuje proliferację [347], [367]. Z kolei Wu i wsp. opracowali makrocykliczny peptyd z typem cyklizacji głowa-ogon, który hamuje interakcję białka Ras z białkami efektorowymi, co indukuje apoptozę ludzkich komórek nowotworu płuc w testach *in vitro* [347], [367], [368].

Każdy z typów cyklizacji wpływa odmiennie na właściwości makrocyklicznych peptydów. Dlatego wpływ typu cyklizacji na właściwości makrocyklicznego peptydu takie jak powinowactwo czy zdolność do przekraczania błony komórkowej musi być sprawdzona empirycznie. Rodzaj cyklizacji ma wpływ na utworzenie struktury drugorzędowej peptydu, która jest potrzebna do zachowania mimetyki strukturalnej, dzięki czemu peptydu może oddziaływać z danym białkiem i hamować PPI z jego natywnym partnerem. Ponadto położenie konkretnych reszt aminokwasowych w danej pozycji w sekwencji definiuje szanse powodzenia makrocyklizacji, a zmiana nawet jednej reszty aminokwasowej może znacząco obniżyć wydajność reakcji zamykania pierścienia

[369]. Wydajność reakcji makrocyklizacji jest również uzależniona od długości sekwencji aminokwasowej jak i od składu aminokwasowego. Pei i wsp. wykazali, że peptydy bogate w reszty lizyny i argininy generalnie znacznie trudniej ulegają makrocyklizacji [369], [370]. Ponadto cyklizacja peptydów zbudowanych z mniej niż siedmiu reszt aminokwasowych może prowadzić do niechcianej cyklodimeryzacji peptydów czy epimeryzacji podstawników na C-końcu peptydu, jeśli typ zamknięcia pierścienia to głowa-ogon. Dlatego też z ostrożnością należy dokonywać wyboru rodzaju cyklizacji syntetycznych peptydów, ponieważ może to wpływać na jego strukturę i aktywność [345], [369].

Interesujące podejście do optymalizacji makrocyklicznych peptydów przedstawili w 2011 r. Fasan i wsp., którzy opracowali nową klasę makrocyklicznych peptydów – makrocykliczne organopeptydowe hybrydy MOrPHs (ang. *macrocyclic organopeptide hybrids*)[371]. Autorzy opracowali metodę, która pozwala na osadzenie w łańcuchu polipeptydowym fragmentu zbudowanego z niebiałkowych reszt aminokwasowych i organicznego łącznika. Łącznik ten stabilizuje łańcuch peptydowy, który tworzy strukturę drugorzędową [371]–[373]. Przykładem jest hybryda MOrPH hamująca interakcję pomiędzy p53 a MDM2/X zawierająca pierścień typu łańcuch boczny-ogon [371], [373].

4.13 Sukces makrocyklicznych peptydów

Makrocykliczne peptydy pochodzenia naturalnego jak również takie, które zostały zsyntezowane w warunkach laboratoryjnych znalazły szerokie zastosowanie w medycynie. Przykładem mogą być analogi hormonów takich jak wazopresyna czy oksytocyna. Pierwszy z nich, wazopresyna jest antydiuretycznym hormonem zwężającym arteriole, co prowadzi do wzrostu ciśnienia krwi. Jest nanopeptydem, którego cykliczna struktura wynika z występowania mostka disulfidowego. Syntetyczny analog wazopresyny, terlipresyna jest stosowana od 2022 r. w niedoborach endogennego hormonu np. u hipotensyjnych pacjentów ze wstrząsem naczyniowym [374], [375]. Terlipresyna różni się od wazopresyny tym, że w pozycji 8. polipeptydu występuje reszta lizyny zamiast argininy oraz tym, że do grupy aminowej cysteiny przyłączono triglicerynę. Terlipresyna charakteryzuje się lepszym w porównaniu do

wazopresyny profilem farmakokinetycznym. Czas półtrwania terlipresyny w organizmie to ok. 6 godzin, zaś wazopresyny ok. 10 minut. Ponadto terlipresyna ma mniej skutków ubocznych w porównaniu do wazopresyny [375]–[377].

Innym makrocyklicznym peptydem szeroko stosowanym w medycynie jest oksytocyna. Oksytocyna, podobnie jak wazopresyna jest hormonem o budowie nanopeptydu z mostkiem disulfidowym, który zapewnia cyklizację. Oksytocyna wywołuje skurcze macicy u kobiet w ciąży i jest szeroko stosowana podczas porodów. Zauważono, że poziom oksytocyny wpływa na odpowiedź stresową, lęk i agresję oraz ma powiązanie z depresją. Niektóre raporty kliniczne sugerują, że oksytocyna może być obiecującym środkiem w leczeniu psychiatrycznym np.: depresji, zaburzeń lękowych czy schizofrenii [378]. Karbetocyna, syntetyczny analog oksytocyny, w której mostek disulfidowy został zastąpiony wiązaniem tioeterowym przez co ma dłuższy czas półtrwania w organizmie, została zatwierdzona w 2012 r. przez Europejską Agencję Leków (EMA, *European Medicines Agency*) do leczenia syndromu Pradera-Williego, który charakteryzuje się m.in.: hipogonadyzmem, opóźnionym rozwojem emocjonalnym i niepełnosprawnością intelektualną oraz otyłością wywołaną mniejszym zapotrzebowaniem kalorycznym przy jednoczesnym niepochamowanym uczuciu głodu [379]–[383]. Osoby z zespołem Pradera-Williego wykazują deficyt oksytocyny, a podanie karbetocyny zmniejsza niepokój behawioralny i ilość spożywanego pokarmu [382], [383].

Makrocykliczne peptydy znalazły również zastosowanie w leczeniu szeregu infekcji. Przykładem jest zatwierdzony przez FDA w 2006 r. pierwszy makrocykliczny peptyd stosowany w infekcjach grzybiczych Anidulafungin (Vicuron/Pfizer) jako inhibitor syntazy 1,3- β -D-glukanu wchodzącego w skład ściany komórkowej. Ponadto pochodne makrocyklicznych peptydów są z powodzeniem stosowane jako antybiotyki przeciwbakteryjne. W 2009 i 2014 r. FDA dopuściła do stosowania w infekcjach skórnych lipoglikopeptydowe antybiotyki, pochodne naturalnej wankomycyny: Telavancin (Theravance), Dalbavacin (Durata Therapeutics/Teva) i Ortavancin (The Medicines Company) hamujące syntezę ściany komórkowej bakterii Gram dodatnich [375].

Innym przykładem zastosowania makrocyklicznych peptydów jest cyklosporyna A, będąca naturalnym jedenastoaminokwasowym makrocyklicznym peptydem. Jest stosowana w transplantologii jako środek immunosupresyjny, który może być podawany doustnie oraz poprzez iniekcję. W roku 2021 FDA zatwierdziła immunosupresyjny terapeutyk Voclosporin (Aurinia Inc.), który jest zmodyfikowaną cyklosporyną A. Optymalizacja polegała na modyfikacji tylko jednej grupy funkcyjnej aminokwasu występującego na pozycji pierwszej cyklosporyny A, co wpłynęło pozytywnie na profil farmakokinetyczny cząsteczki i jej stabilność metaboliczną, a także wzrost powinowactwa do cyklofiliny. Oba preparaty odpowiadają za zahamowanie proliferacji limfocytów T i zahamowanie produkcji cytokin prozapalnych. Cyklosporyna A jak i Voclosporin tworzy kompleks z cyklofiliną, co prowadzi do zahamowania aktywności kalcyneuryny. W efekcie zostaje zahamowana defosforylacja czynnika transkrypcyjnego NFAT (ang. *Nuclear factor of activated T cells*), co prowadzi do blokady transportu NFAT do jądra i zahamowania ekspresji wielu białek, w tym IL-2, kluczowej dla proliferacji limfocytów T. Obydwa peptydy są jedenastoaminokwasowymi peptydami o cyklizacji głowa-ogon [375], [384], [385].

Zykonotydyd (TerSera LLC) jest syntetycznym odpowiednikiem naturalnego makrocyklicznego peptydu ω-MVIIA wyizolowanego z jadowitego ślimaka morskiego *Conus magnus*. Peptyd ten jest zbudowany z dwudziestu pięciu reszt, z czego sześć z nich to reszty cysteiny tworzące mostki disulfidowe. Mechanizm działania Zykonotydydu polega na blokowaniu kanałów wapniowych typu N synaps nerwowych, co obniża uwalnianie neurotransmiterów w populacjach neuronów odpowiedzialnych za przetwarzanie bólu przez rdzeń kręgowy. Preparat stosuje się do leczenia przewlekłego bólu, jednak posiada pewne ograniczenia. W celu wyeliminowania zdarzeń niepożądanych, takich jak halucynacje czy upośledzenie pamięci, Zykonotydyd musi być podawany bezpośrednio do kanału kręgowego, aby osiągnąć dawkę terapeutyczną [375], [386].

Jednym z makrocyklicznych peptydów, który odniósł sukces terapeutyczny w dziedzinie onkologii jest romidepsyna (Celgene Inc.), która po raz pierwszy została wyizolowana w 1994 r. z *Chromobacterium violaceum* [375]. Romidepsyna jest bicyklicznym peptydem, o którego strukturze decyduje cyklizacja typu głowa-ogon oraz

mostek disulfidowy. Działanie romidepsyny polega na hamowaniu aktywności deacetylazy histonów, co prowadzi do apoptozy. Romidepsyna jest stosowana w leczeniu chłoniaków T-komórkowych. W ostatnim czasie zakończyły się badania kliniczne fazy II z udziałem romidepsyny w terapii kombinowanej wraz z Carflizomibem, inhibitorem proteasomu, w leczeniu nawracającego chłoniaka obwodowego komórek T [387], [388]. Do terapii zostały również dopuszczone dwa analogi somatostatyny wykorzystywane w onkologii. Jednym z nich jest ośmioaminokwasowy makrocykliczny peptyd Lanreotyd (Biomeasure Inc.). Peptyd ulega cyklizacji typu łańcuch boczny-łańcuch boczny poprzez utworzenie mostka disulfidowego. Lanreotyd charakteryzuje się wydłużonym, w stosunku do somatostatyny, czasem półtrwania, który wynosi ponad cztery dni. W 2014 r. został zatwierdzony przez FDA w leczeniu przerzutujących guzów neuroendokrynnych przewodu pokarmowego i w 2017 r. do leczenia zespołu rakowiaka czyli zespołu objawów związanych z nadprodukcją serotoniny przez łagodny nowotwór [375]. Analogiem somatostatyny jest również Pasyreotyd (Recordati Inc.), który został zatwierdzony przez FDA w 2012 r. do leczenia choroby Cushinga wywołanej aktywnością komórek gruczolaka przysadki polegającą na nadmiernym wydzielaniu hormonu adrenokortykotropowego [375]. Pasyreotyd jest heksapeptydem z cyklizacją głowa-ogon. Peptyd ten oddziałuje z receptorem somatostatyny hamując sekrecję hormonu adrenokortykotropowego przez komórki gruczolaka [375], [389], [390].

Przedstawione powyżej przykłady są tylko niektórymi spośród wszystkich zatwierdzonych terapeutycznych makrocyklicznych peptydów i wskazują na ich wielki potencjał w terapiach wielu różnych schorzeń. Jednak wprowadzone na rynek makrocykliczne peptydy to w większości produkty naturalne lub takie, które są bliskimi pochodnymi naturalnych makrocyklicznych peptydów. Modyfikacje, które są wprowadzone do naturalnych makrocyklicznych peptydów dotyczą nielicznych, konkretnych pozycji, tak aby nie zmniejszyć wysokiego powinowactwa naturalnych analogów.

Jednak spektrum terapeutycznego wykorzystania makrocyklicznych peptydów może być znacznie szersze i wykraczać poza stosowanie analogów naturalnych cząsteczek. Syntetyczne makrocykliczne peptydy stanowią atrakcyjną grupę

potencjalnych terapeutyków ze względu na ich zdolność do blokowania PPI stanowiących punkty kontrolne odpowiedzi immunologicznej [391], [392].

4.14 Makrocycliczne peptydy a ich zdolność do hamowania interakcji białko-białko

Małe cząsteczki terapeutyczne blokujące oddziaływania białko-białko (PPI) stanowią nowatorskie podejście w immunoterapii. Największym wyzwaniem przy tworzeniu związków terapeutycznych hamujących PPI jest brak klasycznych kieszeni wiążących w obrębie oddziałujących ze sobą domen białkowych, a także rozległa powierzchnia oddziaływań pomiędzy partnerami [393]–[395]. Pomimo że powierzchnia PPI jest stosunkowo rozległa, to za stabilizację oddziaływania odpowiadają niewielkie miejsca kontaktu, a ich ilość zależy od powierzchni interakcji białek. Przedstawione cechy PPI odnoszą się również do oddziaływań pomiędzy PD-1 i PD-L1 [396], [397].

Badania, w których ukierunkowanej mutagenie poddawano reszty aminokwasowe obecne na powierzchni domen biorących udział w oddziaływaniu białek pokazały, że tylko niektóre z reszt aminokwasowych w obrębie miejsc kontaktu są istotne dla PPI [398]–[402]. Kluczowe dla PPI aminokwasy występują zazwyczaj w centralnej części powierzchni i razem tworzą kilka płytkich zagłębień. Aminokwasy te tworzą bezpośrednie miejsca oddziaływania z resztami aminokwasowymi partnera białkowego [161], [394]. Ponadto Bogan i Thorn sugerują, że miejsca bezpośredniej PPI są otoczone resztami, które nie są ważne dla utworzenia wiązania, ale ich rolą jest osłanianie miejsca bezpośredniego kontaktu przed rozpuszczalnikiem [397], [403]. Ze względu na stosunkowo znaczną wielkość powierzchni uczestniczących w oddziaływaniu między białkami, zastosowanie niskocząsteczkowych związków chemicznych jako inhibitorów PPI jest bardzo trudne. Takie inhibitory znacznie lepiej sprawdzają się jako antagoniści białek o dobrze zdefiniowanych i niewielkich kieszeniach wiążących [404]–[406].

Obiecującą alternatywą dla hamowania PPI są makrocycliczne peptydy. Makrocycliczne peptydy wykorzystują mimetykę strukturalną do oddziaływania z białkiem docelowym, naśladując naturalną interakcję białko-białko. Łańcuchy boczne makrocyclicznego peptydu naśladują nie tylko łańcuchy boczne reszt aminokwasowych endogenego białka partnerskiego, ale również jego strukturę drugorzędową. Co ważne,

zamknięcie peptydu w formę pierścienia z wykorzystaniem odpowiedniego typu cyklizacji zapewnia utrzymanie drugorzędowej struktury peptydu [407], [408]. Ponadto dzięki większym rozmiarom w porównaniu do niskocząsteczkowych inhibitorów chemicznych mogą tworzyć więcej oddziaływań z powierzchnią docelowego białka, przez co charakteryzują się wyższą specyficznością. Wyższa specyficzność zapobiega z kolei efektom niepożądanym wywołanym niespecyficznymi interakcjami inhibitora z innymi białkami [407]. Makrocykliczne peptydy mogą niekiedy osiągać specyficzność i powinowactwo porównywalne do tych, jakie charakteryzują przeciwciała [405]. Ich synteza jest stosunkowo szybka, zaś same peptydy mogą być w łatwy sposób modyfikowane w celu poprawienia ich właściwości [409].

Historycznie pierwsza technika pozwalająca na wyselekcjonowanie inhibitora peptydowego danego białka polegała na przeszukiwaniu niezdefiniowanych bibliotek peptydowych, których struktura była poznawana w późniejszych etapach [410]. Z kolei techniki projektowania inhibitorów, które zostały opracowane na podstawie przemyślanej analizy struktury białka docelowego i powierzchni interakcji z białkiem partnerskim należą do technik nowszej generacji [410]. Racjonalne projektowanie makrocyklicznych peptydów jako inhibitorów PPI stało się możliwe wraz z rozwojem dziedziny krystalografii białek. Analiza struktury krystalograficznej PPI umożliwia charakterystykę powierzchni domeny wiążącej, miejsc kontaktu i kluczowych dla interakcji reszt aminokwasowych poszczególnych partnerów białkowych. Ponadto wiele informacji dostarczają również struktury, w których białka oddziałują z poznanymi do tej pory inhibitorami, co pozwala na dokładniejsze projektowanie makrocyklicznych peptydów [406], [411]–[413].

4.15 Stopień zaawansowania badań nad makrocyklicznymi peptydami BMS hamującymi interakcję PD-1/PD-L1

Pierwszym makrocyklicznym peptydem, który wykazywał właściwości blokujące interakcję PD-1/PD-L1, był zbudowany z 29 reszt aminokwasowych AUNP-12 (Aurigene Discovery Technologies, ADT, 2012). Związek ten powstał w oparciu o fragment domeny PD-1 wiążącej PD-L1. W testach *in vitro* AUNP-12 hamuje proliferację komórek wykazujących ekspresję ludzkiego PD-L1 (linie komórkowe HEK293 i MDA-MB-231), zaś badania *in vivo* przeprowadzone na mysich modelach nowotworu piersi i złośliwego

czerniaka potwierdziły antynowotworowe działanie AUNP-12. Obserwowano zahamowanie wzrostu guzów o ok. 44% w obu przypadkach [414]–[416].

Równolegle do badań prowadzonych przez firmę ADT, firma Bristol Meyer Squidd (BMS) rozpoczęła badania nad makrocyklicznymi peptydami blokującymi oś PD-1/PD-L1 poprzez interakcję z PD-L1. Ponieważ niewielkie zmiany w strukturze makrocyklicznych peptydów mogą znacznie wpłynąć na ich powinowactwo do docelowej cząsteczki, stworzono bibliotekę makrocyklicznych peptydów anty-PD-L1 zawierającą 115 związków, które podzielono na trzy klasy o różnej liczbie aminokwasów; wszystkie tworzą pierścień dzięki wiązaniu tioestrowemu [331]. Związki w obrębie danej klasy różnią się od siebie pojedynczymi resztami aminokwasowymi, co umożliwiło określenie roli poszczególnych reszt aminokwasowych w oddziaływaniu z PD-L1 [331]. Peptydy klasy I zbudowane są z 15 reszt aminokwasowych, zaś klasy II z 14 reszt aminokwasowych. Peptydy obu tych klas zawierają oprócz standardowych reszt L-aminokwasów również cztery do pięciu reszt aminokwasów niebiałkowych. Z kolei klasa III obejmuje makrocykliczne peptydy zbudowane z 13 reszt aminokwasów białkowych. Aktywność hamowania interakcji PD-1/PD-L1 makrocyklicznych peptydów została wstępnie określona w teście HTRF (ang. *Homogeneous time-resolved fluorescence*). Większość makrocyklicznych peptydów BMS charakteryzuje się nanomolowymi wartościami IC₅₀ (stężenie, które hamuje interakcję w 50% w stosunku do możliwego maksymalnego zahamowania interakcji; ang. *half-maximal inhibitory concentration*) [331].

W 2017 r. Magiera-Mularz i wsp. scharakteryzowali przykładowe peptydy z każdej klasy makrocyklicznych peptydów BMS. Analizie poddano peptyd-57 (p57, klasa I), peptyd-71 (p71, klasa II) oraz peptyd-99 (p99; klasa III), dla których wartości K_i w teście HTRF wynosiły odpowiednio 9 nM, 7 nM oraz 153 nM (K_d kompleksu PD-1/PD-L1 wynosi 8,2 μM) [417]–[419]. Analizując widma 2D HMQC NMR Magiera-Mularz i wsp. wykazali, że wskazane makrocykliczne peptydy, zgodnie z oczekiwaniami, oddziałują jedynie z PD-L1 i nie oddziałują z PD-1. Wyższe powinowactwo p71 do PD-L1 potwierdzono również wykorzystując skaningową fluorymetrię różnicową DSF (ang. *Differential Scanning Fluorimetry*) i uzyskując wartości

$T_{m_{p57}}=51,6^{\circ}\text{C}$ i $T_{m_{p71}}=56,6^{\circ}\text{C}$. Aktywność biologiczna makrocyklicznych peptydów została potwierdzona w badaniach *in vitro* na komórkach modelowych linii limfocytarnej Jurkat T, które wykazywały nadekspresję powierzchniowego PD-1 oraz gen lucyferazy, którego ekspresja jest aktywowana podczas aktywacji limfocytów T oraz ulega wyciszeniu w chwili oddziaływania PD-1 z PD-L1. Komórki te były poddane ekspozycji na komórki linii chemicznego nowotworu jajnika CHO, które wykazują nadekspresję ludzkiego PD-L1. Na drodze interakcji PD-L1 z PD-1 dochodziło do wyciszenia aktywności komórek Jurkat T, mierzonej poprzez spadek aktywności lucyferazowej. Makrocykliczne peptydy hamowały interakcję PD-1/PD-L1 w sposób zależny od dawki, co przywracało aktywność komórek linii Jurkat T. Wartość stężenia, która powoduje połowę maksymalnej odpowiedzi biologicznej EC_{50} (ang. *Half-maximal effective concentration*) wynosiła dla peptydów p57 i p71 odpowiednio 566 nM i 293 nM, co również wskazywało na wyższą aktywność p71 w porównaniu do p57. Makrocykliczny peptyd p99 wykazywał najniższą aktywność spośród badanych związków, a wartość jego EC_{50} wynosiła 6,3 μM . Badania strukturalne wykazały, że p57 i p71 częściowo okupują miejsce na powierzchni PD-L1, z którym wiąże się PD-1 (p99 nie został poddany charakterystyce strukturalnej). Oddziaływania mają charakter hydrofobowy jak i polarny zarówno podczas wiązania p57 jak i p71. Szczegółowa analiza struktur krystalicznych pokazuje inny zestaw interakcji p57 i p71 z PD-L1 w porównaniu do PD-1. Różnice widoczne są również w sposobie wiązania obu peptydów, co wynika z odmiennego składu aminokwasowego, ale również z odmiennego ułożenia łańcuchów polipeptydowych w przestrzeni. Niektóre aminokwasy PD-L1 oddziałują zarówno z p57 oraz z p71 (np.: Ile54, Tyr56, Asn63, Gln66, Met115), jednak żadna pojedyncza reszta jednego peptydu nie tworzy interakcji z PD-L1 w taki sam sposób jak reszta drugiego peptydu. Autorzy pracy zwracają również uwagę, że niektóre reszty makrocyklicznych peptydów p57 i p71 naśladują kluczowe oddziaływania przeciwciał terapeutycznych Avelumab czy BMS-936559 z PD-L1 na zasadzie mimetyki strukturalnej. Jednak w przypadku p71 zaobserwowano znacznie dokładniejsze dopasowanie przestrzenne peptydu do powierzchni PD-L1 w porównaniu do przeciwciała BMS-936559 [418]. Ganesan i wsp. rozszerzyli charakterystykę p57 o wyznaczenie, metodą MST (ang. *Microscale thermophoresis*), stałej dysocjacji kompleksu p57-PD-L1, która wynosiła 19 ± 2 nM, jak również wykazali brak

cytotoksyczności peptydu względem modelowych komórek: CHO oraz Jurkat T [420]. W późniejszym czasie Magier-Mularz i wsp. wykazali, że p57 oddziałuje z ludzkim PD-L1, ale nie z jego mysim odpowiednikiem [421]. Wynik ten zwraca uwagę na fakt, że należy zachować szczególną ostrożność podczas walidacji właściwości terapeutyków skierowanych przeciwko osi PD-1/PD-L1 w warunkach *in vivo*. Problem ten nie występuje, jeśli do badań wykorzystuje się humanizowane myszy, u których ekspresja mysiego targetu (w tym przypadku PD-L1) została zastąpiona przez ludzki wariant [421]. W roku 2023 Barham i wsp. zademonstrowali humanizowane myszy HuPD-H1, które wykazują ekspresję ludzkich domen zewnątrzkomórkowych białek PD-1 i PD-L1 [422].

Oddziaływanie makrocyklicznych peptydów z PD-L1 wskazuje na ścisłą korelację pomiędzy strukturą a aktywnością w obrębie każdej z klas makrocyklicznych peptydów BMS. Przykładem jest zmiana Phe1 (p71) na Ala1 (p72) prowadząca do 600-krotnego spadku powinowactwa peptydu w teście HTRF. Z kolei zmiana Tyr11 (p71) na Ala11 (p83) powoduje pięciokrotny wzrost wartości Ki [331], [418]. Zależność struktury i aktywności została również dobrze uwidoczniona w 2022 r. przez Jouini i wsp., którzy podjęli próbę radioizotopowego znakowania p71 w celu otrzymania narzędzia do wizualizacji guza podczas obrazowania PET (ang. *Positron emission tomography*) [423]. Ze względu na niską wydajność syntezy i brak możliwości oddzielenia głównego produktu od zanieczyszczeń, p71, który pierwotnie miał zostać użyty do doświadczeń, został zastąpiony peptydem p78. Wartość Ki hamowania interakcji PD-1/PD-L1 dla p71 oraz p78 wynosiła odpowiednio 7 nM oraz 14 nM w teście HTRF. Różnica tylko jednej reszty aminokwasowej ^mGly4 (N-metyloglicyna; p71) i Gly4 (p78) powodowała dwukrotny spadek aktywności peptydu. Przykład ten pokazuje, że niewielkie zmiany w sekwencji peptydu mogą znacząco wpłynąć na ich powinowactwo do targetu. Ponadto znakowanie radioizotopowe C-końcowej reszty glicyny p78 spowodowało prawie 10-krotny spadek aktywności peptydu, przez co zaniechano dalszych badań z jego udziałem [423]. Z tego powodu istotne jest przeszukiwanie nie tylko bibliotek makrocyklicznych peptydów, ale również testowanie wielu linkerów i znaczników, które jak najmniej będą interferować z aktywnością peptydu.

Po raz pierwszy charakterystykę strukturalną makrocyklicznego peptydu należącego do klasy III przedstawiono dla peptydu p101 [398]. W teście HTRF peptyd p101 wykazywał najwyższy spośród klasy III potencjał hamujący interakcję PD-1/PD-L1; wartość K_i wynosiła 120 nM [331]. Makrocykliczny peptyd p101 wykazywał zdolność do hamowania tworzenia kompleksu PD-1/PD-L1 podczas badań fizykochemicznych oraz w testach komórkowych *in vitro* polegających na analizie przywracania aktywności komórek linii Jurkat T zahamowanej na drodze zależnej od osi PD-1/PD-L1. Analiza struktury krystalicznej kompleksu pozwoliła określić miejsca interakcji p101 na powierzchni PD-L1. Interakcje peptydu z białkiem miały głównie charakter hydrofobowy. Powierzchnia wiązania p101 pokrywa się z powierzchnią wiązania PD-1 na powierzchni PD-L1. Silny mimetyzm strukturalny widać dla reszt Phe1 i Phe10 peptydu p101, które naśladują odpowiednio Ala132 i Ile134 białka PD-1. Z kolei Ile3 i Ile5 p101 naśladują fragmenty struktury białka PD-1 utworzone przez reszty Tyr68, Ile126 i Leu128. Podobnie jak w przypadku p57 i p71 obserwowano interakcję p101 z resztami PD-L1 takimi jak Ile54, Tyr56, Gln66, Arg113 czy Met115. Co ciekawe, makrocykliczny peptyd p101 wykazuje dychotomiczny sposób interakcji z PD-L1, czego nie obserwowano dla p57 i p71. Podczas analizy struktury krystalograficznej kompleksu p101-PD-L1 obserwowano dwa alternatywne miejsca interakcji na powierzchni PD-L1, które były przesunięte względem siebie o ok. 1,7Å wzdłuż długiej osi inhibitora p101. Każda z konformacji makrocyklicznego peptydu została wyraźnie opisana poprzez odpowiadające im gęstości elektronowe otrzymane z wysoką rozdzielczością 1,54 Å. Jest to zjawisko o tyle ciekawe, że dualistyczna natura interakcji p101 jest widoczna dla całej cząsteczki, a nie tylko dla niektórych jej fragmentów. Ponieważ jest to pierwsza charakterystyka strukturalna makrocyklicznego peptydu należącego do klasy III, to podejrzewano, że pozostałe makrocykliczne peptydy tej klasy również mogą wykazywać podobny dychotomiczny charakter interakcji z PD-L1 [398].

W ostatnim czasie firma Bristol-Meyers Squibb opracowała także makrocykliczny peptyd o nazwie BMS-986189 posiadający stałą inhibicji $K_i=1,03$ nM w teście HTRF. BMS-986189 zbudowany jest z 45 metylowanych reszt aminokwasowych i posiada w swojej budowie 14 wiązań amidowych i jedno tioeterowe. Dokładna budowa BMS-986189 nie została ujawniona. W roku 2018 zakończyły się badania kliniczne fazy I,

których celem było poznanie farmakodynamiki, farmakokinetyki i bezpieczeństwa makrocyklicznego peptydu BMS-986189 u zdrowych osób. Do tej pory nie opublikowano wyników powyższego badania [331], [424]–[426]. W swojej pracy Vinogradov i wsp. wspomina, że firma BMS opracowała pewien obiecujący makrocykliczny peptyd o wysokim potencjale hamującym interakcję PD-1/PD-L1 współpracując z firmą PeptiDream, która tworzy rozbudowane i zróżnicowane biblioteki makrocyklicznych peptydów, jednak autorzy pracy nie określają o jaki peptyd chodzi. Firma PeptiDream opublikowała jedynie informację o opracowaniu analogu makrocyklicznego peptydu BMS-986189, który miał być poddany badaniom klinicznym w roku 2022, jednak do tej pory nie pojawiły się informacje o rozpoczęciu tego badania. Firma PeptiDream była również zaangażowana w produkcję znakowanego radioizotopowo peptydu BMS-986229, który docelowo ma być wykorzystany jako narzędzie diagnostyczne podczas obrazowania PET. Makrocykliczny peptyd BMS-986229 jest w trakcie pilotażowych badań klinicznych [346].

Przełomem w projektowaniu inhibitorów PD-1/PD-L1 było poznanie struktury przestrzennej kompleksu tych białek, a w późniejszym czasie struktur PD-L1 lub PD-1 w kompleksie z antagonistami takimi jak przeciwciała czy inhibitory chemiczne lub peptydy. Jednak poziom wiedzy na temat makrocyklicznych peptydów opracowanych przez firmę Bristol-Meyers Squibb hamujących interakcję PD-1/PD-L1 jest w dalszym ciągu niewielki. Dostępne struktury krystaliczne makrocyklicznych peptydów z PD-L1 wskazują, że nie tylko oddziałują one w tym samym miejscu co PD-1, ale częściowo pokrywają się również z pozycją epitopów rozpoznawanych przez przeciwciała terapeutyczne. W każdym z peptydów BMS obecne są reszty aminokwasów aromatycznych, które są istotnym elementem imitującym oddziaływanie PD-1 z PD-L1 [393].

Warto dodać, że w roku 2022 Bojko i wsp. zaprojektowali i zsyntezowali szereg makrocyklicznych peptydów skierowanych przeciwko PD-L1. Co ciekawe, peptydy te zostały zaprojektowane dzięki szczegółowej analizie struktury kompleksu PD-1/PD-L1 i były zbudowane z różnych fragmentów domeny białka PD-1 zaangażowanej w interakcję z PD-L1. Cyklizacja peptydów została wprowadzona poprzez zastąpienie

wybranych aminokwasów resztami cysteiny, co pozwoliło na utworzenie mostka disulfidowego zamykającego pierścień. Dzięki temu, peptydy występowały w formie spinki do włosów (ang. β -*hairpin*) naśladując strukturę drugorzędową fragmentu białka PD-1 zaangażowanego w PPI. Autorzy potwierdzili zależną od dawki aktywność biologiczną wybranych peptydów. Chociaż otrzymany poziom hamowania interakcji PD-1/PD-L1 w układzie komórkowym *in vitro* nie był zadowalający, to wyniki tych badań mogą być wykorzystane do dalszego opracowywania makrocyklicznych peptydów [352].

Wiedza o strukturalnych mechanizmach interakcji PD-L1 z różnymi ligandami jest istotna dla racjonalnego projektowania inhibitorowych makrocyklicznych peptydów o odpowiednich właściwościach fizykochemicznych, wysokim powinowactwie i specyficzności.

W momencie przygotowywania tej pracy źródła literaturowe podają charakterystykę kilku spośród wszystkich makrocyklicznych peptydów anty-PD-L1 znajdujących się w bibliotece BMS [398], [418], [427]. Dane te nie są wystarczające do pełnej charakterystyki każdej z klas makrocyklicznych peptydów BMS. Najbardziej intrygującą jest klasa III makrocyklicznych peptydów dla jedynego scharakteryzowanego przedstawiciela tej klasy, p101, zaobserwowano bifurkacyjny sposób oddziaływania z PD-L1. Pozostaje do wyjaśnienia, czy ten charakter oddziaływania jest typowy dla całej klasy III makrocyklicznych peptydów BMS.

5. Cele naukowe

Przedstawiona praca opisuje trzy strategie immunoterapii przeciwnowotworowej skierowanej przeciwko osi PD-1/PD-L1. Moje badania dotyczyły dwóch nurtów: (i) immunoterapii aktywnej, w ramach której przedstawiłam potencjalne zastosowanie bakterii *S. Typhimurium* jako nośnika dostarczającego białka terapeutyczne do tkanki guza, gdzie białko to mogłoby hamować interakcję PD-1/PD-L1 oraz (ii) immunoterapii pasywnej, w ramach której przedstawiłam charakterystykę nowych aptamerów ssDNA oraz makrocyklicznego peptydu BMS klasy III jako inhibitorów osi PD-1/PD-L1. Przedstawione w pracy badania obejmowały następujące szczegółowe cele badawcze:

1. Wprowadzenie delecji genów *fliC* oraz *flgK* do genomu bakterii *S. Typhimurium* atenuowanego szczepu VNP20009 oraz szczepu dzikiego LT2 wraz z charakterystyką wpływu mutacji na niektóre cechy fenotypowe bakterii.
2. Weryfikacja hipotezy, że otrzymane nowe szczepy zmutowanych bakterii są w stanie produkować i wydzielać białka fuzyjne FlgL-HAC-V, FlgD-HAC-V oraz FlgM-HAC-V, które docelowo mają hamować interakcję PD-1/PD-L1.
3. Charakterystyka aptamerów ssDNA skierowanych przeciwko PD-L1 (L2c2s) oraz PD-1 (P2c2s i p34) w układzie komórkowym w warunkach *in vitro*, która obejmowała badanie poziomu wiązania aptamerów do PD-L1 i PD-1 na powierzchni komórek, określenie aktywności biologicznej aptamerów jako inhibitorów kompleksu PD1/PD-L1 oraz ich cytotoksyczności względem badanych komórek.
4. Charakterystyka fizykochemiczna i strukturalna peptydu p104, drugiego badanego przedstawiciela III klasy makrocyklicznych peptydów BMS, w kompleksie z PD-L1.
5. Weryfikacja hipotezy zakładającej, że bifurkacyjny mechanizm interakcji makrocyklicznych peptydów BMS klasy III z PD-L1 jest cechą charakterystyczną całej grupy.
6. Badanie aktywności biologicznej makrocyklicznego peptydu p104 jako inhibitora oddziaływania PD1 i PD-L1 w układzie komórkowym w badaniach *in vitro*.

6. Materiały i metody

6.1 Materiały

Szczepy bakteryjne: *E. coli* BL21(DE3) (Sigma-Aldrich, USA), *E. coli* TOP10F' (Thermo Fisher Scientific, USA), *S. Typhimurium* VNP20009 (w darze od dra Michała Berety, Katedra Immunologii, Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum), *S. Typhimurium* LT2 (w darze od dra Grzegorza Grabe, Department of Infectious Disease, Imperial College London, Wielka Brytania).

W celu rozpoczęcia prac z użyciem wymienionych szczepów bakteryjnych, wnioskowałam o wydanie zgody przez Ministerstwo Środowiska na zamknięte użycie mikroorganizmów genetycznie modyfikowanych kategorii II. Numer wniosku: 01.2-122/2017, numer zgody: DOP-GMO.431.9.2018.

Linie komórkowe: Mysia linia monocytarno-makrofagowa RAW234.7 (TIB-71, ATCC, USA), chemiczna linia nowotworu jajnika aAPC/CHO-K1 (Promega, USA), aAPC/CHO-K1 wykazujące nadekspresję ludzkiego PD-L1 i aktywatora TCR (Promega, USA), ludzka linia limfoidalna Jurkat T z nadekspresją genu PD-1 i posiadająca gen lucyferazy pod kontrolą promotora NFAR (Promega, USA), ludzka linia komórek raka nerkowokomórkowego 786-O (CRL-1932, ATCC, USA), ludzka linia nowotworu nerki Caki-2 (HTB-47, ATCC, USA)

Plazmidy: pKD46, pKD3, pCP20 (w darze od dra Grzegorza Grabe, Department of Infectious Disease, Imperial College London, Wielka Brytania); pGFPuv (Clontech), pBR322-PSiFglg-c'1 (własność Zakładu Biochemii Komórki WBBIB UJ), pET-21b-PD-L1 (własność Pracowni Krystalografii Białek, MCB UJ).

Marocykliczne peptydy: p104 (Caslo, Diplomvej, Dania).

Odczynniki wykorzystywane do hodowli komórek eukariotycznych

Nazwa	Producent
Akutaza, HBSS, Hygromycyna, Trypsyna/EDTA	Thermo Fisher Scientific, USA
DMEM, Opti-MEM, PBS, RPMI 1680	Lonza, Szwajcaria
DMSO	BioShop, Kanada
FBS	Immuniq, Polska
Genetycyna (G418)	InvivoGen, USA
Gentamycyna	Sigma-Aldrich, USA

Odczynniki do pracy z DNA

Nazwa	Producent
Afel, EcoRI, NdeI, CutSmart, 2.1 NEB Buffer, Ligaza QuickLigase	New England Biolabs, USA
Bromek etydyny	BioShop, Kanada
5x Phusion Green buffer, Polimeraza Phusion High-Fidelity, Marker O'Gene Ruler DNA Ladder MIX	Thermo Fisher Scientific, USA

Odczynniki do pracy z białkami

Zestawy buforów do krystalizacji białek

Nazwa	Producent
JCSG+, LBM, Macrosol/STura, Memgold, MIDAS, Morpheus, Pact, PEG/Salt, Proplex, SG1, Structure	Molecular Dimensions, Wielka Brytania

Zestaw buforów do oczyszczania białka PD-L1

Nazwa	Skład
Bufor płuczący	50 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM 2-merkaptioetanol, 0,5% Triton-X
Bufor rozpuszczający	6 M chlorowodorek guanidyny, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM NaCl, 10 mM 2-merkaptioetanol
Bufor do refałdowania	1M L-arginina pH 8,0, 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,25 mM utleniony glutation, 0,25 mM zredukowany glutation
Bufor dializacyjny	10 mM Tris-HCl pH 8,0, 20 mM NaCl
Bufor do sączenia molekularnego	10 mM Tris-HCl pH 8,0, 20 mM NaCl
Bufor elektroforetyczny SDS-PAGE	25 mM Tris-HCl, 200 mM glicyna, 0,1% w/v SDS

Bufor barwiący Coomassie	0,045% Coomassie Blue R-250, 10% kwas octowy
Bufor odbarwiający	10% kwas octowy, 30% metanol
Pozostałe bufory i pożywki	
TAE	40 mM Tris-HCl, 20 mM kwas octowy, 1 mM EDTA
5× stężony bufor obciążający do białek	200 mM Tris-HCl pH 6,8, 40% v/v glicerol, 10% w/v SDS, 0,05% w/v błękit bromofenolowy, 10 mM 2-merkaptotetanol
6× stężony bufor obciążający do DNA	0,03% w/v błękit bromofenolowy, 0,03% w/v cyjanoksylen FF, 60 mM EDTA pH 7,6, 60% glicerol (v/v)
MSB	1% w/v biotrypton, 0,5% w/v ekstrakt drożdżowy, 2 mM CaCl ₂ , 2 mM MgSO ₄
SOC	2% w/v biotrypton, 0,5% w/v ekstrakt drożdżowy, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM glukoza, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄
Pożywka minimalna do znakowania aminokwasów izotopem ¹⁵ N (podano na 1 L pożywki)	0,5 g NaCl, 1,3 mL pierwiastków śladowych, 1 g monohydratu kwasu cytrynowego, 36 mg cytrynianu żelaza, 4,02 g KH ₂ PO ₄ , 7,82 g K ₂ HPO ₄ × 3 H ₂ O, 1 mL Zn(Ac) ₂ -EDTA, 1 g NH ₄ Cl- ¹⁵ N, 25 mL 20% glukozy, 560 μL siarczaniu tiaminy, 2 mL 1 M MgSO ₄

Złóża i kolumny chromatograficzne

Chromatografia wykluczania (Filtracja żelowa)

Nazwa	Producent
HiLoad 16/600 Superdex 75 pg	GE Healthcare, LifeScience, USA

Przeciwciała

Nazwa	Producent
Atezolizumab	Roche, Szwajcaria
J105	Thermo Fisher Scientific, USA
MIH1	Thermo Fisher Scientific, USA
końskie anty-mysie IgG sprzęgnięte z peroksydazą chrzanową (HRP)	Cell Signaling Technology, USA
mysie anty-DnaK	Abcam, Wielka Brytania
mysie M2 anty-FLAG	Sigma-Aldrich, USA
Nivolumab	Bristol Myers Squibb, USA

Pozostałe odczynniki i zestawy

Nazwa	Producent
(NH ₄) ₂ SO ₄ , 30% roztwór akrylamid/bisakrylamid, Agar, Ampicylina, APS, Biotrypton, CaCl ₂ , CBB R-250, DMSO, EDTA, Ekstrakt drożdżowy, Glicerol, L-Glicyna, Kanamycyna, KCl, L-arabinoza, LB, MgSO ₄ , Na ₂ HPO ₄ , NaCl, NaH ₂ PO ₄ , Odtłuszczone mleko, SDS, TEMED, Tris, Tween20, β-Merkaptoetanol	BioShop, Kanada
Aceton, Błękit bromofenolowy, Cytrynian trisodowy, D-glukoza, HCl, Kwas octowy, Metanol, MgCl ₂ , NaOH, TCA	POCH, Polska
Błękit trypanu, MTT, Triton X-100	Sigma-Aldrich, USA, USA
IPTG	A&A Biotechnology, Polska
Membrana PVDF, PageRuler prebarwiona drabinka do białek, Substart ECL Pierce	Thermo Fisher Scientific, USA
Plasmid MINI Kit	Syngen, Polska
QiaGen zestaw do ekstrakcji z żelu	QiaGen, Niemcy
Substart Bio-Glo	Promega, USA

Urządzenia oraz materiały zużywalne:

Nazwa	Producent
Aparat do rozdzielania elektroforetycznego białek, Aparat do rozdzielania elektroforetycznego DNA, Elektroporator MicroPulser, Kuwety elektroporacyjne	Bio-Rad, USA
Bioseparator Amicon, Wirówkowe jednostki filtracyjne	Merck, Niemcy
Cytometr przepływowo FACSCalibur	Becton Dickinson, USA
Czytnik płytkowy Infinite M200	Tecan, Szwajcaria
Homogenizator ultradźwiękowy Branson Digital Sonifier Model 450	Marshall Scientific, USA
Homogenizator ultradźwiękowy UP50H Homogenizator	Hielscher, Niemcy
Inkubator do hodowli komórkowych New Brunswick Galaxy 170 R CO ₂ , Termoblok, Wirówka Eppendorf 5427 R, Wirówka Eppendorf 5804, Wyrząsarka bakteryjna New Brunswick Innova 44	Eppendorf, Niemcy
Naczynia hodowlane i plastiki zużywalne	Sarstedt, Niemcy
Płytki do pomiarów luminescencji	Greiner, Austria
Spektrofotometr Implen OD600	Implen, Niemcy
Spektrofotometr ND-1000	NanoDrop Technologies, USA
Spektrometr NMR Bruker Avance 600 MHz	Bruker, USA
System do detekcji chemiluminescencji FUSION FX, System do dokumentacji fotograficznej żeli DNA	Vilber, Francja
systemu chromatografii cieczowej AKTAexplorer	Vilber, Francja
Termocykler	GE Healthcare, Szwecja AnalytikJena, Niemcy

Programy komputerowe:

FusionCapt Advice	Vilber, Francja
iInfinite 2000	Tecan, Szwajcaria
Cell Quest Pro, FlowJo	Becton Dickinson, USA
Graph Pad Prism 5	GraphPad Software Inc., USA
PyMol	Schrödinger Inc., USA
PowerPoint	Microsoft, USA
Photoshop 7.0 (2002)	Adobe Systems, USA
Discovery Studio Visualizer	Dassault Systemes BIOVIA, USA
FinchTV	Digital World Biology, USA
Oprogramowanie CCP4	Daresbury Laboratory, Wielka Brytania

6.2 Metody

6.2.1 Hodowle komórkowe

Komórki linii RAW264.7 hodowano w pożywce DMEM z wysoką zawartością glukozy (4,5 g/L) z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej (FBS) i stabilizowanej glutaminą (GlutaMAX). Komórki Jurkat T, aAPC/CHO-K1 oraz 786-O hodowano w pożywce RPMI 1640 z dodatkiem 10% FBS. Linie komórek Jurkat T ze stabilną nadekspresją ludzkiego PD-1 i posiadających gen lucyferazy pod kontrolą promotora NFAT (dalej nazywane Jurkat PD-1) oraz komórki aAPC/CHO-K1 z nadekspresją ludzkiego PD-L1 i aktywatora TCR (dalej nazywane aAPC/CHO-K1 hPD-L1) były hodowane w pożywce uzupełnionej higromycyną B (50 µg/mL) i genetycyną (250 µg/mL). Wszystkie linie komórkowe były hodowane w warunkach standardowych (37°C, 5% nasycenie CO₂, wilgotność 95%). Komórki pasażowano (1:9), gdy osiągnęły 90% pokrycia powierzchni dna butelki do hodowli. Pasaże wykonywano poprzez przemywanie buforem PBS, a następnie inkubację w roztworze trypsyna/EDTA w 37°C do momentu odzepienia się większości komórek od podłoża. Pasaż komórek Jurkat T był prowadzony poprzez rozcieńczenie (1:9) zawiesiny o gęstości 1×10⁶/mL.

Komórki przechowywano w odpowiedniej pożywce uzupełnionej o 10% FBS oraz DMSO (10% v/v) w temperaturze -80°C.

6.2.2 Hodowle bakteryjne

Bakterie szczepów *E. coli* TOP10F' i BL21(DE3) hodowano w pożywce LB w 37°C z wytrząsaniem 220 rpm. Bakterie szczepu *S. Typhimurium* VNP20009 i LT2 hodowano w medium MSB w 30°C z wytrząsaniem 180 rpm lub w 37°C przez noc (w zależności od wykonywanej procedury). Hodowle na podłożu zestalonym agarem (15 g/L) prowadzono na szalkach Petriego. Bakterie były zamrażane w ciekłym azocie i przechowywane w 15% roztworze glicerolu w temperaturze -80°C.

6.2.3 Przygotowanie bakterii kompetentnych

Wykonano posiew redukcyjny bakterii szczepów *E. coli* TOP10F' i BL21(DE3) oraz *S. Typhimurium* VNP20009 i LT2 i hodowano je w temperaturze 37°C przez noc. Następnie pojedynczą kolonię danego szczepu przeniesiono do hodowli płynnej i prowadzono ją w temperaturze 37°C przez noc. Całonocne hodowle bakteryjne rozcieńczano do uzyskania wartości $OD_{600} = 0,06$ w 200 mL świeżego medium i hodowano do osiągnięcia wartości $OD_{600} = 0,4$.

Bakterie kompetentne *E. coli* TOP10F' i BL21(DE3) otrzymywano wg standardowego protokołu poprzez przemywanie zimnym (4°C) roztworem 100 mM $CaCl_2$ [428]. Następnie osad komórek zawieszano w 100 mM $CaCl_2$ z dodatkiem 20% glicerolu w objętości równej 1/50 objętości wyjściowej hodowli bakteryjnej i dzielono na porcje o objętości 100 μ L, które następnie zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -80°C.

Aby otrzymać elektrokompetentne bakterie, osad komórek bakteryjnych *S. Typhimurium* VNP20009 i LT2 trzykrotnie przemywano zimnym (4°C) roztworem 10% glicerolu w wodzie o poziomie czystości HPLC [429]. Następnie osad bakteryjny zawieszono w w.w. roztworze 10% glicerolu. Następnie zawiesinę komórek bakteryjnych porcjowano po 100 μ L zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -80°C. Gęstość komórek bakteryjnych po zawieszeniu mierzona liczbą jednostek zdolnych do wytworzenia kolonii (CFU) wynosiła ok. 5×10^9 CFU/50 μ L.

6.2.4 Transformacja poszczególnych szczepów bakteryjnych

Chemicznie kompetentne bakterie szczepów *E. coli* TOP10F' i BL21(DE3) transformowano zmodyfikowaną metodą szoku cieplnego [428]. Mieszaninę bakterii z dodatkiem 100 ng plazmidowego DNA inkubowano na lodzie przez 10 min, następnie poddawano szokowi cieplnemu przez inkubację w 42°C przez 45 s, przenoszono na lód, gdzie inkubowano je przez 2 min. Do bakterii dodawano 1 mL medium LB i inkubowano je w 37°C/100 rpm/1 h. Bakterie wirowano przy 15 000 × g przez 30 s, wysiewano na podłoże stałe LB z odpowiednimi antybiotykami i hodowano w 37°C przez noc [430].

Elektrokompetentne bakterie szczepów *S. Typhimurium* VNP20009 i LT2 transformowano metodą elektroporacji [429]. Bakterie oraz kuwetę do elektroporacji o szerokości szczeliny elektroporacyjnej 0,1 cm inkubowano w lodzie przez 10 min. Do porcji bakterii dodawano 100 ng plazmidowego lub liniowego fragmentu DNA, a następnie przeprowadzano elektroporację używając napięcia elektrycznego 18 kV/cm wg zaleceń producenta. Natychmiast po wygenerowaniu impulsu elektrycznego dodawano 1 mL medium SOC. Bakterie hodowano w 37°C bez wytrząsania przez 1 h. Następnie bakterie wirowano przy 15 000 × g przez 30 s i wysiewano na podłoże stałe LB zestalone agarem z odpowiednimi antybiotykami i hodowano w temperaturze 37°C przez 16 h. Elektroporacja plazmidem pKD46 była prowadzona pod napięciem 25 kV/cm; inkubacja w pożywce SOC bakterii transformowanych pKD46 i pCP20 była prowadzona przez 4 h w temperaturze 30°C ze względu na obecność miejsca ori wrażliwego na temperaturę powyżej 37°C.

6.2.5 Konstrukcja kasety genowej Km^R służącej do delecji genów *fliC*, *fljB* i *flgK* z genomu bakterii *S. Typhimurium* szczepów VNP20009 i LT2

Kaseta genowa, która umożliwia wprowadzenie delecji wybranego fragmentu genomu bakterii zawiera gen oporności na kanamycynę Km^R. Sekwencja Km^R została powielona techniką PCR z wykorzystaniem starterów zawierających sekwencje flankujące geny *fliC*, *fljB* lub *flgK*, umożliwiającymi zajście homologicznej rekombinacji w genomie bakterii. Matrycą genu Km^R był plazmid pKD4 zawierający sekwencje FLP na końcach 3' i 5' genu Km^R, które są niezbędne do usunięcia kasety Km^R po wprowadzeniu delecji w genomie. Mieszanina reakcyjna PCR przygotowana w buforze Phusion Green

zawierała polimerazę Phusion, 0,5 U, bufor Phusion Green, 0,2 mM dNTP, 0,2 µM startera przedniego (F) i wstecznego (R), 2,5% DMSO (v/v) oraz 50 ng plazmidowego DNA. Reakcję prowadzono w objętości 20 µL. Schemat temperaturowo-czasowy reakcji PCR był następujący: 1) 95°C/2 min, 2) 95°C/30 s, 3) 72°C/30 s, 4) 72°C/1 min, 5) 72°C/5 min z powtórzeniem kroków 2-4 – 31 razy. Sekwencje nukleotydowe użytych starterów przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Sekwencje oligonukleotydów użytych do uzyskania kaset Km^R.

Gen	Nazwa	Sekwencja 5'→3'
<i>fliC</i>	FliC_Km_F	CCTTGATTGTGTACCACGTGTCGGTGAATCAATCGCCGGAT <u>GTAGGCTGGAGCTGCTTC</u> <u>G*</u>
	FliC_Km_R	AGCCAATAACATCAAGTTGTAATTGATAAGGAAAAGATCCATATGAATATCCTCCTTAG GAGGATTGCTTTATCAAAAACCTTCCAAAAGGAAAATTTTGTGTAGGCTGGAGCTGCTT
<i>fljB</i>	FljB_Km_F	<u>CG</u>
	FljB_Km_R	AAAAGCCCCGAATTCACGGGGCTGAATAAAACGAAATAAACATATGAATATCCTCCTTA <u>G</u>
<i>flgK</i>	FlgK_Km_F	CGATAACAACGAGTATTGAAGGATTAAGGAACCATCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC <u>G</u>
	FlgK_Km_R	TACGCATGTCATCCTTCTCCTTTAGCGAATATTCAATAACGCATCAAACCATATGAATATC <u>CTCCTTAG</u>

* Sekwencje FLP umożliwiające rekombinację homologiczną podkreślono

Produkty PCR rozdzielono elektroforetycznie w 0,8% żelu agarozowym w buforze TAE z dodatkiem bromku etydydy pod napięciem elektrycznym 8,5 V/cm. Żel analizowano w aparacie do wizualizacji DNA. Prążki odpowiadające wielkością spodziewanym produktom reakcji PCR wycięto z żelu i DNA wyizolowano za pomocą zestawu QiaGen Gel Extraction Kit.

6.2.6 Delecje fragmentów chromosomowego DNA w bakteriach *S. Typhimurium* szczepów VNP20009 i LT2

W pracy wykorzystano strategię wprowadzania delecji fragmentów chromosomowego DNA z użyciem plazmidów pKD46 i pCP20. Plazmidy te posiadają geny kodujące rekombinazy, które umożliwiają zajście rekombinacji pomiędzy sekwencjami homologicznymi obecnymi w chromosomie bakteryjnym i w kasecie oporności na antybiotyki (w tym przypadku kanamycynę) [431]. Komórki elektrokompetentne szczepów *S. Typhimurium* VNP20009 i LT2 transformowano plazmidem pKD46, według procedury opisanej w rozdziale 6.2.4 i w [432]. Pojedyncze kolonie bakterii zostały zawieszono w 5 mL pożywki MSB z dodatkiem ampicyliny

(100 µg/mL). Inkubację prowadzono w temperaturze 30°C/180 rpm przez 16 h. W celu indukcji ekspresji rekombinazy λRed, całonocne hodowle bakteryjne rozcieńczano do uzyskania wartości $OD_{600} = 0,06$ w 200 mL świeżego medium z dodatkiem 0,2% L-arabinozy i ampicyliny (100 µg/mL) i hodowano do osiągnięcia wartości $OD_{600} = 0,6$. Bakterie były ponownie ukompetentniane według procedury opisanej w rozdziale 6.2.3, a następnie poddawane elektroporacji liniowym fragmentem DNA zawierającym kasetę oporności na kanamycynę Km^R (opisano w rozdziale 6.2.5). Aktywność rekombinazy λRed pozwala na zajście homologicznej rekombinacji pomiędzy homologicznymi odcinkami DNA znajdującymi się w obrębie wprowadzanej kasety (fragmenty flankujące gen oporności na kanamycynę) oraz w regionach genomowego DNA flankujących gen przeznaczony do usunięcia. Bakterie hodowano na podłożu stałym w temperaturze 30°C z dodatkiem kanamycyny (20 µg/mL). Wprowadzenie kasety Km^R potwierdzono metodą PCR z pojedynczych kolonii bakteryjnych (ang. *colony PCR*) z użyciem starterów z Tabeli 2 [433]. Wybrane klony były namnażane w hodowli płynnej z dodatkiem kanamycyny (10 µg/mL) w temperaturze 42°C przez 5 dni w celu usunięcia plazmidu pKD46, którego ori jest wrażliwe na temperaturę powyżej 37°C [431]. Następnie bakterie wysiano na podłoże stałe z dodatkiem kanamycyny (20 µg/mL) i hodowano w 37°C przez noc. Pojedyncze kolonie były testowane na obecność plazmidu pKD46 poprzez ich punktowe zaszczepianie na podłoża stałe na trzech oddzielnych płytkach: (i) z dodatkiem kanamycyny (20 µg/mL) albo (ii) ampicyliny (100 µg/mL) albo (iii) bez antybiotyków. Bakterie hodowano przez noc w temperaturze 30°C, a następnie wybierano te klony, które wyrosły jedynie na podłożu z kanamycyną oraz na podłożu bez antybiotyków (tj. te klony, które utraciły plazmid pKD46, a przez to nie niosły oporności na ampicylinę). Wybrany klonem bakterii zaszczepiono hodowlę płynną (z dodatkiem kanamycyny w stężeniu 20 µg/mL), którą prowadzono w warunkach 37°C/180 rpm przez noc. Bakterie zostały ponownie poddane procedurze ukompetentniania a następnie elektroporacji plazmidem pCP20, kodującym rekombinazę FLP. Bakterie wysiano na podłoże stałe z dodatkiem kanamycyny (20 µg/mL) i ampicyliny (100 µg/mL) i hodowano w 30°C przez noc. Pojedyncze kolonie pobrano jako inokulum do hodowli całonocnych, które również prowadzono w 30°C/180 rpm przez noc. Następnie hodowle rozcieńczono do wartości $OD_{600} = 0,06$ w 200 mL świeżego medium z dodatkiem 0,2% L-arabinozy

i ampicyliny (100 µg/mL) w celu indukcji ekspresji rekombinazy FLP, której aktywność prowadzi do usunięcia kasety oporności na kanamycynę. W efekcie bakterie zostają pozbawione egzogenego markera selekcyjnego, co minimalizuje stopień ingerencji w ich genom. Podobnie jak w przypadku pKD46, ori pCP20 jest również нефункционалне w wysokiej temperaturze i dlatego plazmid ten mógł być usunięty z bakterii poprzez 5-dniową hodowlę w 42°C. Następnie bakterie były wysiewane na podłoże bez antybiotyków, a pojedyncze klony przenoszone na płytki z kanamycyną (20 µg/mL) lub ampicyliną (100 µg/mL) oraz podłoże bez antybiotyków w celu wyselekcjonowania tych kolonii, które utraciły zarówno genomową kasetę Km^R jak i plazmid pCP20. Klony obecne jedynie na podłożu bez antybiotyków były ostatecznym produktem serii modyfikacji genetycznych z delecją wybranego genu oraz usunięciem przejściowo wprowadzonej kasety Km^R [431].

Pozyskane mutanty bakterii szczepów VNP20009 $\Delta fliC$ oraz LT2 $\Delta fliC$ posłużyły jako organizmy wyjściowe do przeprowadzenia kolejnych delecji genów, a procedura była przeprowadzona analogicznie do protokołu przedstawionego powyżej. Sekwencje starterów wykorzystanych do konstrukcji kasety Km^R usuwającej *fljB* lub *flgK* przedstawiono w Tabeli 1 a starterów potwierdzających w reakcji PCR wprowadzenie kasety Km^R w miejscu *fljB* lub *flgK* przedstawiono w Tabela 2.

6.2.7 Analiza procesu delecji genów *fliC*, *fljB* i *flgK* metodą PCR z pojedynczych kolonii bakteryjnych uzyskanych w hodowli na podłożu stałym

Postępy procedury delecji genów w genomie bakterii monitorowano z wykorzystaniem metody PCR z pojedynczych kolonii bakteryjnych [433]. Połowę każdej pojedynczej kolonii bakteryjnej pobrano i zawieszono w 50 µL wody. Tak przygotowane zawiesiny bakterii inkubowano w 96°C przez 5 min. Do przygotowania mieszaniny reakcyjnej użyto roztworu 2×PCR MIX Plus, do której dodano startery w końcowym stężeniu 0,2 µM oraz 2 µL lizatu bakteryjnego. Reakcję prowadzono w objętości 20 µL, w warunkach: 1) 95°C/2 min, 2) 95°C/30 s, 3) 61°C/30 s, 4) 72°C/1 min, 5) 72°C/5 min z powtórzeniem kroków 2-4 – 31 razy. W Tabela 2 oraz

Tabela 3 zestawiono użyte pary starterów do analizy postępów delecji genów; w Tabeli 3 podano także oczekiwane wielkości produktów PCR. Produkty PCR rozdzielono elektroforetycznie według procedury przedstawionej w rozdziale 6.2.5.

Tabela 2. Sekwencje starterów użytych do potwierdzenia delecji genów w chromosomie bakterii *S. Typhimurium*

Gen	Nazwa	Sekwencja 5'→ 3'	Długość produktu PCR [pz]
<i>fliC</i>	FliC_flank (5'hom)_F	AATAACTGCAGGCCATTGCGTCAGGATCGTTT	973
<i>fljB</i>	FljB_flank_F	GGAAGAATTTTAGTCGCTTTTCTCATGGAGG	529
<i>flgK</i>	FlgK_flank_F	CAAGTCCACGTAGTCGCTGCCGATAAC	529
	Km_R*	GAGAACCTGCGTGCAATCCATCTTGTTC AAT	

* Starter Km_R był wspólny dla wszystkich reakcji PCR służących potwierdzeniu obecności kasety Km^R niezależnie od usuwanego genu

Tabela 3. Sekwencje starterów użytych do potwierdzenia usunięcia kasety Km^R z genomu bakterii *S. Typhimurium*

Gen	Nazwa	Sekwencja 5'→ 3'
<i>fliC</i>	FliC_Flank_F	CCTTGATTGTGTACCACGTGTCGGTGAATCAATCGCCGGA
	FliC_Flank_R	AGCCCAATAACATCAAGTTGTAATTGATAAGGAAAAGATC
<i>flgK</i>	FlgK_flank_F	ACGCTGCCGTGACCACTG
	FlgK_R	TGGCAAACGTACGCGCCA

Produkty PCR rozdzielono elektroforetycznie w 0,8% żelu agarozowym w buforze TAE i z dodatkiem bromku etydyyny i analizowano w aparacie do wizualizacji DNA.

6.2.8 Ocena żywotności bakterii i przygotowanie krzywej wzrostu *S. Typhimurium* szczepów VNP20009 i LT2

Przeżywalność bakterii po usunięciu genów została określona za pomocą zmodyfikowanego protokołu Milesa i Misry [434]. Bakterie szczepów *S. Typhimurium* VNP20009 i LT2 hodowano w warunkach standardowych jak opisano w punkcie 6.2.2 do momentu osiągnięcia wartości OD₆₀₀ = 0,5. Następnie bakterie umieszczano na lodzie, dwukrotnie przemywano zimnym (4°C) buforem PBS i wirowano (4000 × g/5 min/4°C). Zawiesinę bakterii rozcieńczono do 100 000 × metodą seryjnych dziesiętnych rozcieńczeń w PBS-ie, a następnie wysiano po 50 µL zawiesiny bakteryjnej na podłoże stałe z odpowiednimi antybiotykami w tryplikatach. Bakterie hodowano w temperaturze 37°C przez 16 h. Następnie zliczano kolonie i określano liczbę bakterii tworzących kolonie (CFU), co odpowiada liczbie żywych bakterii w zawiesinach wyjściowych. Analiza

statystyczna była prowadzona za pomocą testu U-Manna Whitneya dla bakterii szczepu VNP20009 oraz jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem Bonferroniego dla bakterii szczepu LT2 z wykorzystaniem programu GraphPad Prism 5.

Aby wyznaczyć krzywą wzrostu hodowle całonocne bakterii *S. Typhimurium* rozcieńczano do wartości $OD_{600} = 0,06$ w objętości 50 mL w kolbie o pojemności 250 mL. Hodowlę prowadzono przez 12 h w 37°C, pobierając co godzinę 0,5 mL hodowli i mierząc jej gęstość optyczną przy długości fali $\lambda=600$ nm [435]. Kiedy wartość OD_{600} osiągała wartość $\geq 0,4$, próbki rozcieńczano w pożywce hodowlanej przed przeprowadzeniem pomiaru, ponieważ po przekroczeniu tej wartości gęstość bakterii przestaje być wprost proporcjonalna do wartości OD_{600} [435]. Współczynnik rozcieńczenia został uwzględniony podczas wyznaczania krzywej wzrostu hodowli. Współczynnik wzrostu hodowli bakteryjnych wyznaczono ze wzoru: $\frac{2,303 \times (\lg OD_{600_2} - \lg OD_{600_1})}{\Delta t}$, gdzie OD_{600_1} i OD_{600_2} odpowiadają wartościom OD_{600} w kolejnych godzinach pomiaru.

6.2.9 Analiza stopnia zakażenia komórek RAW264.7 bakteriami *S. Typhimurium* szczepów VNP20009 i LT2

Szczepy bakteryjne VNP20009, VNP20009 $\Delta fliC$, LT2, LT2 $\Delta fliC$ i LT2 $\Delta fliC \Delta flgK$ zostały poddane elektroporacji plazmidem pBR322-PSiF-glg-c'1 niosącym gen kodujący białko zielonej fluorescencji, GFP, znajdujący się pod kontrolą promotora genu *sifB*, którego ekspresja zachodzi jedynie, gdy komórka bakteryjna znajdzie się wewnątrz komórki eukariotycznej. Procedurę elektroporacji opisano w rozdziale 6.2.4. Bakterie hodowano w warunkach standardowych do momentu osiągnięcia wartości $OD_{600} = 0,5$. Następnie bakterie umieszczano na lodzie, dwukrotnie przemywano zimnym (4°C) buforem PBS i zawieszano w pożywce Opti-MEM ogrzanej do temperatury pokojowej (RT). Tak przygotowane bakterie zostały użyte do zakażenia komórek linii RAW264.7.

Komórki RAW264.7 umieszczano w studzienkach 6-studniowej płytki hodowlanej w liczbie 300 000 komórek/studzienkę w pożywce DMEM z 10% FBS w warunkach standardowych. Po 24 h komórki płukano PBS-em a następnie zmieniano pożywkę na Opti-MEM ogrzaną do RT (1,8 mL/studzienkę). Następnie do odpowiednich studzienek dodawano bakterie w ilościach odpowiadających wartościom MOI (ang. *Multiplicity of Infection*) równym 100, 50 i 20 i inkubowano przez 1 lub 2 h w warunkach

standardowych hodowli komórkowej. Następnie bakterie, które nie wniknęły do komórek usunięto przez zmianę pożywki na Opti-MEM z 2% FBS (RT), a te które zaadherowały do komórek lub podłoża zabito przez dodanie do pożywki gentamycyny (100 µg/mL) i godziną inkubację w warunkach standardowych dla komórek eukariotycznych. Następnie pożywkę zmieniano na Opti-MEM z 2% FBS i 20 µg/mL gentamycyny i kontynuowano hodowlę komórek w standardowych warunkach. Komórki RAW264.7 hodowano przez 16 h. Komórki oddzielano od podłoża za pomocą 5× stężonego roztworu trypsyna/EDTA. Komórki przenoszono do probówek, do których uprzednio dodano 200 µL pożywki Opti-mem zawierającej 10% FBS. Następnie mieszaninę wirowano (12 000 × g/30 s/RT), osad komórek zawieszano w 350 µL buforu PBS i dokonywano pomiaru liczby komórek zawierających bakterie z plazmidem pBR322-PSiF-glg-c'1 z użyciem cytometru przepływowego FACSCalibur i oprogramowania CellQuestPro. Podczas pomiaru zliczano 10 000 zdarzeń. Fluorescencję mierzono w kanale FH-1 [436]. Analiza wyników została przeprowadzona w programie FlowJo. Analiza statystyczna była prowadzona za pomocą testu U-Manna Whitneya dla bakterii szczepu VNP20009 oraz jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem Bonferroniego dla bakterii szczepu LT2 z wykorzystaniem programu GraphPad Prism 5.

6.2.10 Oznaczenie cytotoksycznego wpływu bakterii modyfikowanych szczepów *S. Typhimurium* VNP20009 i LT2 na komórki linii RAW264.7

Komórki RAW264.7 umieszczano w studzienkach płytki 96-studniowej w liczbie 10^4 komórek/studzienkę i hodowano przez 24 h [437]. Następnie komórki zakażano bakteriami odpowiednich szczepów bakteryjnych stosując MOI 20, 50 lub 100 i bakterie, które nie zakażyły komórek usuwano jak opisano w rozdziale 6.2.9. Komórki hodowano w warunkach standardowych przez 16 h z dodatkiem niskiej dawki gentamycyny (20 µg/mL). Płytkę z komórkami wirowano (200 × g, 5 min, RT). Kontrolę pozytywną testu przygotowano poprzez lisę niezakażonych komórek z użyciem 0,2% roztworu Triton X-100, zaś jako kontrolę negatywną użyto niezakażonych komórek. Następnie z nad komórek pobierano 50 µL pożywki hodowlanej i oznaczano aktywność uwolnionego LDH zawartego w pożywce z użyciem zestawu Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit. Aktywność zewnątrzkomórkowego LDH została określona przez pomiar

absorbancji przy długości fali $\lambda = 490$ nm i $\lambda = 650$ nm. Różnica wartości otrzymanych dla $\lambda = 490$ nm i $\lambda = 650$ pozwoliła uwzględnić poziom tła pochodzący od absorbancji niespecyficznych precipitatów i materiału (plastiku) płytki. Reakcję prowadzono przez 1 h wykonując pomiary co 5 min, a następnie sporządzano wykres zależności przyrostu produktu w czasie co pozwoliło wybrać punkty czasowe reakcji w jakich zależność była liniowa. Procent martwych komórek obliczono ze wzoru:

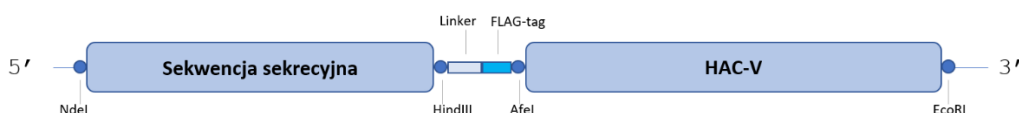
$$\% = \frac{\text{Absorbancja próbki badanej} - \text{Absorbancja kontroli negatywnej}}{\text{Absorbancja kontroli pozytywnej} - \text{Absorbancja kontroli negatywnej}}$$

Oznaczenia zostały wykonane w tetraplikatach. Analiza statystyczna była prowadzona za pomocą testu U-Manna Whitneya dla bakterii szczepu VNP20009 oraz dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem Tukeya dla bakterii szczepu LT2 z użyciem programu GraphPad Prism 5.

6.2.11 Konstrukcja plazmidów rekombinowanych zawierających sekwencje sekrecyjnej w fuzji genetycznej z sekwencją genu kodującego białko HAC-V

Do konstrukcji kasyety genowej służącej do dodania sygnałów sekrecyjnych dla systemu flagelinowego bakterii *S. Typhimurium* do białka terapeutycznego HAC-V, jako sekwencji sekrecyjnych użyto fragmentów genów kodujących odpowiednio 100 pierwszych reszt aminokwasowych białek FlgL (FlgL₁₀₀) lub FlgD (FlgD₁₀₀) lub sekwencję pełnej długości białka FlgM (FlgM₉₇), zbudowanego z 97 reszt aminokwasowych. Poniżej przedstawiono schemat skonstruowanej genetycznej kasyety sekrecyjnej (Rysunek 7), a jej sekwencję nukleotydową przedstawiono w rozdziale Załączniki (Rysunek S 1). Sekwencje polinukleotydowe genów kodujących FlgL, FlgD, FlgM (nazywane dalej sekwencjami sekrecyjnymi) oraz HAC-V zostały zsyntetyzowane chemicznie przez firmę GeneArt (ThermoScientific). Sekwencje sekrecyjne oraz plazmid pGFPuv poddano trawieniu restrykcyjnemu enzymami NdeI i AfeI (NEB) w buforze SmartCut. Trawienie restrykcyjne prowadzono przez 6 h w 37°C, następnie enzymy inaktywowano przez inkubację w 65°C przez 20 min. Produkty rozdzielano elektroforetycznie i oczyszczano według procedury opisanej w rozdziale 6.2.5 a następnie ligowano wg protokołu Quick Ligation dostarczonego przez producenta ligazy [438]. Bakterie *E. coli* Top10F' transformowano uzyskanymi rekombinowanymi plazmidami (rozdział 6.2.4) i wysiewano na podłoże stałe z dodatkiem kanamycyny (50 µg/mL). Uzyskane kolonie

bakteryjnie testowano pod kątem obecności sekwencji sekrecyjnych (FlgL, FlgD lub FlgM) metodą PCR (rozdział 6.2.5) z zastosowaniem starterów zamieszczonych w Tabeli 4. W celu potwierdzenia poprawności uzyskanych konstruktów, plazmidy oczyszczono i sekwencjonowano te fragmenty DNA, gdzie spodziewano się obecności wprowadzonych sekwencji sekrecyjnych (Genomed, Warszawa) oraz analizowano ich sekwencję z użyciem programu FinchTV. Następnie plazmidy były amplifikowane w komórkach Top10F' i izolowane. Do plazmidów wprowadzono sekwencję nukleotydową kodującą białko HAC-V [439]. Wektory i insert HAC-V zostały poddane trawieniu restrykcyjnym enzymami Afel i EcoRI przez 4 h w 37°C. Po inaktywacji enzymów produkty trawienia rozdzielano elektroforetycznie, oczyszczano z żelu agarozowego za pomocą zestawu QiaGen Gel Extraction. Następnie uzyskane rekombinowane plazmidy wprowadzono do komórek bakterii *E. coli* Top10F' na drodze transformacji chemicznej. Uzyskane klony testowano pod kątem obecności tworzonych konstruktów metodą PCR z użyciem starterów zamieszczonych w Tabeli 4. Następnie plazmidy izolowano, a ich fragmenty poddawano sekwencjonowaniu (Genomed). Otrzymano konstrukty pGFPuv-FlgM-HAC-V, pGFPuv-FlgL-HAC-V oraz pGFP-FlgD-HAC-V, które wprowadzono do komórek bakterii *S. Typhimurium* wg procedury opisanej w rozdziale 6.2.4. W tym miejscu należy dodać, że przeprowadzona procedura spowodowała usunięcie genu kodującego białko zielonej fluorescencji GFP z wektora.



Rysunek 7. Blokowy schemat kasy sekrecyjnej zawierającej sekwencję białka fuzyjnego potencjalnie podlegającego sekrecji przez system flagelinowy bakterii *S. Typhimurium*

Tabela 4. Sekwencje starterów użytych do analizy sekwencji klonowanych fragmentów DNA

Nazwa	Sekwencja 5' → 3'	Wielkość produktu (pz)	
		w analizie obecności:	
		SS**	HAC-V
FlgM_F_1-97*	ACTCAAGCTTGATGAGCATTGACCGTACCTC	1000	744
FlgL_F_100	GCGAAAGCTTGATGCGTATCAGTACCCAGAT	1010	749
FlgD_F_1-50	CGGAAAGCTTAATGTCTATTGCCGTAATATGAATGACCC	1010	749
GFP_R	AGGTAATGGTTGTCTGGGAGGAGC		
HAC-V_Rev	TTAGCGTTCGGTCACGCGCAGTTCC		

*Litera F w nazwie oznacza starter przedni, litera R starter wsteczny. Starter GFP_R był wspólny dla wszystkich reakcji PCR służących potwierdzeniu obecności sekwencji kodującej domenę sekrecyjną. Starter HAC-V_R był wspólny dla wszystkich reakcji PCR służących potwierdzeniu obecności kaset sekrecyjnej.

*SS – sekwencja kodująca domenę sekrecyjną białka FlgM, FlgL lub FlgD.

6.2.12 Analiza sekrecji białek fuzyjnych przez system flagelinowy bakterii *S. Typhimurium*

Bakterie *S. Typhimurium* VNP20009, VNP20009 $\Delta fliC$ LT2, LT2 $\Delta fliC$ oraz LT2 $\Delta fliC$ $\Delta flgK$ transformowano rekombinowanymi plazmidami zawierającymi geny kodujące białka fuzyjne FlgM-HAC-V, FlgL-HAC-V lub FlgD-HAC-V. Hodowlę bakterii prowadzono wg opisu przedstawionego w rozdziale 6.2.2. Hodowle bakteryjne rozcieńczano do uzyskania wartości $OD_{600} = 0,06$ i następnie hodowano do osiągnięcia wartości $OD_{600} = 0,8$; 1,0 oraz 1,2. Następnie pobierano 2 mL hodowli bakteryjnej, wirowano ($15\ 000 \times g/5\ min/4^{\circ}C$), a uzyskany nadsącz przynoszono do nowych próbek; próbki zawierały m.in. białka wydzielane przez bakterie. Osad bakterii zawieszano w 100 μ L buforu obciążającego do próbek białkowych i sonikowano homogenizatorem ultradźwiękowym UP50H (amplituda 80%, cykl impuls/pauza 0,6/0,4 s, 5×10 s).

Z nadsączu uzyskanego po wirowaniu hodowli bakteryjnych wytrącano białka 20% roztworem kwasu trichlorooctowego (TCA) [440]. Osuszony osad zawieszano w 100 μ L buforu obciążającego do próbek białkowych.

Próbki inkubowano w temperaturze $95^{\circ}C$ przez 5 min. Zdenaturowane próbki (20 μ L) poddawano rozdzielaniu elektroforetycznemu (rozdział 6.2.21) a następnie przeprowadzano western blotting zgodnie ze standardowym protokołem [441]. Zastosowano pierwszorzędowe mysie przeciwciała anty-DnaK (1:15 000) lub mysie anty-FLAG (1:12 000) w 3% roztworze mleka w proszku w TBS-Tween 20 i inkubowano w $4^{\circ}C$ przez 16 h. Do wywołania sygnału na membranie użyto substratu dla HRP – Pierce ECL Chemiluminescence Substrate. Sygnał chemiluminescencji zbierano i uwidacziano z użyciem czytnika chemiluminescencji. Obróbkę obrazu prowadzono z użyciem oprogramowania FusionCapt Advance.

6.2.13 Wyznaczenie EC50 badanych inhibitorów poprzez pomiar aktywności lucyferazy aktywowanej interakcją PD-L1 z PD-1 obecnym na powierzchni komórek Jurkat T

Do badań wykorzystano model *in vitro* kokultury komórek aAPC/CHO-K1 z ekspresją ludzkiego PD-L1 oraz białka aktywującego TCR (ang. *T cell receptor*) na drodze niezależnej od antygeny z komórkami linii Jurkat T zmodyfikowanymi genetycznie, tak aby wykazywały nadekspresję PD-1 oraz ekspresję genu reporterowego (lucyferazy) wrażliwego na aktywację szlaku PD-1/PD-L1. Oddziaływanie PD-1/PD-L1 znosi aktywację ekspresji lucyferazy.

Komórki aAPC/CHO-K1 hPD-L1 w liczbie 1×10^4 /studzienkę zostały umieszczone w studzienkach 96-studniowej płytki do pomiarów luminescencji i hodowane przez 24 h. Następnie pożywkę usuwano, komórki delikatnie przepłukiwano PBS-em. Do studzienek dodawano po 40 μ L 2 \times stężonego roztworu badanych inhibitorów w pożywce hodowlanej RPMI 1640 z 1% FBS. Do badań użyto aptamerów w zakresie stężeń 5-500 nM lub makrocyclicznego peptydu w zakresie stężeń 0,16-250 μ M. Sekwencje badanych aptamerów zostały przedstawione na rysunku S 4 w rozdziale Załączniki.

Komórki Jurkat PD-1 wirowano (200 \times g, 5 min, RT), liczone i zawieszano w RPMI 1640 z 1% FBS do uzyskania gęstości komórek równej $1,25 \times 10^6$ komórek/mL, a następnie przenoszono po 40 μ L tak przygotowanej zawiesiny komórkowej do studzienek płytki z komórkami aAPC/CHO-K1 hPD-L1. Uzyskaną kulturę binarną inkubowano przez 3,5 h w warunkach standardowych. Następnie płytkę studzono do RT i do studzienek płytki dodawano substratu dla lucyferazy Bio-Glo (Promega) w stosunku objętościowym roztwór substratu: zawiesina komórek równym 1:1, inkubowano (10 min, RT) i mierzono poziom chemiluminescencji za pomocą czytnika płytkowego. Wartość EC50 została wyznaczona za pomocą programu GraphPad Prism 9 z użyciem równania Hilla. Obecność PD-L1 i PD-1 na powierzchni komórek potwierdzono metodą cytometrii przepływową używając odpowiednio przeciwciał MIH1 i J105 w rozcieńczeniu 1:200 wg protokołu opisanego w rozdziale 6.2.14.

6.2.14 Badanie interakcji aptamerów z receptorem PD-L1 różnych linii komórkowych lub z receptorem PD-1 komórek Jurkat T PD-1 z użyciem cytometrii przepływowej

W celu potwierdzenia obecności antygenu powierzchniowego PD-1 komórki Jurkat T i Jurkat T PD-1 zostały pobrane z butelki hodowlanej, przepłukane HBSS i przeniesione w ilości 1×10^5 do probówek. W celu potwierdzenia obecności antygenu powierzchniowego PD-L1 komórki aAPC/CHO-K1 i aAPC/CHO-K1 hPD-L1, 786-0 i Caki-2 zostały uwalniane z podłoża butelki hodowlanej z użyciem akutazy a następnie przenoszone do probówek w ilości 1×10^5 .

Komórki inkubowano w obecności 10% FBS w HBSS (ang. *Hank's balanced salt solution*) przez 30 min w 37°C. Następnie komórki wirowano, nadsącz usuwano, a komórki zawieszano w 200 μ L buforu blokującego z dodatkiem przeciwciał anti-hPD-1 J105 skoniugowanych z fluorescencyjnym znacznikiem FITC lub anti-hPD-1 MIH1 skoniugowanych z fluorescencyjnym białkiem allofikocjaniną (APC) rozcieńczonych 200 razy. Komórki inkubowano przez 30 min w 37°C w ciemności, następnie dwukrotnie płukano HBSS i analizowano z użyciem cytometru przepływowego FACSCalibur. Podczas pomiaru zliczano 10 000 zdarzeń. Fluorescencję mierzono w kanale FH-1 dla FITC oraz FH-4 dla APC.

Oddziaływanie aptamerów anti-PD-L1 z powierzchniowym PD-L1 testowano z użyciem komórek linii 786-O, aAPC/CHO-K1, aAPC/CHO-K1 hPD-L1 w liczbie $0,5 \times 10^5$ umieszczonych w studzienkach płytki 12-studniowej. Oddziaływanie aptamerów anti-PD-1 testowano z użyciem komórek Jurkat T i Jurkat T PD-1, które pobrano z butelki hodowlanej, przepłukano HBSS i przeniesiono w ilości 1×10^5 do probówek.

Komórki inkubowano w HBSS z 10% FBS w przez 30 min w 37°C. Po dodaniu aptamerów skoniugowanych z FITC komórki inkubowano w 10% FBS w HBSS przez 30 min w 37°C w ciemności. Stosowano różne stężenia aptamerów w zakresie 5 nM – 500 nM. Następnie komórki były trzykrotnie płukane pożywką, następnie HBSS i oddzielane od podłoża z użyciem akutazy. Komórki analizowano z użyciem cytometru przepływowego FACSCalibur. Podczas pomiaru zliczano 10 000 zdarzeń. Fluorescencję mierzono w kanale FH-1. Jako kontrolę negatywną aptamerów użyto niespecyficznej sekwencji ssDNA, o tej samej długości co badany aptamer. Średnie wartości fluorescencji MFI

(ang. *Mean fluorescence intensity*) zostały wyznaczone za pomocą programu FlowJo. Podczas obliczeń uwzględniono wartości autofluorescencji.

6.2.15 Testy in vitro cytotoksyczności stosowanych inhibitorów

Komórki aAPC/CHO-K1 hPD-L1 lub Jurkat PD-1 umieszczone w studzienkach płytki 96-studzienkowej w liczbie 10^4 komórek/studzienkę hodowano przez 24 h. Następnie komórki hodowano w obecności różnych stężeń aptamerów przez 1, 3 lub 24 h albo w obecności różnych stężeń makrocyclicznego peptydu p104 przez 24 h. Płytkę z komórkami zwirowano ($200 \times g$, 5 min, RT). Następnie z nadkomórek pobierano po 50 μL pożywki hodowlanej i oznaczono aktywność uwolnionego LDH zawartego w pożywce z użyciem zestawu Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit poprzez zmieszanie porcji pobranej pożywki z 50 μL mieszaniny reakcyjnej. Aktywność zewnątrzkomórkowego LDH została określona jak w rozdziale 6.2.15.

Żywotność komórek oznaczono również testem MTT [442]. Do komórek pozostałych na płytce z pozostałą objętością medium hodowlanego (150 μL) dodano 15 μL roztworu MTT (5 mg/mL). Komórki inkubowano 1,5 h w $37^\circ C$ aż do uzyskania kryształów formazanu o fioletowej barwie. Pożywkę hodowlaną usunięto (w przypadku komórek Jurkat PD-1 konieczne było ich zwirowanie $200 \times g$, 5 min, RT), a kryształy formazanu rozpuszczono w 100 μL mieszaniny zawierającej DMSO i metanol w stosunku objętościowym 1: 1. Absorbancja została zmierzona przy długości fali $\lambda = 550$ nm i $\lambda = 650$ nm, a następnie obliczono różnicę otrzymanych wartości, aby uwzględnić poziom tła.

6.2.16 Ekspresja i oczyszczanie białka PD-L1


Bakterie szczepu *E. coli* BL21(DE3) poddano transformacji chemicznej plazmidem rekombinowanym pET-21b-PD-L1 zawierającym wprowadzony cDNA kodujący fragment zewnątrzkomórkowej dystalnej domeny białka PD-L1 (reszty aminokwasowe 18-134; określane w dalszej części pracy jako PD-L1).

Hodowlę całonocną bakterii prowadzono w 100 mL pożywki LB z dodatkiem 100 $\mu g/mL$ ampicyliny w warunkach $37^\circ C/220rpm/16$ h. Hodowlę całonocną rozcieńczono $100 \times$ w 1 L świeżej pożywki LB i hodowano do osiągnięcia wartości

OD₆₀₀ = 0,6. Następnie ekspresję białka PD-L1 indukowano dodatkiem IPTG w stężeniu końcowym równym 1 mM i prowadzono przez 6 h w 37°C z wytrząsaniem (220 rpm). Bakterie zwirowano (6000 × g/15 min/4°C), osad komórek zawieszano w 100 mL buforu PBS (4°C) i sonikowano z użyciem homogenizatora ultradźwiękowego w następujących warunkach: amplituda 80%, cykl impuls/pauza 2 s/3 s, moc 1500 kW, 15 min, 16°C. Następnie otrzymaną zawiesinę wirowano (14 000 × g/15 min/4°C). Uzyskany osad zawierający ciała inkluzyjne płucono buforem płucającym (rozdział 6.1). Ciała inkluzyjne zawieszano w buforze rozpuszczającym i inkubowano do całkowitego rozpuszczenia w 4°C przez 16 h z mieszaniem. Roztwór lizatu ciałek inkluzyjnych wirowano (6000 × g/15 min/4°C) i rozcieńczano buforem rozpuszczającym do końcowego stężenia 1 mg/mL. Następnie 50 mL roztworu lizatu ciałek inkluzyjnych rozcieńczano przez powolne wkrapianie 10 mL-porcji roztworu co 8 h do 1 L buforu do refaldowania (rozdział 6.1) z ciągłym mieszaniem na mieszadle magnetycznym. Roztwór sfałdowanego białka dializowano trzykrotnie przez 24 h względem buforu dializacyjnego. Następnie dializat dzielono na cztery porcje i każdą z nich osobno zagęszczano do objętości końcowej 50 mL z użyciem bioseparatora Amicon (Merck) z membraną o punkcie odcięcia równym 5 kDa. Zagęszczone porcje białka wirowano w celu usunięcia precypitatu powstałego podczas zagęszczania i poddawano dalszemu zagęszczaniu do objętości 5 mL z użyciem wirówkowych jednostek filtracyjnych (Merck) wyposażonych w membrany filtracyjne o punkcie odcięcia równym 3 kDa. Ostatnim etapem oczyszczania była filtracja żelowa z wykorzystaniem systemu chromatografii ciekowej AKTAexplorer™. Kolumnę chromatograficzną HiLoad 16/600 Superdex 75 pg równoważono buforem do sączenia molekularnego przy parametrach przepływu 1,5 mL/min i ciśnieniu 0,5 MPa, a następnie prowadzono rozdział chromatograficzny poszczególnych porcji białka w tym samym buforze i z zastosowaniem tych samych parametrów przepływu. Stopień czystości preparatu białka został oceniony przez rozdział elektroforetyczny w warunkach denaturująco-redukujących SDS-PAGE. Ustrukturyzowanie białka PD-L1 zostało ocenione poprzez analizę widma H₁-NMR przez dra Bogdana Musielaka (Zespół Biologii Chemicznej i Projektowania Leków, Wydział Chemii UJ) z użyciem Spektrometru NMR Bruker Avance 600 MHz.

6.2.17 Przygotowanie inhibitora p104

Makrocykliczny peptyd p104 o sekwencji


Phe-Leu-Phe-Val-Ile-Arg-Asp-Arg-Val-Phe-Arg-Cys-Gly i masie cząsteczkowej 1,66 kDa został zsyntezowany przez firmę Caslo (Diplomvej, Dania) i dostarczony w formie liofilizatu. Liofilizat rozpuszczono w DMSO do stężenia końcowego 50 mM. Otrzymany roztwór przechowywano w temperaturze -20°C.

6.2.18 Badanie interakcji białka PD-L1 lub kompleksu PD-1/PD-L1 z p104

Oddziaływanie białka PD-L1 z p104 analizowano poprzez pomiar jednowymiarowych widm H^1 -NMR oraz dwuwymiarowych widm H^1 - N^{15} -NMR podczas miareczkowania białka peptydem. Badanie tworzenia kompleksu PD-L1/p104 przetestowano wykonując pomiar dwuwymiarowych widm H^1 - N^{15} -NMR w odpowiednio znakowanych układach białek. Wszystkie pomiary zostały wykonane przez dra Bogdana Musielaka (Zespół Biologii Chemicznej i Projektowania Leków, Wydział Chemii UJ) z użyciem Spektrometru NMR Bruker Avance 600 MHz.

6.2.19 Krystalizacja kompleksu białka PD-L1 z inhibitorem p104 metodą kropli siedzącej

Oczyszczone białko PD-L1 zagęszczano do stężenia 5 mg/mL i dodawano inhibitor p104 w stosunku molowym białko: inhibitor równym 1:3. Próbkę wirowano ($15\ 000 \times g/15\ \text{min}/4^\circ\text{C}$) celem usunięcia powstałego precypitatu, a następnie przeprowadzano przesiewowy test warunków krystalizacyjnych z wykorzystaniem zestawów krystalizacyjnych: Structure, Memgold, LBM, Macrosol Stura, SG1, JSCG+, Proplex, Morpheus, PEG/Salt, MIDAS, Pact. Krystalizację prowadzono na płytce 96-studzienkowej do krystalizacji z dodatkiem 200 μL testowanego buforu w rezerwuarze. Na płycie krystalizacyjnej umieszczano kroplę roztworu kompleksu białko-ligand o objętości 1 μL , do którego dodawano buforu krystalizacyjnego o objętości 0,45 μL lub 1 μL . Płytki zabezpieczano taśmą krystalizacyjną i umieszczano w 4°C lub w RT.

Po zidentyfikowaniu wstępnych warunków krystalizacji przystąpiono do dalszej optymalizacji warunków krystalizacji w celu uzyskania kryształów o jakości odpowiedniej dla analizy dyfrakcyjnej. Procedurę krystalizacji przeprowadzano według opisu

umieszczonego powyżej. Wartości pH użytych buforów zawarte były w zakresie 6,0 – 7,0 ze skokiem wartości pH równym 0,1. Skok wartości stężeń substancji precypitujących był równy 0,2 M. Kryształy uzyskane w obecności buforu o pH równym 6,24, przy stosunku objętościowym wyjściowego roztworu białka do buforu krystalizacyjnego wynoszącym 0,9 μ L: 0,6 μ L, w obecności siarczanu amonu (1,95 M) oraz cytrynianu sodu (0,1 M) zostały wytypowane do dalszych pomiarów. Kryształy zostały zamrożone w ciekłym azocie po uprzednim nasączeniu ich krioprotektantem i przechowywane w odpowiednich naczyniach do czasu ich transportu do miejsca wykonywania analizy dyfrakcyjnej. Pomiar dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego zostały wykonane przez dra Piotra Wilka (Structural Biology Core Facility, MCB UJ).

6.2.20 Analiza dyfrakcyjna otrzymanych kryształów białka

Dane dyfrakcyjne zostały zebrane przy użyciu synchrotronu BESSY II na wiązce użytkowanej przez Helmholtz Zentrum (Berlin, Niemcy) [443], [444]. Podczas dokonywania pomiarów kryształy były utrzymywane w warunkach kriogenicznych. Dane analizowano za pomocą programów zawartych w pakiecie CCP4. Dokonano indeksowania i integracji obrazów dyfrakcyjnych przy użyciu programu iMosflm [445], a następnie ich skalowania za pomocą programu Scala [446]. W celu uzyskania struktury kompleksu wykorzystano technikę podstawienia molekularnego z użyciem programu Phaser i modelu białkowego PD-L1 zaczerpniętego z bazy danych PDB (ang. *Protein Data Bank*; nr identyfikacyjny struktury – 5O45) [447], [448]. Budowę modelu oraz jego udokładnianie przeprowadzono z użyciem programu COOT oraz Refmac5 [449]. Prezentacja danych została przeprowadzona z użyciem programu PyMol i Discovery Studio Visualizer [450], [451]. Statystyki gromadzenia i obróbki danych podsumowano w Tabeli 5.

6.2.21 Rozdział elektroforetyczny białek

Metoda separacji elektroforetycznej SDS-PAGE w układzie Laemmliego została wykorzystana do sprawdzenia poziomu ekspresji białek i oznaczenia stopnia ich czystości na kolejnych etapach oczyszczania [452]. Próbkę białek poddane rozdziałowi elektroforetycznemu zostały przygotowane przez zmieszanie 40 μ L preparatu białka i 10 μ L 5 \times buforu obciążającego do białek i inkubację mieszaniny w temperaturze 95°C

przez 5 min. Na żel nakładano po 25 μ L próbki. Rozdział prowadzono w układzie Laemmliego przy napięciu 8 V/cm w 5% żelu zagęszczającym o długości 1,5 cm i 15 V/cm w 15% żelu rozdzielającym o długości 4,5 cm [453]. W celu wizualizacji białek po rozdziale elektroforetycznym, żel inkubowano w buforze barwiącym Coomassie, a następnie usuwano nadmiar barwnika poprzez inkubację w buforze odbarwiającym [452], [454]. Jakość białka określono na podstawie obserwacji wzrokowej.

7. Wyniki i wnioski

7.1 Zastosowanie systemu flagelinowego bakterii rodzaju *S. Typhimurium* szczepu VNP20009 jako układu transportującego białka fuzyjne o potencjalnie terapeutycznym

System flagelinowy F-T3SS bakterii *S. Typhimurium* odpowiada za ich mobilność głównie w odpowiedzi na chemotaksję [455], [456]. Jednocześnie pełni funkcję systemu sekrecji wyspecjalizowanego w wydzielaniu białek budujących filament flagelinowy oraz niektórych białek regulujących funkcjonowanie wici [457], [458]. Zastosowanie odpowiednich sygnałów sekrecyjnych, rozpoznawanych przez system flagelinowy może być wykorzystane do wydajnego eksportu białek fuzyjnych [458]. W ramach mojej pracy chciałam zweryfikować hipotezę, że system sekrecji F-T3SS można wykorzystać do wydzielania przez bakterie białka terapeutycznego, jeśli połączy się je z domeną zawierającą sygnał sekrecyjny pochodzący z białek naturalnie wydzielanych przez ten system. Wybrałam trzy białka, których N-końcowe domeny zawierają sygnały sekrecyjne i które pozwoliłyby na otrzymanie białek fuzyjnych z potencjalnie terapeutycznym białkiem HAC-V. Jako partnerów fuzyjnych, dostarczających sygnału sekrecyjnego dla rekombinowanego białka HAC-V wykorzystałam N-końcowe domeny białek FlgL (monomer budujący element łącznikowy haka i wici) i FlgD (monomer budujący czapkę okrywającą hak) zbudowane ze 100 reszt aminokwasowych oraz białko FlgM (białko regulatorowe, które ulega sekrecji zanim dojdzie do utworzenia wici) o całkowitej długości 97 reszt aminokwasowych. W czasie projektowania konstruktów i wykonywania badań przedstawionych w pracy, sygnały sekrecyjne F-T3SS pozostawały słabo określone, jednak wiadomo było, że są one ulokowane na N-końcu białka, nie ulegają odcięciu podczas procesu sekrecji oraz mają nieuporządkowaną strukturę [459]. Ponieważ prowadzone wcześniej przeze mnie badania dowiodły, że wykorzystanie różnych wariantów krótkiego peptydu sekrecyjnego białka FliC (białko flageliny budującej wic), nie umożliwiło wydzielania domeny białka PD-1 (odpowiedzialnej za wiązanie PD-L1), tym razem postanowiłam wykorzystać całe domeny białek FlgL i FlgD oraz białko FlgM pełnej długości. Taka strategia miała na celu: (i) zapewnić, że sygnał sekrecyjny niezależnie od jego dokładnej lokalizacji oraz długości zostanie w całości wprowadzony do konstruktów, (ii) zapewnić większą kompatybilność produktu wydzielniczego (HAC-V) z sygnałem sekrecyjnym, co wynika z faktu, że sygnał sekrecyjny

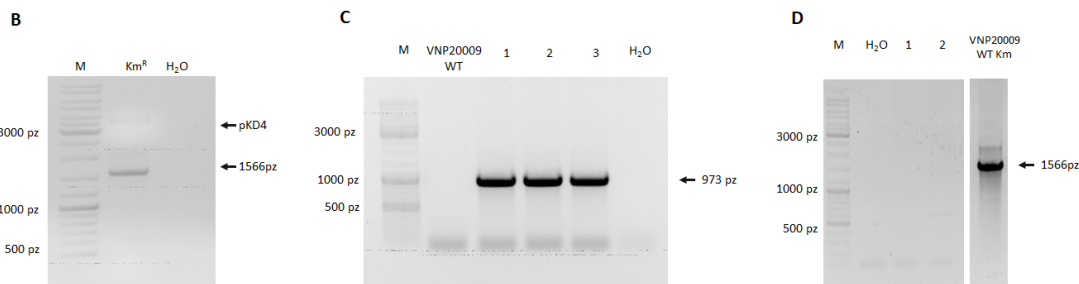
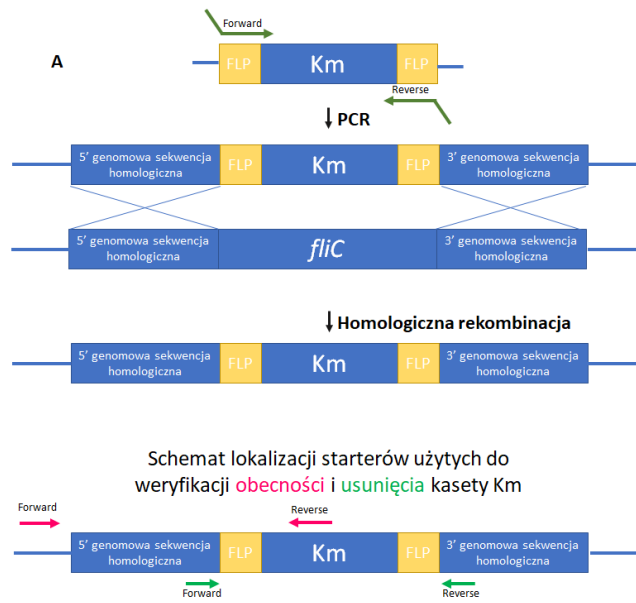
pozostaje połączony z natywną sekwencją białkową (FlgM) lub jej fragmentem (FlgL, FlgD). Podczas projektowania konstruktów postanowiłam również użyć białka HAC-V zamiast wcześniej wykorzystanej domeny PD-1. Białko HAC-V jest zmodyfikowaną wersją domeny zewnątrzkomórkowej białka PD-1 obejmującą reszty aminokwasowe 26-147, które dzięki wprowadzonym mutacjom charakteryzuje się wyższym powinowactwem do białka PD-L1 w porównaniu do natywnego PD-1 (Rysunek S 2 znajdujący się w rozdziale Załączniki) [439]. Białko HAC-V zostało wyselekcjonowane z biblioteki mutantów PD-1 przez Maute i wsp. [439]. Analiza sekwencji białek o najwyższym powinowactwie pozwoliła na wybranie dwóch sekwencji konsensusowych (ang. *high-affinity consensus*, HAC) różniących się aminokwasem w pozycji 41 (walina lub izoleucyna) [439]. W mojej pracy zastosowałam białko z resztą waliny – HAC-V. Docelowo, HAC-V miałyby ulegać wydzielaniu w tkance guza przez bakterie rodzaju *Salmonella*. Następnie, rozpuszczalny HAC-V miałyby wiązać powierzchniowy receptor PD-L1, tym samym hamując jego interakcję z receptorem PD-1 na powierzchni limfocytów T i zapobiegając utracie ich aktywności przeciwnowotworowej. Ponieważ więc bakterii *Salmonella* jest zbudowana z ok. 20 000 monomerów flageliny, które ulegają ciągłemu złuszczeniu podejrzewałam, że białko FliC (monomer flageliny) produkowane w komórce bakteryjnej w znacznej ilości i będące głównym, naturalnym białkiem wydzielanym przez F-3TSS będzie silnie konkurować o światło kanału systemu flagelinowego z białkiem fuzyjnym zawierającym HAC-V. W konsekwencji sekrecja HAC-V nie będzie wydajna. Stąd, aby usprawnić jego sekrecję, postanowiłam usunąć gen *fliC*. Moje przypuszczenia dotyczące usunięcia genu *fliC* znalazły w późniejszym czasie potwierdzenie w literaturze [460].

7.2 Delecja genu *fliC* z chromosomu bakteryjnego *S. Typhimurium* VNP20009

W celu usunięcia genu *fliC* z genomu bakterii *S. Typhimurium* VNP20009 użyto kasety Km^R , która zawiera gen selekcyjny kodujący kinazę aminoglikozydową, odpowiadającą za oporność na kanamycynę. Sekwencja genu selekcyjnego w kasecie Km^R jest oflankowana sekwencjami FLP, które są rozpoznawane przez rekombinazę FLP (Rysunek 8 A). Sekwencja FLP znajdująca się na 5' końcu jest poprzedzona sekwencją czterdziestu nukleotydów, które występują powyżej genomowej sekwencji genu *fliC*. Z kolei za sekwencją FLP znajdującą się na 3' końcu znajduje się sekwencja czterdziestu

nukleotydów, które występują poniżej genomowej sekwencji genu *fliC*. Sposób konstrukcji kasety Km^R został opisany w rozdziale 6.2.5. Kasetę Km^R otrzymano w wyniku przeprowadzenia reakcji PCR, w której matrycę stanowił plazmid pKD4 posiadający Km^R. Uzyskano liniowy produkt reakcji, czyli kasetę Km^R o wielkości 1566 pz (Rysunek 8 B). DNA kasety Km^R wyizolowano z żelu agarozowego, po rozdziale elektroforetycznym, aby próbka użyta do transformacji nie zawierała śladowych ilości plazmidu pKD4. Było to niezbędne, aby zapobiec utworzeniu fałszywie pozytywnych klonów bakteryjnych posiadających oporność na kanamycynę. Oczyszczone DNA kasety Km^R zostało wprowadzone do genomu dzięki elektroporacji bakterii z wyindukowaną wcześniej ekspresją rekombinazy homologicznej λRed, której gen znajdował się na wprowadzonym uprzednio do bakterii plazmidzie pKD46. Aktywność λRed umożliwiła zajście homologicznej rekombinacji z udziałem czterdziestonukleotydowych sekwencji flankujących genomową sekwencję genu *fliC*, które flankują także kasetę Km^R. Uzyskane kolonie zostały przetestowane pod kątem obecności kasety Km^R, a tym samym, jednoczesnego usunięcia genu *fliC* z genomu. Przeprowadzono PCR z kolonii z użyciem pary starterów: FliC_flank(5'hom)_F, komplementarnego do sekwencji genomowej znajdującej się powyżej genu *fliC* oraz Km_Reverse, który jest komplementarny do fragmentu sekwencji kasety Km^R. Obecność produktu PCR o wielkości 973 pz na obrazie rozdziału elektroforetycznego potwierdziła zintegrowanie kasety Km^R z genomem wybranych klonów bakteryjnych (Rysunek 8 C) w wybranym miejscu genomu, co wskazuje na skuteczne usunięcie genu *fliC*. Do dalszej manipulacji genetycznej został użyty klon bakteryjny nr 2. Bakterie hodowano w 42°C w celu usunięcia niskokopijnego plazmidu pKD46 (kodującego rekombinazę λRed), którego replikon jest wrażliwy na podwyższoną temperaturę. Plazmid pKD46 charakteryzuje się obecnością genu białka repA101-ts odpowiedzialnego za regulację namnażania plazmidu, które posiada wprowadzoną mutację generującą utratę aktywności w temperaturze powyżej 37°C [461]. Po pięciu dniach inkubacji bakterie wysiano na płytce, a następnie wybrano te klony, które rosły na podłożu stałym z dodatkiem kanamycyny, a nie pojawiły się na podłożu stałym z dodatkiem ampicyliny, co oznaczało, że zawierają kasetę Km^R i utraciły plazmid pKD46. Bakterie zostały następnie poddane elektroporacji plazmidem pCP20 zawierającym rekombinazę FLP, której aktywność umożliwiła zajście kolejnej

homologicznej rekombinacji z udziałem fragmentów FLP flankujących gen oporności na kanamycynę kasety Km^R. Rekombinacja usuwa kasetę Km^R z genomu bakterii łącząc ze sobą sekwencje 3' i 5' flankujące usunięty już wcześniej gen *fliC*. Następnie wykonano PCR z kolonii, którego wynik (Rysunek 8 D) potwierdził eliminację kasety Km^R ze wszystkich analizowanych klonów bakteryjnych (na rysunku przedstawiono poglądowy wynik, który pokazuje jedynie 2 z 6 testowanych klonów). Podobnie jak plazmid pKD46, również plazmid pCP20 posiada replikon wrażliwy na podwyższoną temperaturę, dzięki czemu możliwe było jego usunięcie z bakterii poprzez ich hodowlę w temperaturze 42°C przez 5 dni. Poszczególne klony bakteryjne zostały wysiane na podłoże stałe z dodatkiem kanamycyny, ampicyliny lub bez dodatku antybiotyków. Ostatecznie do dalszych badań wybrano klon bakterii, który wyrastał jedynie na podłożu bez antybiotyków, co oznaczało utratę plamidu pCP20 (brak oporności na ampicylinę), utratę genomowej kasety niosącej gen oporności na kanamycynę przy jednoczesnym wprowadzeniu delekcji genu *fliC*.



Rysunek 8. Delecja genu *fliC* z genomu bakterii *S. Typhimurium* VNP20009. Na rysunku przedstawiono schemat delecji genu *fliC* poprzez homologiczną rekombinację wprowadzającą w miejsce usuniętego genu kasetę Km^R (A), rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji sekwencji DNA kasety Km^R na matrycy plazmidu pKD4 (B), rozdział elektroforetyczny produktów PCR uzyskanych na matrycy genomowego DNA bakterii *S. Typhimurium* VNP20009 pochodzących z klonów 1-3 potwierdzający delecję genu *fliC* z równoczesnym wprowadzeniem kasety Km^R do genomu bakteryjnego. Powielono fragment 973 pz obejmujący fragment genomowej sekwencji znajdującej się powyżej genu *fliC* oraz fragment wprowadzonej do genomu kasety Km^R (C), rozdział elektroforetyczny produktów PCR uzyskanych na matrycy genomowego DNA bakterii *S. Typhimurium* VNP20009 pochodzących z klonów bakteryjnych 1-6 potwierdzający usunięcie kasety Km^R z genomu (D). Ścieżka H₂O we wszystkich rozdziałach elektroforetycznych – kontrola czystości odczynników, w mieszaninie reakcyjnej H₂O zastępowała matrycę.

7.3 Wpływ delecji genu *fliC* na zmiany fenotypu bakterii szczepu *S. Typhimurium* VNP20009

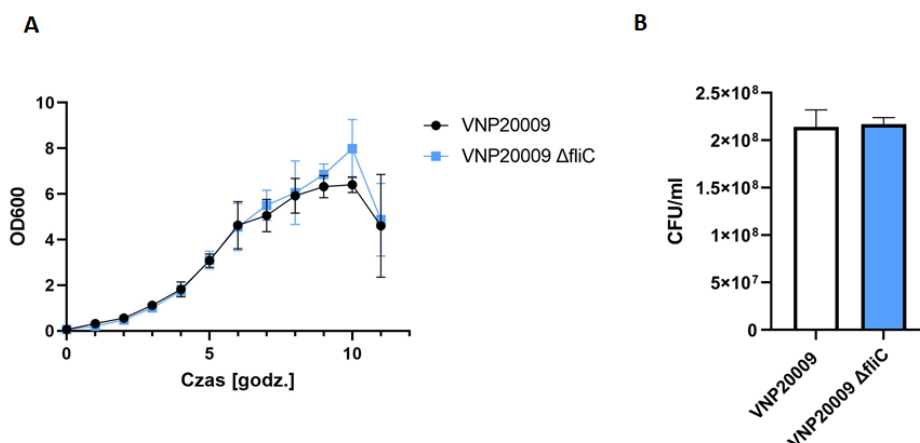
Usunięcie tak istotnego genu jak *fliC* może prowadzić do znacznych zmian fenotypowych bakterii, takich jak ich żywotność czy tempo wzrostu, które z kolei mogą wpływać na zdolność do infekowania komórek eukariotycznych. Dlatego zbadano podstawowe właściwości szczepu VNP20009 z usuniętym genem *fliC*.

7.9.1 Krzywa wzrostu bakterii szczepu *S. Typhimurium* VNP20009 z delecją genu *fliC*

Tempo przyrostu bakterii było monitorowane poprzez pomiar gęstości optycznej hodowli bakteryjnej przy $\lambda = 600$ nm (OD_{600} ; od ang. *optical density*), uwzględniając rozcieńczenie hodowli podczas pomiarów w zależności od jej gęstości tak jak wskazano w rozdziale 6.2.8. Zarówno podczas fazy inkubacyjnej oraz fazy logarytmicznego wzrostu przebieg krzywych wzrostu szczepów VNP20009 i VNP20009 $\Delta fliC$ jest zbliżony (Rysunek 9 A). Dla obu szczepów bakteryjnych współczynniki wzrostu wyznaczone dla fazy logarytmicznej, pomiędzy 4 i 6 godziną prowadzonej hodowli, były zbliżone ($1,07 \pm 0,45/h$ dla VNP20009 oraz $1,09 \pm 0,41/h$ dla VNP20009 $\Delta fliC$). Dopiero w fazie stacjonarnej, która rozpoczyna się po 7 godzinie pomiarów zaobserwowano nieznacznie większą wartość OD_{600} hodowli bakterii VNP20009 $\Delta fliC$ w porównaniu do bakterii VNP20009. Wynik ten nie osiąga jednak istotności statystycznej, a różnica jest zniwelowana w kolejnych godzinach. W obu przypadkach faza zamierania następuje w tym samym czasie i rozpoczyna się w 11 godzinie prowadzenia hodowli, a wartość OD_{600} dla obu hodowli jest taka sama. Oznacza to, że wprowadzenie delecji genu *fliC* nie zaburza przebiegu krzywej wzrostu bakterii szczepu *S. Typhimurium* VNP20009.

7.9.2 Badanie żywotności bakterii szczepu *S. Typhimurium* VNP20009 z wprowadzoną delecją genu *fliC*

Żywotność bakterii szczepu *S. Typhimurium* VNP20009 i *S. Typhimurium* VNP20009 $\Delta fliC$ została określona za pomocą testu Milesa i Misry, który pozwala wyznaczyć liczbę bakterii zdolnych do utworzenia kolonii CFU (ang. *Colony Forming Unit*) na podłożu stałym. Bakterie szczepów VNP20009 i VNP20009 $\Delta fliC$ pobierano podczas wczesnej fazy logarytmicznego wzrostu i przy tej samej gęstości optycznej, rozcieńczano metodą seryjnych rozcieńczeń a następnie sprawdzano liczbę utworzonych jednostek CFU na podłożu stałym. Wyniki (Rysunek 9 B) przedstawiają wartości CFU przypadające na 1 mL zawiesiny bakteryjnej. Wprowadzenie delecji genu *fliC* w genomie bakterii VNP20009 nie obniża żywotności bakterii w porównaniu do szczepu wyjściowego. Zaobserwowano niewielki wzrost żywotności bakterii szczepu VNP20009 $\Delta fliC$ choć nie jest on istotny statystycznie. Oznacza to, że wprowadzenie delecji genu *fliC* nie obniża żywotności bakterii.



Rysunek 9. Analiza wpływu delecji genu *fliC* na wybrane cechy bakterii *S. Typhimurium* VNP20009. Żywotność (A), przebieg krzywych wzrostu (B). Podano wartości średnie \pm odchylenie standardowe (OD) z trzech niezależnych doświadczeń prowadzonych w tryplikatach.

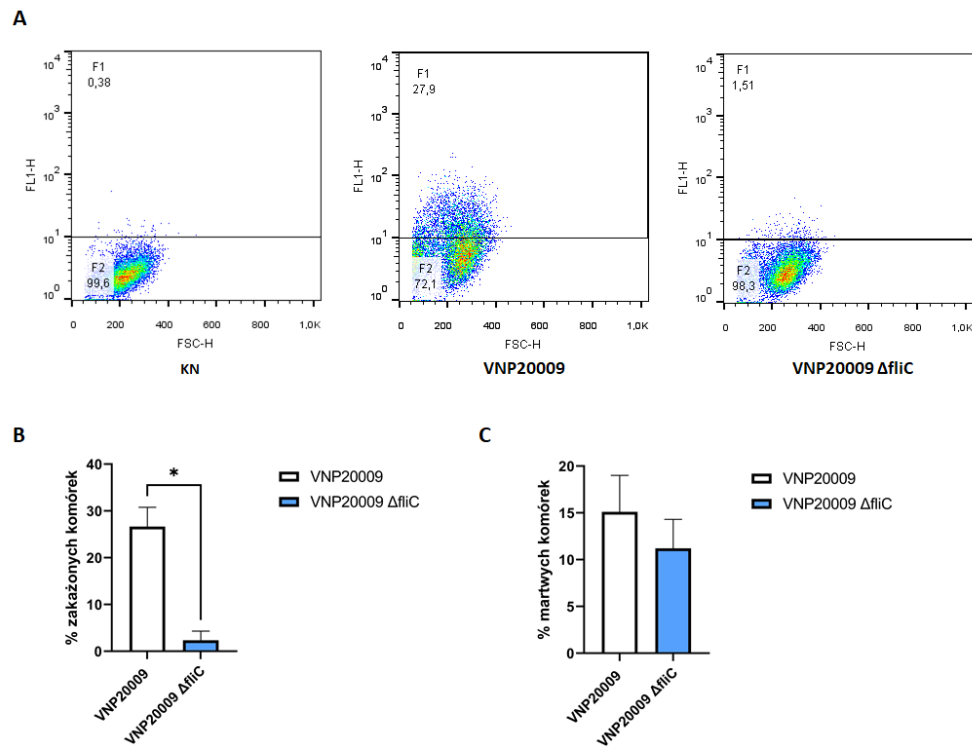
7.9.3 Badanie zdolności bakterii VNP20009 i VNP20009 Δ fliC do zakażenia i wywoływania śmierci komórkowej komórek linii monocytarno-makrofagowej RAW264.7

Ponieważ bakterie *S. Typhimurium* należą do patogenów wewnątrzkomórkowych przeprowadzono eksperymenty sprawdzające wpływ delecji genu *fliC* na zdolność bakterii do zakażenia komórek modelowych mysiej linii monocytarno-makrofagowej RAW264.7, będących powszechnym modelem w badaniach charakteryzujących bakterie rodzaju *Salmonella* [462], [463]. Po wnikięciu do wnętrza komórek gospodarza *S. Typhimurium* pozostaje przez pewien czas w pęcherzykach SCV, których ciągłość błony jest utrzymywana m.in. przez białko SifB, którego promotor ulega aktywacji wyłącznie wtedy, kiedy bakterie znajdują się wewnątrz komórek gospodarza [464].

Bakterie szczepów VNP20009 i VNP20009 Δ fliC poddano elektroporacji plazmidem pBR322-PSifB-gfp-c'1 zawierającym sekwencję genu białka GFP, którego ekspresja znajduje się pod kontrolą promotora białka SifB (mapę plazmidu przedstawia Rysunek S 3 w rozdziale Załączniki). Dzięki temu możliwe było określenie populacji komórek eukariotycznych, które zostały zasiedlone przez bakterie *S. Typhimurium* VNP20009 i VNP20009 Δ fliC z wykluczeniem bakterii przylegających do błony komórkowej po jej zewnętrznej stronie.

Procedurę infekcji prowadzono tak jak opisano w rozdziale 6.2.9 przy MOI = 100, co miało zapewnić maksymalny poziom zakaźności przez bakterie szczepu VNP20009.

Optymalizację testów zakaźności przeprowadzono w ramach pracy magisterskiej autorki [465]. Stwierdzono wówczas, że przy MOI 100 ulega zakażeniu 40% komórek RAW264.7 (odnotowano MFI próbki wynoszące $5,6 \pm 0,52$). Następnie komórki były inkubowane przez ok. 16 h, co dawało czas na utworzenie pęcherzyka SCV i syntezę fluorescencyjnego białka GFP. Po tym czasie badano poziom ekspresji białka GFP przy pomocy cytometrii przepływowej (Rysunek 10 A i B).



Rysunek 10. Wpływ delekcji genu *fliC* w genomie bakterii terapeutycznego szczepu VNP20009 na ich patogenność względem komórek linii monocytarno-makrofagowej RAW264.7. Analiza cytofluometryczna poziomu zakażenia komórek RAW264.7 przez badane szczepy *Salmonella*. Reprezentatywny wynik jednej z dwóch przeprowadzonych analiz (**A**), porównanie poziomu zakażonych komórek RAW264.7 wyrażonej procentowo (**B**), poziom śmiertelności komórek linii RW264.7 w wyniku zakażenia bakteriami mierzony poziomem uwolnionego LDH (względem maksymalnego poziomu LDH uwolnionego z komórek poddanych lizie) (**C**). Podano wartości średnie \pm OD z dwóch (B) lub trzech (C) niezależnych doświadczeń prowadzonych w duplikatach (B) lub tetraplikatach (C). * $P < 0,05$. KN – kontrola negatywna, komórki niepoddane zakażeniu.

Stosunkowo niski poziom zakażenia komórek RAW264.7 przez bakterie szczepu VNP20009 przy zastosowaniu wysokiego MOI (Rysunek 10 A, B) może potencjalnie wynikać z faktu, że VNP20009 jest szczepem atenuowanym, o nieznanym wpływie wszystkich wygenerowanych w procesie mutagenyzy zmian genetycznych na fenotyp

bakterii, na co wskazują Broadway i wsp. [213], [466], [467]. Autorzy prac nie badają co prawda zakażenia makrofagów przez bakterie szczepu VNP20009, ale jednoznacznie wskazują, że w genomie bakterii VNP20009 istnieje wiele różnego rodzaju mutacji o nieznanym wpływie na fenotyp bakterii, dlatego niewykluczone, że obniżona zdolność do zakażenia komórek wynika z jednej z takich mutacji, choć jednoznaczne potwierdzenie tej hipotezy wymagałoby dalszych badań. Bakterie szczepu VNP20009 infekują $26,6 \pm 4,1\%$ komórek (wartość MFI wynosiła $4,2 \pm 0,3$). Usunięcie genu *fliC* znacząco obniża inwazyjność bakterii; jedynie $2,3 \pm 1,9\%$ komórek RAW264.7 zostało zakażonych przez szczep VNP20009 $\Delta fliC$ (Rysunek 10 B; wartość MFI wynosiła $0,59 \pm 0,1$). Wynik ten może wydawać się negatywny z punktu widzenia potencjalnego zastosowania bakterii w terapii przeciwnowotworowej. Jednak należy pamiętać, że celem tej pracy jest uzyskanie szczepu zdolnego do sekrecji rozpuszczalnego czynnika hamującego wpływ PD-L1 na limfocyty T w tkance guza, a nie bezpośrednie zabijanie komórek nowotworowych. Dlatego być może przy lokalizacji pozakomórkowej bakterii planowana immunoterapia odniosłaby lepszy skutek. Ponadto, w tym miejscu należy dodać, że bakterie nie tylko aktywnie zakażają komórki makrofagowe, ale również mogą być przez nie fagocytowane. Praca Lovewella i wsp. sugeruje, że bakterie *E. coli* pozbawione genu *fliC* są odporne na fagocytozę oraz sugeruje również, że zjawisko to występuje dla wielu bakterii Gram-ujemnych takich jak *Salmonella*. Zjawisko obniżonej fagocytozy mogłoby tłumaczyć obniżony poziom wewnątrzkomórkowych bakterii VNP20009 $\Delta fliC$ [468]. Jednak w celu weryfikacji tej hipotezy niezbędne są dalsze badania.

Bakterie *S. Typhimurium* wywołują śmierć komórek gospodarza m.in. w wyniku przerwania ciągłości błony komórkowej spowodowanej aktywacją szlaku pyroptozy zależnej od białek bakteryjnych w tym flageliny lub niekiedy intensywną replikacją bakterii [469]–[471]. W celu sprawdzenia wpływu bakterii na śmierć komórek gospodarza związaną z uwolnieniem zawartości cytoplazmy oznaczono poziom dehydrogenazy mleczanowej (LDH, ang. *lactate dehydrogenase*) uwolnionej do pożywki hodowlanej. Otrzymany wynik (Rysunek 10 C) wskazuje, że śmiertelność komórek zakażonych bakteriami VNP20009 mierzona poziomem uwolnionego enzymu LDH wynosi $15,1 \pm 3,9\%$, zaś bakteriami VNP20009 $\Delta fliC$ $11,2 \pm 3,1\%$. Oznacza to, że pomimo

znacznie obniżonej infekcyjności bakterii z wprowadzoną delecją, utrzymywany jest podobny poziom śmiertelności zakażanych komórek RW264.7, co pozwala sądzić, że w tym przypadku flagelina FliC nie jest kluczowym elementem wywołującym śmierć komórek tej linii prowadzącą do uwolnienia zawartości cytoplazmy. Najprawdopodobniej przyczyną śmierci badanych komórek jest działanie innego czynnika bakteryjnego, który również prowadzi do uwolnienia zawartości cytoplazmy.

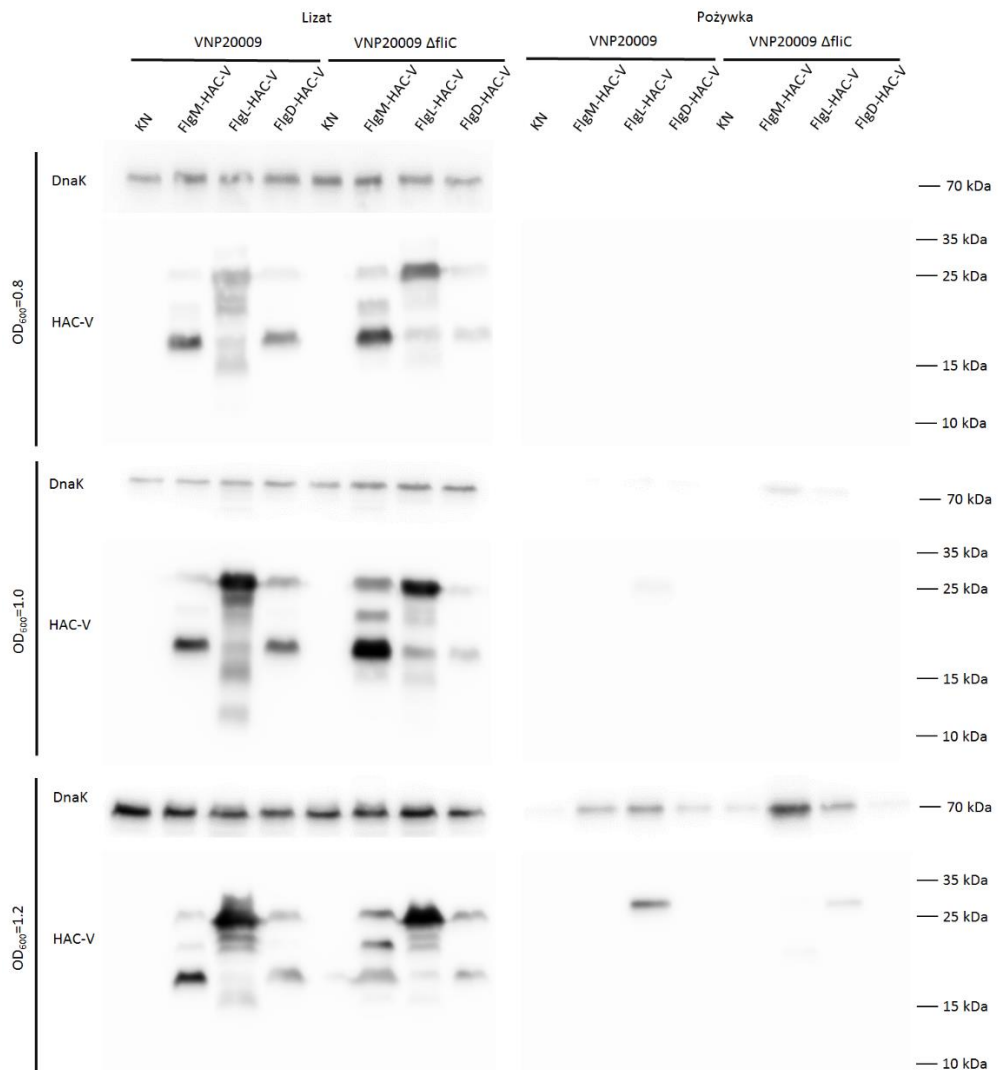
7.4 Analiza ekspresji i sekrecji białek fuzyjnych o potencjale terapeutycznym z wykorzystaniem systemu flagelinowego bakterii szczepu *S. Typhimurium* VNP20009 oraz VNP20009 Δ fliC

Plazmidy pGFPuv-FlgL-HAC-V, pGFPuv-FlgD-HAC-V oraz pGFPuv-FlgM-HAC-V kodujące białka fuzyjne FlgL-HAC-V, FlgD-HAC-V oraz FlgM-HAC-V, zostały przygotowane wg procedury opisanej w rozdziale 6.2.11, gdzie przedstawiono również blokowy schemat kasety sekrecyjnej (Rysunek 7). Każda z kaset sekrecyjnych posiadała sekwencję odpowiadającą za dostarczenie sygnału sekrecyjnego połączoną z sekwencją kodującą białko HAC-V za pomocą linkera. Sygnału sekrecyjnego dostarczały odpowiednio sekwencje kodujące N-końcową domenę białka FlgL lub FlgD o długości 100 reszt aminokwasowych oraz sekwencja kodująca pełnej długości 97-aminokwasowe białko FlgM (opisano w rozdziale 7.1). Za sekwencją sekrecyjną umieszczono sekwencję linkera wraz z metką FLAG, którego funkcją było (i) połączenie dwóch domen w taki sposób, aby każda z nich zachowała swoją funkcjonalność, a jednocześnie nie ingerowała w funkcję drugiej domeny oraz (ii) możliwość detekcji każdego z białek fuzyjnych za pomocą jednego rodzaju przeciwciał (anty-FLAG) metodą western blotting. Sekwencja linkera wraz z metką FLAG została oflankowana miejscami restrykcyjnymi, aby w razie potrzeby można było ją usunąć (przy ewentualnych, dalszych modyfikacjach sekwencji). Ostatnim elementem kasety sekrecyjnej była sekwencja kodująca potencjalnie terapeutyczne białko HAC-V, którego funkcją jest wiązanie PD-L1.

W tym miejscu warto nadmienić, że celowo umieściłam sekwencje kodujące białka fuzyjne pod kontrolą promotora laktozowego, uwzględniając fakt, że bakterie rodzaju *Salmonella* utraciły zdolność produkcji represora laktozowego podczas ewolucji [472]. Dzięki temu możliwa była stała transkrypcja wprowadzonych genów z promotora laktozowego. Ten zabieg miał na celu: (i) utrzymanie niższego, ale stałego poziomu

ekspresji białek (w porównaniu do poziomu białek w nadekspresji), co zmniejsza prawdopodobieństwo powstawania agregatów białek w komórce, które z pewnością nie ulegałyby sekrecji, (ii) pominąć etap indukcji ekspresji białek podczas potencjalnych badań *in vivo*, i pozwoliłoby wyeliminować dodatkową zmienną eksperymentu (takie jak np.: trudne do kontroli stężenie induktora w tkance guza).

Bakterie szczepów VNP20009 i VNP20009 $\Delta fliC$ zostały stransformowane tymi plazmidami wg protokołu opisanego w rozdziale 6.2.4. Hodowla bakteryjna była prowadzona do osiągnięcia gęstości optycznej 0,8; 1,0 oraz 1,2 po czym pobierano część zawiesiny i strącano białka z pożywki hodowlanej z użyciem TCA (końcowe stężenie = 20%) w celu zagęszczenia próbek. Osady bakteryjne były zawieszane w takiej samej objętości jak próbki pochodzące z pożywki i poddane sonikacji. Wszystkie próbki rozdzielono elektroforetycznie stosując SDS-PAGE, a następnie białka rekombinowane analizowano techniką western blotting z wykorzystaniem przeciwciał rozpoznających metkę FLAG w obrębie białek fuzyjnych. Integralność błony weryfikowano przez analizę obecności DnaK w lizacie i pożywce po hodowli bakterii.



Rysunek 11. Analiza western blotting produkcji i wydzielania do pożywki fuzyjnych białek FlgM-HAC-V, FlgL-HAC-V oraz FlgD-HAC-V. Lewy panel przedstawia poziom białek fuzyjnych oraz białka referencyjnego DnaK w lizatach komórkowych; prawy panel przedstawia poziom białek fuzyjnych i DnaK w pożywkach hodowlanych VNP20009 lub VNP20009 $\Delta fliC$ transformowanych odpowiednimi plazmidami. Hodowle prowadzono do uzyskania ich gęstości optycznej $OD_{600} = 0,8; 1,0; i 1,2$. KN – kontrola negatywna; bakterie niepoddane transformacji plazmidami.

Ekspresja białek fuzyjnych FlgM-HAC-V (27,1 kDa), FlgL-HAC-V (27,3 kDa) i FlgD-HAC-V (26,7 kDa) zachodzi zarówno w bakteriach szczepu VNP20009 jak i VNP20009 $\Delta fliC$ (Rysunek 11). W każdym przypadku obserwowano degradację białek oraz obecność prążka o masie cząsteczkowej 16 kDa, którego wielkość co prawda odpowiada fragmentowi białka HAC-V z dołączonym linkerem i metką FLAG, jednak w celu jego identyfikacji należałoby wykonać np. sekwencjonowanie metodą chemiczną (degradacja Edmana). Nie tym etapie badań nie można było również wykluczyć wystąpienia proteolizy, do której mogłoby dojść podczas sonikacji [473].

Białko FlgM-HAC-V ulega ekspresji na znacznie wyższym poziomie w bakteriach VNP20009 $\Delta fliC$ w porównaniu do szczepu wyjściowego. Wynik wskazuje na wyraźne produkty o m.cz. ok. 16 kDa oraz ok. 20 kDa (określono na podstawie wzorca mas molekularnych białek). Nie zaobserwowano prążka pochodzącego od białka pełnej długości FlgM-HAC-V w pożywce hodowlanej ani w przypadku szczepu VNP20009 ani VNP20009 $\Delta fliC$.

Białko FlgL-HAC-V ulega ekspresji w bakteriach obu szczepów, jednak w tym przypadku dochodzi do powstania serii produktów, w tym obserwowanego wcześniej produktu o m.cz. ok. 16 kDa, co jest dobrze widoczne zwłaszcza dla bakterii szczepu VNP20009 $\Delta fliC$.

Przy $OD_{600} = 1,0$ dochodzi do pojawienia się prążka pochodzącego od białka FlgL-HAC-V w medium hodowlanym pobranym po wirowaniu z nad bakterii szczepu VNP20009, co może wskazywać na jego sekrecję, a przy $OD_{600} = 1,2$, prążek FlgL-HAC-V jest obserwowany w pożywce hodowlanej obu szczepów. Niestety, zaobserwowano również obecność białka DnaK na dość wysokim poziomie w medium hodowlanym. Białko DnaK jest wewnątrzkomórkowym białkiem opiekuńczym, odpowiadającym m.in. za fałdowanie białek. Dlatego taki wynik wyraźnie wskazuje na bierne uwalnianie FlgL-HAC-V wraz z zawartością cytoplazmy, a nie jego aktywną sekrecję.

Ostatnie testowane białko FlgD-HAC-V ulega ekspresji w bakteriach obu szczepów na niższym poziomie w porównaniu do pozostałych białek fuzyjnych i nie obserwuje się jego obecności w pożywce hodowlanej w żadnym z testowanych warunków.

Analiza densytometryczna porównująca sygnały chemiluminescencyjne DnaK w lizatach i pożywkach oraz sygnały pochodzące od białek fuzyjnych w lizatach i pożywkach wykazała, że żadne z białek fuzyjnych nie uległo sekrecji ani przez komórki bakterii szczepu VNP20009 ani VNP20009 $\Delta fliC$ (wyniku nie załączono).

Postanowiłam sprawdzić, czy brak sekrecji wynika z własności syntezowanych białek fuzyjnych, czy też może być związany z cechami użytego do badań atenuowanego

szczepu VNP20009. Badania analogiczne do wcześniej opisanych, przeprowadziłam na szczepie dzikim LT2.

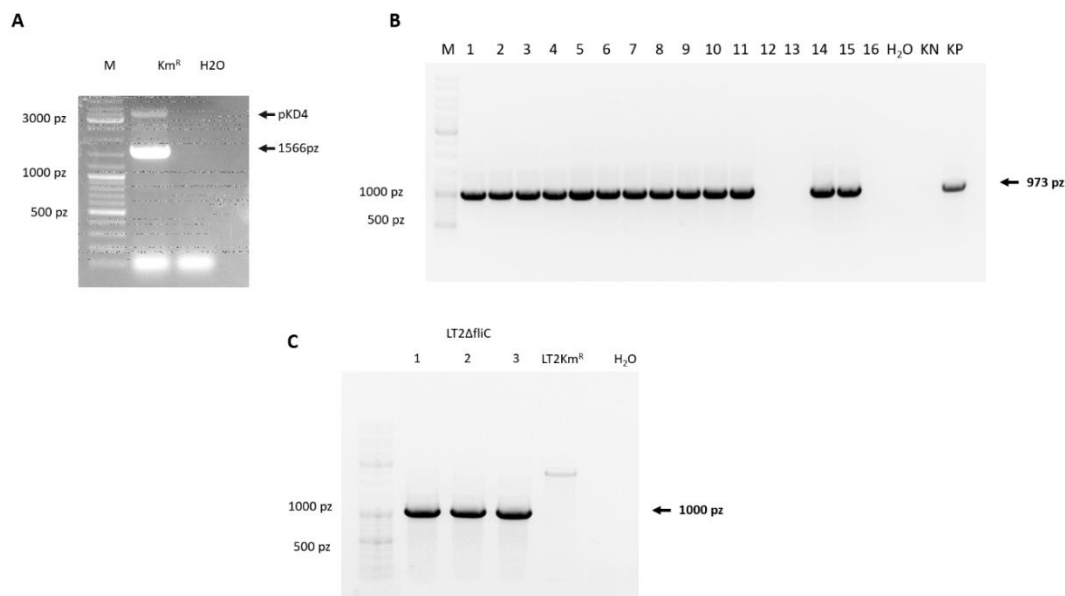
7.5 Zastosowanie systemu flagelinowego bakterii szczepu dzikiego *S. Typhimurium* LT2 do sekrecji fuzyjnych białek

Podczas badań opisanych w poprzedniej części pracy nie udało się otrzymać sekrecji białek fuzyjnych FlgM-HAC-V, FlgD-HAC-V i FlgL-HAC-V w szczepach bakteryjnych VNP20009 i VNP20009 Δ *fliC*. Na tamtym etapie prac podejrzewałam, że może to być spowodowane (i) nieznanym wpływem mutacji nagromadzonych w genomie bakterii terapeutycznego szczepu VNP20009 na system sekrecyjny lub (ii) wynikać z faktycznego braku usunięcia wici bakteryjnej, co mogło być związane z produkcją flageliny drugiej fazy FljB (opisano w rozdziale 4.7; Rysunek 4). Moje przypuszczenie oparłam na pracy Brodway i wsp., którzy wskazują, że bakterie szczepu VNP20009 posiadają mutacje o nieznanym wpływie na fenotyp bakterii i którzy wykazali, że punktowa mutacja należącego do F-T3SS białka CheY hamuje jego aktywność, przez co bakterie VNP20009 nie są zdolne do zmiany kierunku rotacji rotora, co z kolei wpływa negatywnie na ich ruchliwość [213], [466]. W celu sprawdzenia czy przedstawione wcześniej białka fuzyjne mogą być wydzielane za pomocą F-T3SS przez bakterie, które nie są obciążone mutacjami będącymi wynikiem atenuacji, w dalszych badaniach testowałam szczep typu dzikiego *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotyp Typhimurium LT2. Szczep LT2 jest najbliższym spokrewnionym ze szczepem 14028S, z którego został wyprowadzony szczep bakteryjny YS72, który z kolei stał się protoplastą dla szczepu VNP20009 [213], [474]. Podjęłam również działania mające na celu wprowadzenie delecji genów *fliB* oraz *flgK* (gen kodujący monomer budujący proksymalny pierścień łącznika; Rysunek 4), co miało ostatecznie zapewnić zablokowanie powstawania wici, której (i) obecność powodowałaby wydłużenie drogi transportu białka oraz (ii) której monomery mogłyby silnie konkutować o światło kanału systemu flagelinowego z białkiem fuzyjnym zawierającym HAC-V.

7.6 Delecje genów systemu flagelinowego w bakteriach dzikiego szczepu *S. Typhimurium* LT2

Badania prowadzone na bakteriach szczepu LT2 rozpoczęto od delecji genów kodujących białka flageliny FljC, flageliny FljB, białka łącznikowego FlgK oraz uzyskania

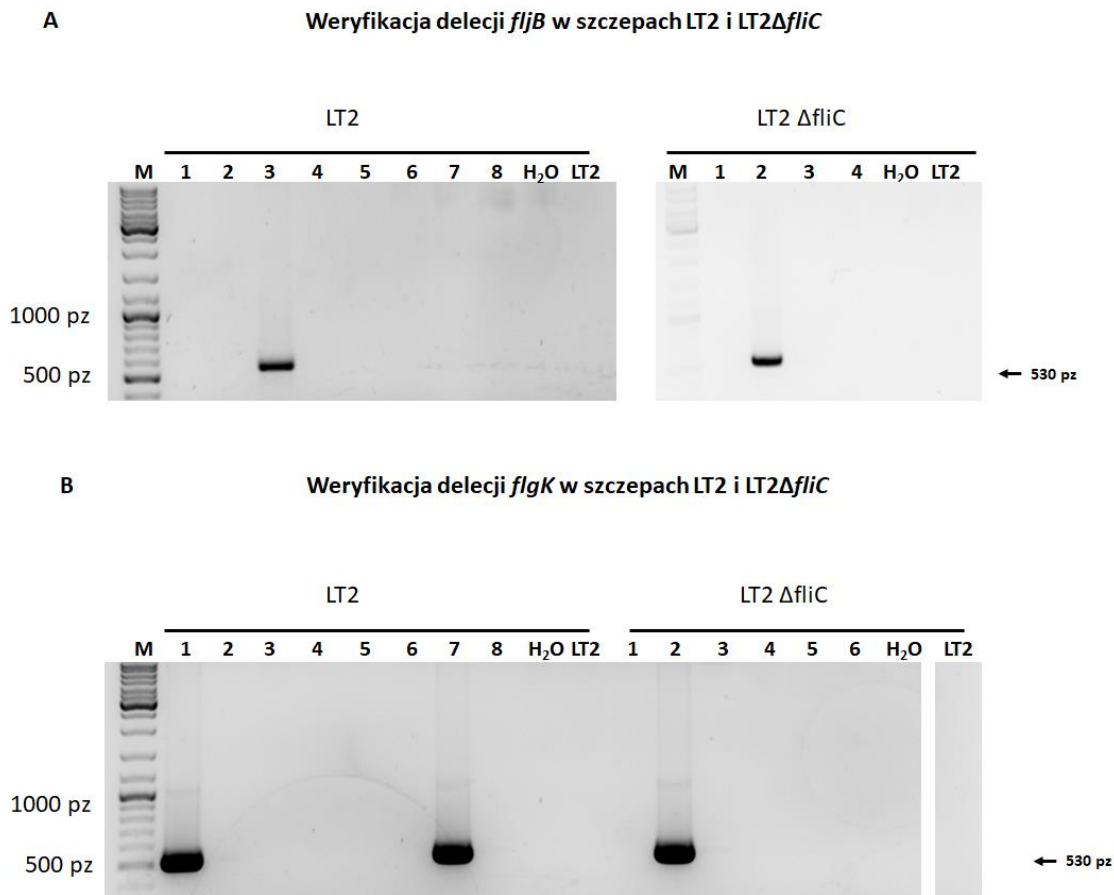
podwójnych mutantów $\Delta fliC \Delta fljB$ i $\Delta fliC \Delta flgK$. Wszystkie mutacje zostały przeprowadzone z użyciem rekombinazy λ Red oraz rekombinazy FLP opisanych w rozdziale 6.2.6 i analogicznie do metodologii wprowadzenia delecji genów w obrębie chromosomu bakterii szczepu VNP20009. Kasety Km^R , które zawierały gen kodujący oporność na kanamycynę z dołączonymi na końcu 5' i 3' sekwencjami flankującymi genomową sekwencję usuwanego genu i dołączonymi sekwencjami FLP zostały przygotowane jak opisano w rozdziale 6.2.5. Rysunek 12 przedstawia kolejne etapy pracy prowadzącej do delecji *fliC* w szczepie LT2. Sekwencję Km^R oflankowaną sekwencjami otaczającymi *fliC* namnożono wykorzystując plazmid pKD4 i odpowiednie startery przedstawione w Tabeli 1 (Rysunek 12 A). Po przeprowadzeniu rekombinacji obecność kasety Km^R w genomie bakterii szczepu LT2 została potwierdzona przy pomocy reakcji PCR z pojedynczych kolonii z użyciem startera komplementarnego do sekwencji poprzedzającej genomową sekwencję genu *fliC* oraz startera, który jest komplementarny do fragmentu sekwencji kasety Km^R . Obecność prążka odpowiadającego wielkości 973 pz potwierdza wprowadzenie kasety Km^R w miejsce genu *fliC* (Rysunek 12 B). Do dalszej manipulacji genetycznej użyto klonu 2. Kasetę Km^R została usunięta z genomu bakterii szczepu LT2 z użyciem rekombinazy FLP. Następnie, uzyskane klony bakteryjne zostały przetestowane pod kątem usunięcia kasety Km^R z genomu. W tym celu przeprowadzono reakcję PCR z pojedynczych kolonii przy wykorzystaniu starterów komplementarnych do sekwencji znajdujących się 500 pz poniżej i powyżej genomowej sekwencji genu *fliC*. Przy użyciu tak dobranych starterów, obecność prążka o wielkości 1000 pz potwierdza usunięcie kasety Km^R z genomu, podczas gdy powstanie produktu o wielkości 2500 pz świadczy o obecności sekwencji o wielkości 1500 pz pochodzącej od genomowej kasety Km^R (Rysunek 12 C). Bakterie klonu 2 szczepu LT2 $\Delta fliC$ posłużyły jako szczep wyjściowy do uzyskania bakterii z podwójnymi delecjami genów w genomie.



Rysunek 12. Delecja genu *fliC* w genomie bakterii *S. Typhimurium* szczepu dzikiego LT2. Rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji sekwencji kasety Km^R (A), rozdział elektroforetyczny produktów PCR uzyskanych na matrycy genomowego DNA bakterii *S. Typhimurium* LT2 pochodzących z klonów bakteryjnych 1-16 potwierdzający delecję genu *fliC* z równoczesnym wprowadzeniem kasety Km^R do genomu bakteryjnego (B), rozdział elektroforetyczny produktów PCR uzyskanych na matrycy genomowego DNA bakterii *S. Typhimurium* LT2 pochodzących z klonów bakteryjnych 1-3 potwierdzający usunięcie kasety Km^R z genomu (C). KN – kontrola negatywna (bakterie LT2), KP – kontrola pozytywna (VNP20009 Δ *fliC* Km^R), LT2Km^R- bakterie LT2 z wprowadzoną kasetą Km^R. H₂O – kontrola czystości odczynników: próbka po reakcji PCR w której woda była dodana w miejsce matrycy. M – wzorzec wielkości fragmentów DNA

Podjęto próbę usunięcia z chromosomu bakterii szczepu LT2 oraz LT2 Δ *fliC* genów *fljB* i *flgK* wykorzystując metodę rekombinacji homologicznej opisaną powyżej. W większości klonów posiadających oporność na kanamycynę nie doszło do integracji kasety Km^R z genomem w miejscach występowania genów *fljB* lub *flgK*, co przejawia się brakiem produktu PCR o wielkości 530 pz (Rysunek 13). Pojedyncze klony bakteryjne LT2 Δ *fljB* (klon 3), LT2 Δ *fliC* Δ *fljB* (klon 2; Rysunek 13A) oraz LT2 Δ *flgK* (klon 1) i LT2 Δ *fliC* Δ *flgK* (klon 2) (Rysunek 13 B) zostały pobrane do hodowli płynnych w celu usunięcia genomowej kasety Km^R metodą rekombinacji homologicznej fragmentów FLP. Procedura została wykonana jedynie na preparacie bakteryjnym LT2 Δ *fliC* Δ *flgK*, ponieważ pozostałe szczepy nie podejmowały podziałów komórkowych w hodowli płynnej. Podjęto cztery próby wprowadzenia delecji genów *fljB* do genomu bakterii LT2 i LT2 Δ *fliC* oraz delecji genu *flgK* do genomu bakterii LT2. Za każdym razem testowano wszystkie obecne na płytce kolonie bakteryjne, a ich liczba nie przekraczała 12. Wynik przedstawiony na

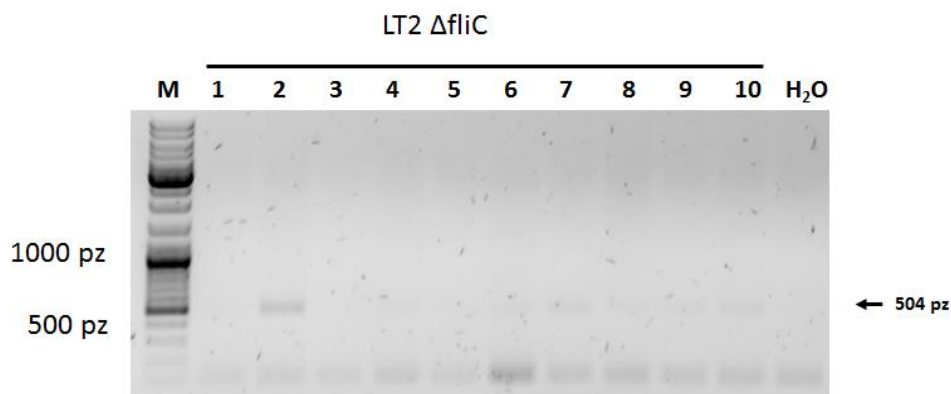
rysunku 9 jest jedynym, w którym potwierdzono obecność integracji kasety Km^R z genomem w miejscach występowania genów *fljB* lub *flgK*, ale tak jak wspomniano wcześniej nie podejmowały one podziałów komórkowych w hodowli płynnej.



Rysunek 13. Delekcje genów *fljB* i *flgK* w genomie bakterii *S. Typhimurium* LT2 oraz LT2 Δ *fliC*. Rozdział elektroforetyczny produktów PCR uzyskanych na matrycy genomowego DNA bakterii *S. typhimurium* LT2 pochodzących z klonów bakteryjnych 1-8 oraz LT2 Δ *fliC* pochodzących z klonów 1-4 weryfikujący delekcję genu *fljB* z równoczesnym wprowadzeniem kasety Km^R do genomu bakteryjnego (**A**), rozdział elektroforetyczny produktów PCR uzyskanych na matrycy genomowego DNA bakterii *S. Typhimurium* LT2 pochodzących z klonów bakteryjnych 1-8 oraz LT2 Δ *fliC* pochodzących z klonów 1-6 potwierdzający delekcję genu *flgK* z równoczesnym wprowadzeniem kasety Km^R do genomu bakteryjnego (**B**) Bakterie LT2 Δ *fliB*, LT2 Δ *fliC* Δ *fliB* oraz LT2 Δ *fliC* Δ *fliB* oraz LT2 Δ *fliC* Δ *fliB* nie podejmowały podziałów komórkowych w hodowli płynnej, dlatego nie było możliwe ich użycie do dalszej procedury. LT2- matryca genomowego DNA bakterii LT2. M – wzorzec wielkości fragmentów DNA.

Procedura rekombinacji homologicznej fragmentów FLP prowadząca do usunięcia genomowej kasety Km^R w bakteriach szczepu LT2 Δ *fliC* Δ *fliB* została przeprowadzona jak opisano w rozdziale 6.2.6. Do reakcji PCR z pojedynczych kolonii użyto starterów o sekwencjach komplementarnych do sekwencji znajdujących się ok. 250 pz poniżej i powyżej genomowej sekwencji genu *flgK*. Analiza rozdziału

elektroforetycznego produktów reakcji PCR wskazuje na obecność produktu o wielkości ok. 500 pz co odzwierciedla brak genomowej kasety Km^R w miejscu genu *flgK* (Rysunek 14). Gdyby *flgK* nie został usunięty produkt reakcji PCR miałby wielkość 1981 pz. Bakterie klonu 2 szczepu LT2 $\Delta fliC \Delta fljB$ zostały użyte do dalszych procedur.



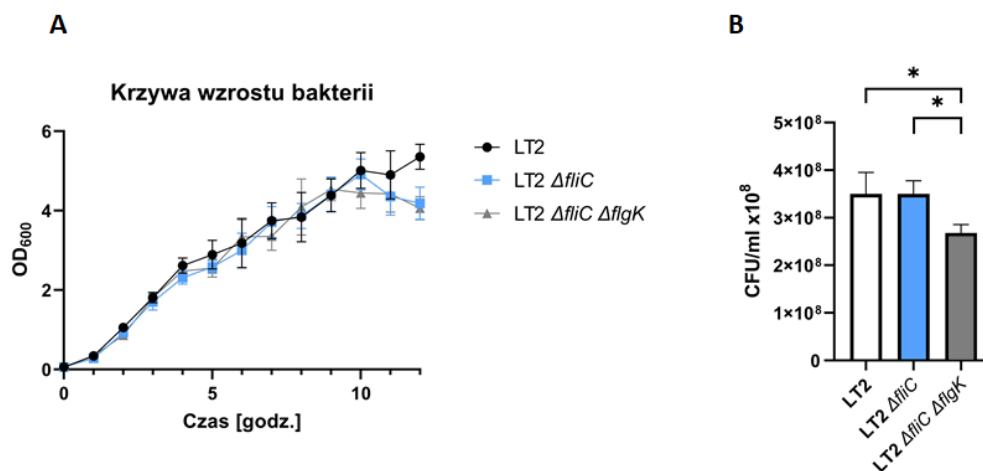
Rysunek 14. Usunięcie kasety Km^R z genomu bakterii LT2 $\Delta fliC \Delta fljB$. Rozdział elektroforetyczny produktów PCR uzyskanych na matrycy genomowego DNA bakterii *S. Typhimurium* LT2 $\Delta fliC \Delta fljB$ pochodzących z klonów bakteryjnych 1-10 potwierdzający usunięcie kasety Km^R z genomu o czym świadczy obecność prążka odpowiadającego oczekiwanej wielkości produktu (504 pz.). M – wzorzec wielkości fragmentów DNA.

7.7 Wpływ delecji genu *fliC* oraz podwójnej delecji genów *fliC* i *flgK* na zmiany fenotypu bakterii szczepu *S. Typhimurium* LT2

W przypadku bakterii szczepu dzikiego LT2 z powodzeniem udało się wprowadzić nie tylko delecję genu *fliC*, ale również genu *flgK*. Podobnie jak w przypadku bakterii szczepu VNP20009 sprawdzono wpływ wprowadzonych mutacji na podstawowe cechy fenotypowe bakterii.

7.9.1 Krzywa wzrostu bakterii szczepu *S. Typhimurium* LT z wprowadzoną delecją genu *fliC* oraz delecjami *fliC* i *flgK*

Tempo wzrostu hodowli bakterii było monitorowane poprzez pomiar gęstości optycznej przy $\lambda = 600$ nm. Faza inkubacyjna jak również początek fazy logarytmicznego wzrostu mają zbliżony przebieg w przypadku wszystkich trzech testowanych szczepów (Rysunek 15 A).



Rysunek 15. Analiza wpływu delekcji genu *fliC* oraz podwójnej delekcji genów *fliC* i *flgK* na wybrane cechy bakterii *S. Typhimurium* LT2. Na rysunku przedstawiono przebieg krzywych wzrostu (A), żywotność (B). Podano wartości średnie \pm odchylenie standardowe z dwóch (A) lub trzech (B) niezależnych doświadczeń prowadzonych w tryplikatach. * P < 0,05.

W hodowlach bakterii LT2 $\Delta fliC \Delta flgK$ oraz LT2 $\Delta fliC$ szybciej dochodzi do osiągnięcia fazy zahamowanego wzrostu i w konsekwencji rozpoczęcia fazy stacjonarnej w porównaniu do przebiegu krzywej dla bakterii LT2. Bakterie szczepów LT2 $\Delta fliC$ i LT2 $\Delta fliC \Delta flgK$ osiągają początek fazy zamierania w 12. godzinie prowadzenia hodowli, co potwierdzają ujemne wartości współczynnika przyrostu hodowli w tej godzinie ($-0,09 \pm 0,03/h$ LT2 $\Delta fliC$ oraz $-0,27 \pm 0,06/h$ dla LT2 $\Delta fliC \Delta flgK$). Bakterie szczepu LT2 są zdolne do dłuższej kontynuacji fazy logarytmicznego wzrostu w wyniku czego w skali czasowej eksperymentu nie zaobserwowano początku fazy stacjonarnej. Wszystkie wyliczone dla bakterii szczepu LT2 współczynniki przyrostu hodowli mają wartości dodatnie, tym samym potwierdzając brak rozpoczęcia fazy zamierania podczas trwania pomiarów. Taki wynik sugeruje, że czas życia hodowli bakterii szczepu dzikiego LT2 jest dłuższy od tych z wprowadzonymi delekcjami genów. Oznacza to, że wprowadzenie delekcji *fliC* i podwójnej delekcji *fliC*, *flgK* skraca fazę logarytmicznego wzrostu i wpływa na szybsze starzenie się hodowli bakterii szczepu dzikiego LT2. Taki sam efekt tj. wcześniejsze spowolnienie wzrostu pod wpływem delekcji *fliC* obserwowano dla bakterii szczepu VNP20009 (Rysunek 9).

7.9.2 Badanie żywotności bakterii szczepu *S. Typhimurium* LT z wprowadzoną delecją genu *fliC* oraz delecjami *fliC* i *flgK*

W celu pełniejszej analizy zmian fenotypu bakteryjnych mutantów szczepu dzikiego LT2 sprawdzono jaki wpływ na żywotność bakterii wywiera wprowadzenie delecji genów *fliC* i *flgK*. Żywotność bakterii poszczególnych szczepów została określona za pomocą testu Milesa i Misry, co zostało opisane w rozdziale 6.2.8.

Żywotność bakterii szczepów LT2, LT2 $\Delta fliC$ i LT2 $\Delta fliC \Delta flgK$ wynosi odpowiednio $3,5 \times 10^8 \pm 4,9 \times 10^7$ CFU/mL, $3,35 \times 10^8 \pm 2,8 \times 10^7$ CFU/mL i $2,7 \times 10^8 \pm 2,2 \times 10^7$ CFU/mL w fazie logarytmicznego wzrostu. Oznacza to, że wprowadzenie delecji genu *fliC* nie doprowadziło do spadku żywotności bakterii szczepu dzikiego LT2, jednak dodatkowo wprowadzona delecja genu *flgK* zmniejszyła żywotność bakterii o ok. 23% prowadzonej hodowli (Rysunek 15 B). Uwzględniając fakt, że bakterie zostały pobrane w początkowej fazie logarytmicznego wzrostu otrzymany wynik potwierdza, że nie wszystkie bakterie w zawieszynie obserwowane poprzez pomiar gęstości optycznej są w stanie podjąć podziały na podłożu stałym co sugeruje, że są martwe. Może być to konsekwencją albo delecji genu *flgK* albo wypadkowego efektu dwóch delecji w genomie bakterii szczepu LT2. W celu weryfikacji tej hipotezy należałoby zbadać wpływ delecji tylko *flgK*, jednak bakterii LT2 $\Delta flgK$, jak wspomniano wcześniej, nie udało się otrzymać.

7.9.3 Badanie zdolności bakterii szczepu LT2 oraz bakterii z wprowadzonymi delecjami genów *fliC* i *flgK* do zakażenia i wywoływania śmierci komórkowej komórek linii monocytarno-makrofagowej RAW264.7

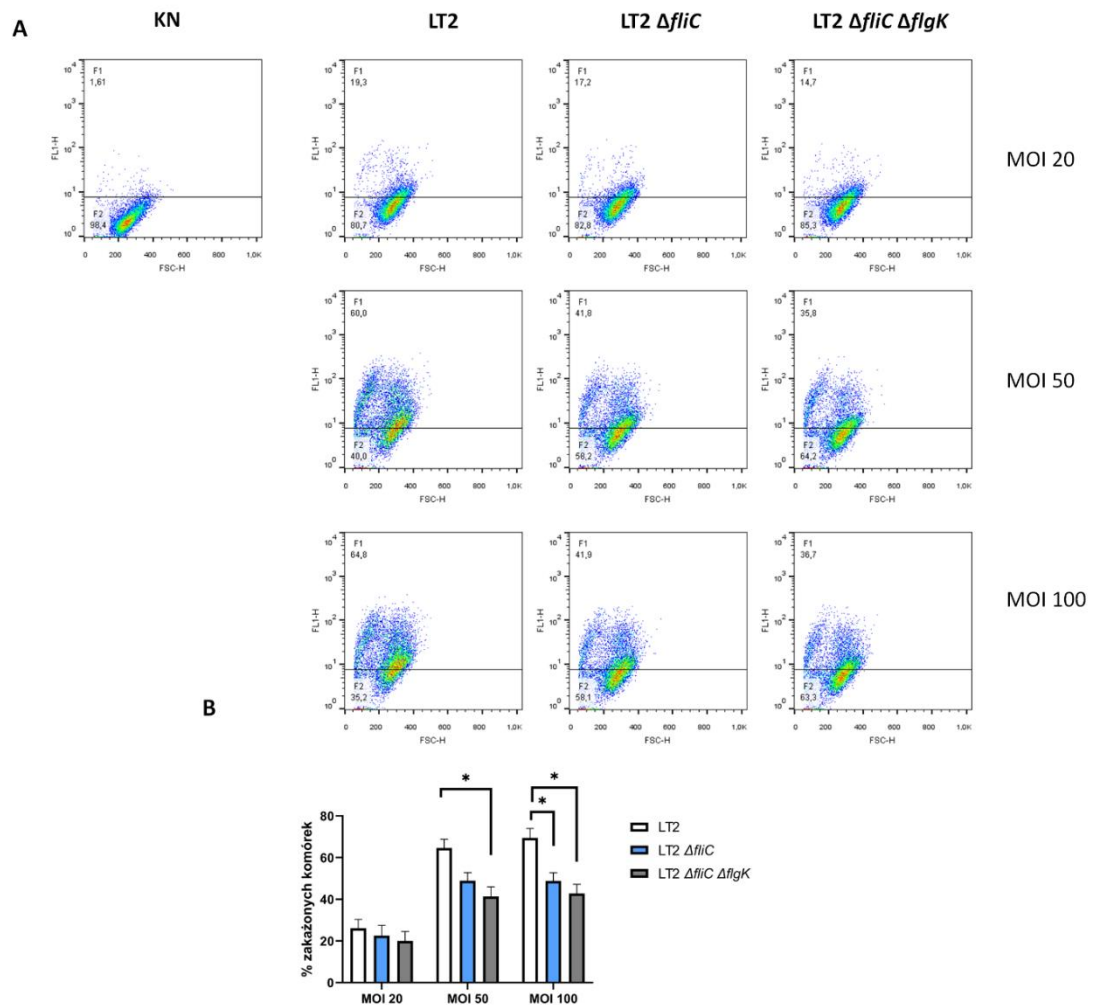
Bakterie szczepu dzikiego LT2 oraz szczepów z wprowadzonymi delecjami LT2 $\Delta fliC$ i LT2 $\Delta fliC \Delta flgK$ zostały poddane transformacji plazmidem pBR322-PSifB-gfp-c1 zawierającym sekwencję genu białka GFP, którego ekspresja znajduje się pod kontrolą promotora genu *sifB* (Rysunek S 3). Następnie bakterie te zostały użyte do zakażenia komórek mysiej linii monocytarno-makrofagowej RAW264.7. Ponieważ szczep LT2 nie był dotychczas poddany charakterystyce w naszych warunkach eksperymentalnych, przedstawione wyniki zawierają rozszerzoną charakterystykę zakaźności komórek linii RAW264.7.

Zgodnie z przypuszczeniami poziom zakażonych komórek linii RAW264.7 bakteriami szczepów LT2, LT2 $\Delta fliC$ oraz LT2 $\Delta fliC \Delta flgK$ wzrasta wraz ze wzrostem wartości

stosowanego MOI. Jednocześnie obserwuje się spadek poziomu zakaźności bakterii z wprowadzonymi mutacjami w stosunku do bakterii szczepu dzikiego (Rysunek 16 A). Maksymalny poziom zakażenia bakteriami LT2 wynosi $70 \pm 4,6\%$ przy użytym MOI 100, zaś dla bakterii LT2 $\Delta fliC$ i LT2 $\Delta fliC \Delta flgK$ wynosi on odpowiednio $49 \pm 3,9\%$ i $43 \pm 4,5\%$ (Rysunek 16 B). Przy MOI 20 zakaźność dla szczepu LT2 wynosi ok. 26,1%, zaś przy MOI 50 dwa razy więcej, ale zwiększenie MOI do 100 w niewielkim stopniu wpływa na liczbę zakażonych komórek. Analogiczną zależność zaobserwowano dla szczepów LT2 $\Delta fliC$ i LT2 $\Delta fliC \Delta flgK$. Stosując MOI 20 nie zaobserwowano znaczącej różnicy w zakaźności pomiędzy badanymi szczepami, w przeciwieństwie do MOI 50 i 100. Brak przyrostu ilości zakażonych komórek przy dwukrotnym wzroście MOI wynika z faktu, że przy MOI 50 ilość bakterii była wystarczająca aby osiągnąć ten sam procent zakażonych komórek gospodarza jak przy zastosowaniu MOI 100. Zjawisko to zostało przedstawione w pracy Gog i wsp. którzy wykazali, że odsetek zakażonych komórek posiadających tę samą liczbę wewnątrzkomórkowych bakterii *S. Typhimurium* szczepu SL1344 jest porównywalny dla MOI 50 i 100, a ilość zakażonych komórek nie jest wprost proporcjonalna do wzrastającej wartości MOI [475].

Poziom zakażenia komórek RAW264.7 bakteriami LT2 i LT2 $\Delta fliC$ dla MOI 50 i 100 wyraźnie wskazuje, że brak flageliny FliC obniża poziom infekcyjności bakterii. Bakterie LT2 $\Delta fliC$ wykazywały obniżony poziom zakaźności makrofagów o ok. 3,5%, 16% oraz 21% dla MOI 20, 50 i 100 w porównaniu do bakterii LT2 (Rysunek 16 B). Wprowadzenie dodatkowej delecji $\Delta flgK$ tylko nieznacznie obniża stopień zakażenia komórek RAW264.7 w stosunku do LT2 $\Delta fliC$. Dla MOI 20, 50 i 100 zaobserwowano spadek poziomu zakaźności o ok. 6,1%, 23% oraz 27% bakterii LT2 $\Delta fliC \Delta flgK$ w stosunku do LT2. Różnica zakaźności LT2 $\Delta fliC$ i LT2 $\Delta fliC \Delta flgK$ pomimo, że jest nie wielka, może wynikać z obniżonej żywotności bakterii LT2 $\Delta fliC \Delta flgK$. W tym miejscu warto dodać, że wyniki otrzymane dla szczepu terapeutycznego VNP20009 wskazywały spadek zakaźności o 25,6% po usunięciu genu *fliC* zaś u bakterii szczepu dzikiego LT2 o 21%, jednak wyjściowy poziom zakażenia bakterii VNP20009 był znacznie niższy niż bakterii LT2 (27 % vs. 70%).

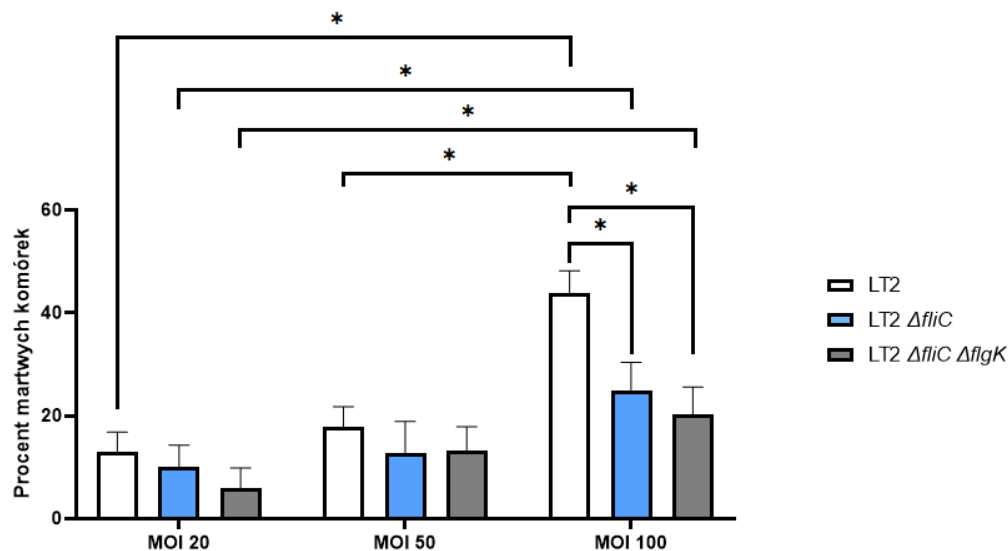
Otrzymany wynik mógłby także sugerować, że białko FlgK nie bierze udziału w procesie zakażenia - konkluzja taka wymagałaby dodatkowo zweryfikowana poziomu zakaźności bakterii LT2 $\Delta flgK$, których nie udało się jednak otrzymać jak opisano wcześniej.



Rysunek 16. Wpływ delekcji genu *fliC* i podwójnej delekcji genów *fliC* i *flgK* w genomie bakterii szczepu LT2 na zakaźność komórek linii monocytarno-makrofagowej RAW264.7. Analiza cytofluorymetryczna poziomu zakaźności komórek RAW264.7. Wynik jest reprezentatywny dla dwóch niezależnych doświadczeń (A), porównanie poziomu zakażonych komórek RAW264.7 wyrażonych procentowo dla MOI=100. Podano wartości średnie \pm odchylenie standardowe z dwóch niezależnych doświadczeń prowadzonych w duplikatach (B). * $P < 0,05$. KN – kontrola negatywna, komórki niepoddane zakażeniu.

Podobnie jak w przypadku analizy bakterii terapeutycznego szczepu VNP20009 sprawdzono w jakim stopniu bakterie szczepów LT2, LT2 $\Delta fliC$ oraz LT2 $\Delta fliC \Delta flgK$ mogą wywoływać śmierć zakażonych komórek eukariotycznych. W tym celu analizowano zdolność bakterii do przerywania ciągłości błony komórkowej komórek gospodarza

i uwolnienia zawartości cytoplazmy wraz z LDH. Otrzymany wynik (Rysunek 17) wskazuje, że dochodzi do proporcjonalnego wzrostu śmiertelności zakażonych komórek w stosunku do zastosowanego MOI. Wpływ mutacji wprowadzonych do genomu bakterii LT2 na poziom śmiertelności zakażonych komórek jest najsilniej obserwowany przy MOI 100. Bakterie szczepu wyjściowego LT2 wywołują śmiertelność komórek na poziomie $44 \pm 4,2\%$, podczas gdy LT2 $\Delta fliC$ jedynie na poziomie $25 \pm 5,4\%$, a LT2 $\Delta fliC \Delta flgK$ - $20 \pm 5,3\%$. Niższy poziom cytotoksyczności bakterii LT2 $\Delta fliC$ i LT2 $\Delta fliC \Delta flgK$ koreluje z niższym stopniem ich infekcyjności. Jednak podobnie jak w przypadku testów infekcyjności, podczas testów cytotoksyczności nie obserwuje się znaczącej różnicy pomiędzy bakteriami LT2 $\Delta fliC$ i LT2 $\Delta fliC \Delta flgK$.



Rysunek 17. Wpływ delecji genów *fliC* oraz *fliC* wraz z *flgK* na cytotoksyczność bakterii szczepu LT2 na komórki linii RAW264.7. Wykres przedstawia porównanie poziomu śmiertelności zakażonych komórek RAW264.7 wyrażonej procentowo. Podano wartości średnie \pm odchylenie standardowe z trzech niezależnych doświadczeń prowadzonych w tetraplikatach. * $P < 0,05$.

7.8 Analiza ekspresji i sekrecji białek fuzyjnych o potencjale terapeutycznym z wykorzystaniem systemu flagelinowego bakterii szczepu *S. Typhimurium* LT2, LT2 $\Delta fliC$ oraz LT2 $\Delta fliC \Delta flgK$

W kolejnych eksperymentach sprawdzono, czy uzyskane szczepy LT2 z delecjami białek systemu F-T3SS są zdolne do syntezy i wydzielania fuzyjnych białek terapeutycznych FlgM-HAC-V (27,1 kDa), FlgL-HAC-V (27,3 kDa) i FlgD-HAC-V (26,7 kDa). Testy ekspresji i sekrecji białek zostały wykonane analogicznie do testów prowadzonych z użyciem bakterii szczepu terapeutycznego VNP20009 wg protokołu opisanego

w rozdziale 6.2.13. W skrócie: hodowle poszczególnych szczepów bakteryjnych po elektroporacji konstruktami pGFPuv-FlgM-HAC-V, pGFPuv-FlgL-HAC-V lub pGFPuvFlgD-HAC-V prowadzono przez do osiągnięcia $OD_{600}=0,8$; 1,0 i 1,2. Lizaty sonikowano, zaś białka z pożywki hodowlanej strącano 20% TCA. Próbkę poddawano elektroforezie SDS-PAGE i po przeniesieniu białek na membrany analizowano z wykorzystaniem przeciwciał wykrywających metkę FLAG lub białko DnaK.

Białko DnaK jest kontrolą poziomu syntezy białek w poszczególnych szczepach bakteryjnych a jego obecność w pożywce świadczyć może o uwalnianiu białek komórkowych nie w wyniku sekrecji, ale w wyniku uwolnienia zawartości cytoplazmy do pożywki. Zaobserwowano rosnący wraz z czasem prowadzenia hodowli poziom DnaK w lizatach bakteryjnych. Zaobserwowano obecność DnaK w pożywkach szczepu dzikiego LT2 przy $OD_{600} = 1,0$ oraz $OD_{600} = 1,2$, niezależnie od tego czy komórki były transformowane plazmidem kodującym jedno z białek fuzyjnych czy nie. Jednocześnie nie obserwowano DnaK (lub obserwowano na granicy wykrywalności) w pożywce hodowlanej bakterii LT2 $\Delta fliC \Delta flgK$ przy $OD_{600} = 1,0$ oraz $OD_{600} = 1,2$ dla FlgM-HAC-V i FlgL-HAC-V (wyjątek FlgD-HAC-V – omówione w dalszej części pracy).

Wyniki wskazują, że w żadnym ze szczepów nie powstaje FlgM-HAC-V o pełnej długości (27,1 kDa). Zaobserwowano natomiast wyraźny prążek odpowiadający masie cząsteczkowej ok. 16 kDa, czyli zgodnej z masą cząsteczkową białka HAC-V wraz z dołączonym linkerem i metką FLAG (16,1 kDa), jednak prążek należałoby poddać identyfikacji (np. sekwencjonowanie metodą Edmana). Najwyższy poziom tego białka obserwuje się w lizacie szczepu LT2 $\Delta fliC \Delta flgK$ przy najkrótszym czasie hodowli, co sugeruje, że ulega ono degradacji. Białko to nie jest jednak wydzielane na zewnątrz (Rysunek 18). Prążek o masie cząsteczkowej ok. 16 kDa był obserwowany również w lizatach bakterii VNP20009 ani VNP20009 $\Delta fliC$ (Rysunek 11).

Akumulacja FlgL-HAC-V w bakteriach szczepu dzikiego LT2 jest widoczna dopiero się przy $OD_{600} = 1,0$. Dochodzi wówczas do spontanicznego uwolnienia białka fuzyjnego do pożywki hodowlanej, o czym świadczy obecność zewnątrzkomórkowego DnaK.

W porównaniu do bakterii szczepu dzikiego LT2, w bakteriach szczepów LT2 $\Delta fliC$ i LT2 $\Delta fliC \Delta flgK$ FlgL-HAC-V jest obserwowany już przy osiągnięciu przez hodowle gęstości optycznej $OD_{600} = 0,8$. W trakcie prowadzenia hodowli LT2 $\Delta fliC$ nie obserwuje się

uwolnienia FlgL-HAC-V do pożywki, jednak dochodzi do jego uwolnienia w bakteriach LT2 $\Delta fliC \Delta flgK$ przy $OD_{600} = 1,0$ i $1,2$, z równoczesnym uwolnieniem niewielkiej (będącej na granicy wykrywalności) ilości DnaK (Rysunek 18). Analiza densytometryczna (dane niepokazane) wykazała, że FlgL-HAC-V ulega sekrecji w niewielkim stopniu. Dla bakterii VNP20009 oraz VNP20009 $\Delta fliC$ również obserwowano prążek pochodzący od FlgL-HAC-V w pożywce hodowlanej (Rysunek 11), jednak analiza densytometryczna wykazała, że białko nie jest wydzielane.

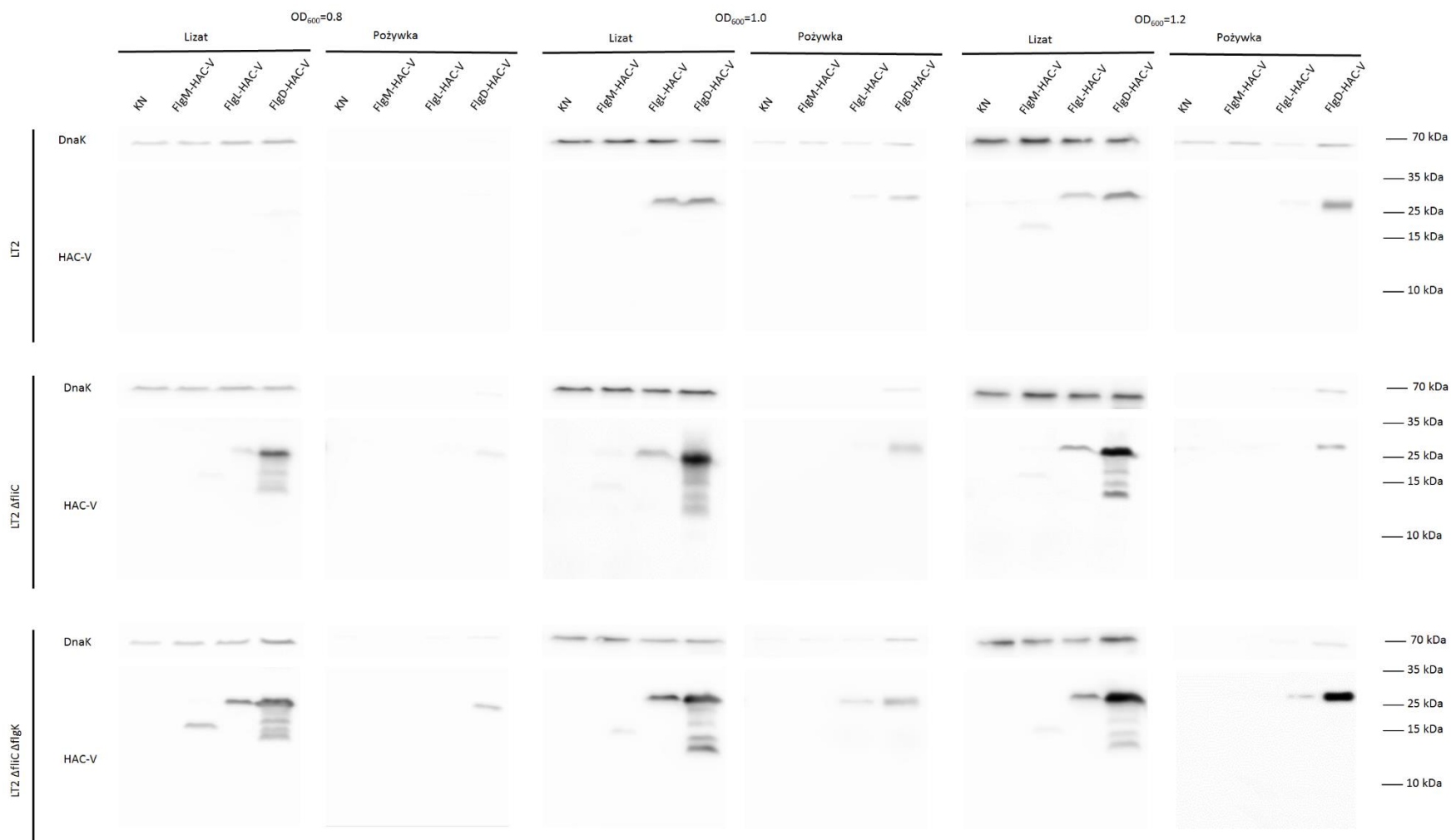
Obecność białka fuzyjnego FlgD-HAC-V jest obserwowana w bakteriach szczepu dzikiego LT2 jak i w bakteriach LT2 $\Delta fliC$ i LT2 $\Delta fliC \Delta flgK$ już przy osiągnięciu przez hodowlę $OD_{600}=0,8$, mimo iż w pierwszym przypadku ilość obserwowanego białka jest na granicy wykrywalności (Rysunek 18). W szczepach bakteryjnych LT2 $\Delta fliC$ i LT2 $\Delta fliC \Delta flgK$ dochodzi do pojawienia się prążka pochodzącego od FlgD-HAC-V w pożywce hodowlanej dla próbek pobranych przy $OD_{600}= 0,8$. Białku fuzyjnemu towarzyszy niewielka ilość referencyjnego białka cytoplazmatycznego DnaK, co wskazuje na to, że część komórek bakteryjnych uległa lizie i doszło do uwolnienia białek cytozolowych na zewnątrz komórki. Jednakże poziom DnaK w pożywkach szczepu LT2 $\Delta fliC \Delta flgK$ produkujących FlgD-HAC-V jest niski i porównywalny we wszystkich badanych punktach OD_{600} . Z kolei poziom białka FlgD-HAC-V jest coraz wyższy w pożywkach w każdym kolejnym punkcie hodowli ($OD_{600}=0,8; 1,0; 1,2$), co wskazuje na sekrecję białka FlgD-HAC-V. Wydzielane białko ma odpowiednią masę cząsteczkową, co świadczy o tym, że nie jest zdegradowane. Analiza densytometryczna wykazała, że bakterie LT2 $\Delta fliC \Delta flgK$ przy $OD_{600}=0,8$ wydzielają białko FlgD-HAC-V w minimalnym stopniu; poziom jego sekrecji wzrasta w kolejnych punktach pomiarowych (Rysunek 19).

Podsumowanie

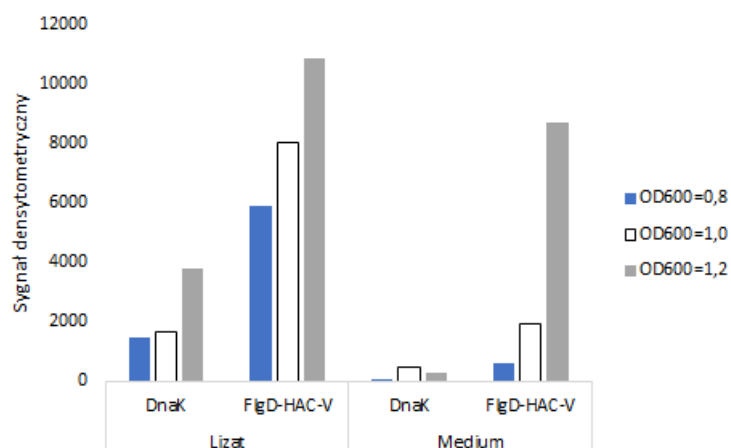
W powyższej części pracy przedstawiono wyniki eksperymentów przeprowadzonych w celu weryfikacji hipotezy, że genetyczna modyfikacja flagelinowego systemu sekrecyjnego F-T3SS bakterii *S. Typhimurium* umożliwi wydajne wydzielanie białka terapeutycznego oddziałującego z PD-L1. Opisano proces otrzymywania bakterii szczepu atenuowanego VNP20009 i szczepu dzikiego LT2 z wprowadzoną do genomu delecją genu *fliC*. Ponadto wykorzystując bakterie szczepu

LT2 $\Delta fliC$ otrzymano szczep z podwójną delecją genomową LT2 $\Delta fliC \Delta flgK$. Celem wprowadzenia powyższych delecji było zapobieganie powstawaniu wici bakteryjnej, która mogłaby negatywnie wpływać na sekrecję białek fuzyjnych. Delecja genu *fliC* w bakteriach szczepu VNP20009 spowodowała obniżenie poziomu zakaźności komórek makrofagowych przy równoczesnym zachowaniu poziomu cytotoksyczności. W szczepie LT2 wprowadzenie delecji $\Delta fliC$ oraz $\Delta fliC \Delta flgK$ powodowało skrócenie fazy logarytmicznego wzrostu hodowli, a w ostatnim szczepie dodatkowo obserwowano spadek żywotności bakterii o ok.23% porównaniu do szczepu WT. Oba mutanty infekowały komórki makrofagowe słabiej o ok.25% (przy MOI 100) w porównaniu do szczepu LT2, co również przełożyło się na ich niższą cytotoksyczność.

Następnie, we wszystkich pięciu szczepach bakteryjnych przetestowano ekspresję i sekrecję trzech białek fuzyjnych FlgM-HAC-V, FlgL-HAC-V i FlgD-HAC-V, posiadających trzy różne sekwencje sekrecyjne. Uzyskano wydajną ekspresję FlgL-HAC-V w bakteriach szczepów VNP20009 oraz VNP20009 $\Delta fliC$, natomiast szczepy LT2 $\Delta fliC$ oraz LT2 $\Delta fliC \Delta flgK$ wydajnie syntetyzowały FlgD-HAC-V. Zwiększając się w kolejnych punktach pomiarowych sekrecję FlgD-HAC-V do pożywki hodowlanej obserwowano jedynie w komórkach szczepu LT2 z delecjami $\Delta fliC \Delta flgK$. Pomimo obiecującego wyniku dalszych prac nie kontynuowano ze względu na rozpoczęcie innych projektów związanych z zastosowaniem inhibitorów przeciwko PD-L1 jako elementów pasywnej immunoterapii przeciwnowotworowej, co zostanie opisane w dalszej części pracy.



Rysunek 18. Analiza Western blotting produkcji (lizat) i wydzielania do pożywki (pożywka) fuzyjnych białek FlgM-HAC-V, FlgL-HAC-V oraz FlgD-HAC-V. Panel przedstawia zarówno poziom produkowanego białka HAC-V jak i poziom białka referencyjnego DnaK w zależności od badanej gęstości optycznej hodowli bakteryjnej szczepu LT2, LT2 Δ fliC lub LT2 Δ fliC Δ flgJK.



Rysunek 19. Poziom sekrecji białka fuzyjnego FlgD-HAC-V. Wykres przedstawia poziom sygnału densytometrycznego dla wyniku przedstawionego na rysunku 18.

7.9 Charakterystyka wybranych aptamerów skierowanych przeciwko osi PD-1/PD-L1

7.9.1 Wykorzystanie aptamerów oligonukleotydowych ssDNA do zahamowania aktywności osi PD-1/PD-L1

Kolejnym narzędziem immunoterapii przeciwnowotworowej, przedstawionym w niniejszej pracy, są aptamery ssDNA skierowane przeciwko osi PD-1/PD-L1. Aptamery zostały otrzymane przez dra Stanisława Malickiego w Zakładzie Mikrobiologii WBBiB UJ. Sekwencje aptamerów ssDNA rozpoznające zewnątrzkomórkowe domeny receptora PD-1 (aptamery P2c2s oraz p34) oraz jego liganda PD-L1 (aptamer L2c2s) zostały wyselekcjonowane w procesie wieloetapowej selekcji metodą SELEX z wykorzystaniem biblioteki ssDNA otrzymanej w Zakładzie Mikrobiologii WBBiB UJ. Selekcję prowadzono względem rekombinowanych zewnątrzkomórkowych domen PD-1 i PD-L1, które biorą udział w interakcji PD-1/PD-L1. Otrzymane aptamery ssDNA wymagały charakterystyki i zbadania ich zdolności wiązania białek osi PD-1/PD-L1, jak i potencjału do hamowania tworzenia kompleksu w układzie komórkowym *in vitro*. W niniejszej pracy przedstawiono wybrane elementy charakterystyki aptamerów skierowanych przeciwko osi PD-1/PD-L1.

7.9.2 Charakterystyka aptameru ssDNA rozpoznającego domenę IgV ludzkiego białka PD-L1

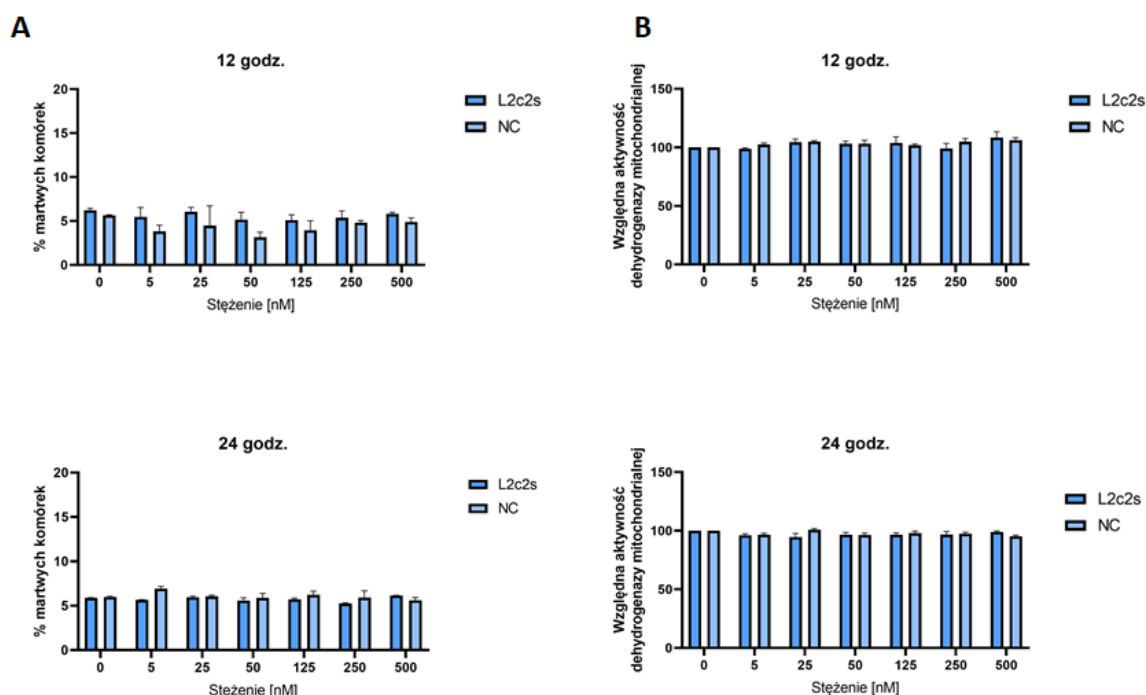
W rozdziałach 7.9.2-7.9.5 przedstawiono charakterystykę aptameru L2c2s wyselekcjonowanego metodą SELEX na zewnątrzkomórkowej domenie IgV ludzkiego PD-L1 (o zakresie reszt aminokwasowych 18-134). Białko zostało wyprodukowane w systemie prokariotycznym i otrzymane za pomocą procedury refoldingu. Aptamery rozpoznające PD-L1,

które zostały otrzymane po 5., 6. oraz 7. rundzie selekcji zostały poddane sekwencjonowaniu i analizie bioinformatycznej, co pozwoliło na ich podział względem podobieństwa sekwencji (sekwencje zostały podzielone na grupy c1, c2, c3 i c4). Aptamery każdej z grup zostały przetestowane pod kątem zdolności wiązania się do domeny IgV ludzkiego PD-L1 (18-134) w teście ELISA (testy przeprowadzone przez dra Stanisława Malickiego; test wykonano z użyciem biotynylowanego aptameru oraz streptawidyny skoniugowanej z HRP). Do dalszej analizy został wybrany aptamer L2c2s, który dawał najwyższy sygnał oraz występował z największą częstością spośród wszystkich sekwencji grupy c2. Aptamer L2c2s wykazywał również wysoki poziom wiązania immobilizowanego ludzkiego PD-L1 (o zakresie reszt aminokwasowych 18-239) w porównaniu do niespecyficznego sekwencji ssDNA, użytej jako kontrola negatywna w teście ELISA. Selektywność aptameru L2c2s została określona w teście ELISA poprzez porównanie zdolności wiązania do PD-L1 oraz do białek mysiej i ludzkiej surowicy jak również albuminy surowicy wołowej. Zaobserwowano przynajmniej dwukrotny wzrost absorbancji pochodzący od L2c2s w studzienkach pokrytych PD-L1 w porównaniu do studzienek pokrytych pozostałymi białkami. Kolejny etap analizy aptameru L2c2s obejmował jego charakterystykę w układzie komórkowym. Część otrzymanych wyników została wykonana przez autorkę i opisana w ramach niniejszej pracy. Badania obejmowały testy zdolności wiązania aptameru L2c2s do ludzkiego PD-L1 eksponowanego na powierzchni komórek chemicznej linii nowotworu jajnika aAPC/CHO-K1 jak również określenie potencjału aptameru do hamowania tworzenia kompleksu PD-1/PD-L1 w układzie komórkowym. Ponadto określono cytotoksyczność L2c2s względem badanych komórek.

7.9.3 Oznaczenie cytotoksyczności aptameru L2c2s względem komórek aAPC/CHO-K1 hPD-L1 w warunkach *in vitro*

W celu określenia cytotoksyczności aptameru L2c2s oraz odpowiadającej mu sekwencji kontrolnej NC L2c2s (sekwencji niespecyficznego) wykonano pomiary aktywności mitochondrialnej komórek testem MTT oraz test aktywności cytoplazmatycznego enzymu LDH uwalnianego do pożywki hodowlanej pod wpływem przerwania integralności błony komórkowej. Do badań wykorzystano komercyjnie dostępne komórki aAPC/CHO-K1 wykazujące stabilną nadekspresję ludzkiego hPD-L1 (ang. *human PD-L1*). Przetestowano stężenia aptameru w zakresie 5-500 nM i stwierdzono, że w tym zakresie stężeń nie obserwuje się negatywnego efektu aptameru na komórki (Rysunek 20). Dlatego w dalszych analizach

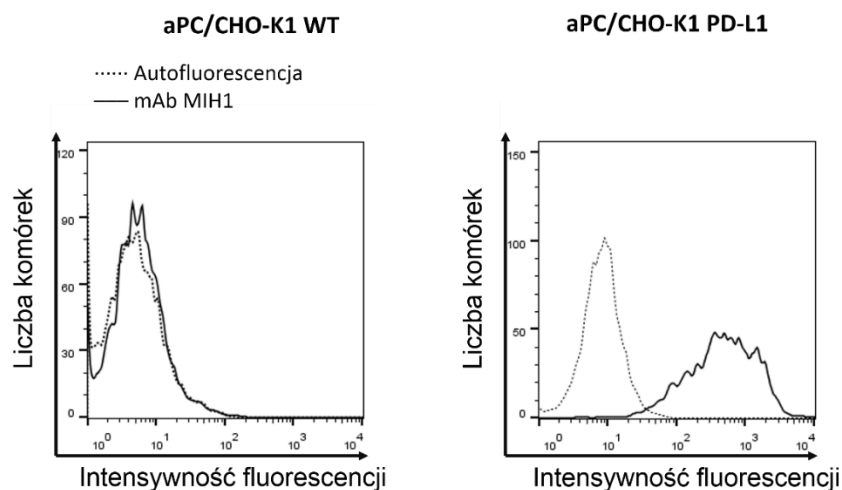
wykorzystano aptamer L2c2s jak również sekwencję kontrolną w stężeniach 5-500 nM, przy których nie obserwowano cytotoksycznego wpływu na badane komórki aAPC/CHO-K1 hPD-L1.



Rysunek 20. Badanie cytotoksycznego wpływu aptameru L2c2s komórki aAPC/CHO-K1 PD-L1. Wykres przedstawia porównanie poziomu śmiertelności komórek po 12 h i 24 h w teście aktywności uwolnionego do medium cytoplazmatycznego LDH (A) oraz w teście MTT badającym aktywność mitochondrialną komórek (B) aptamerów L2c2s i niespecyficznej sekwencji NC. PC- kontrola pozytywna testu aktywności uwolnionego enzymu LDH (komórki poddane lizie). Podano wartości średnie \pm odchylenie standardowe z jednego doświadczenia prowadzonego w tryplikatach.

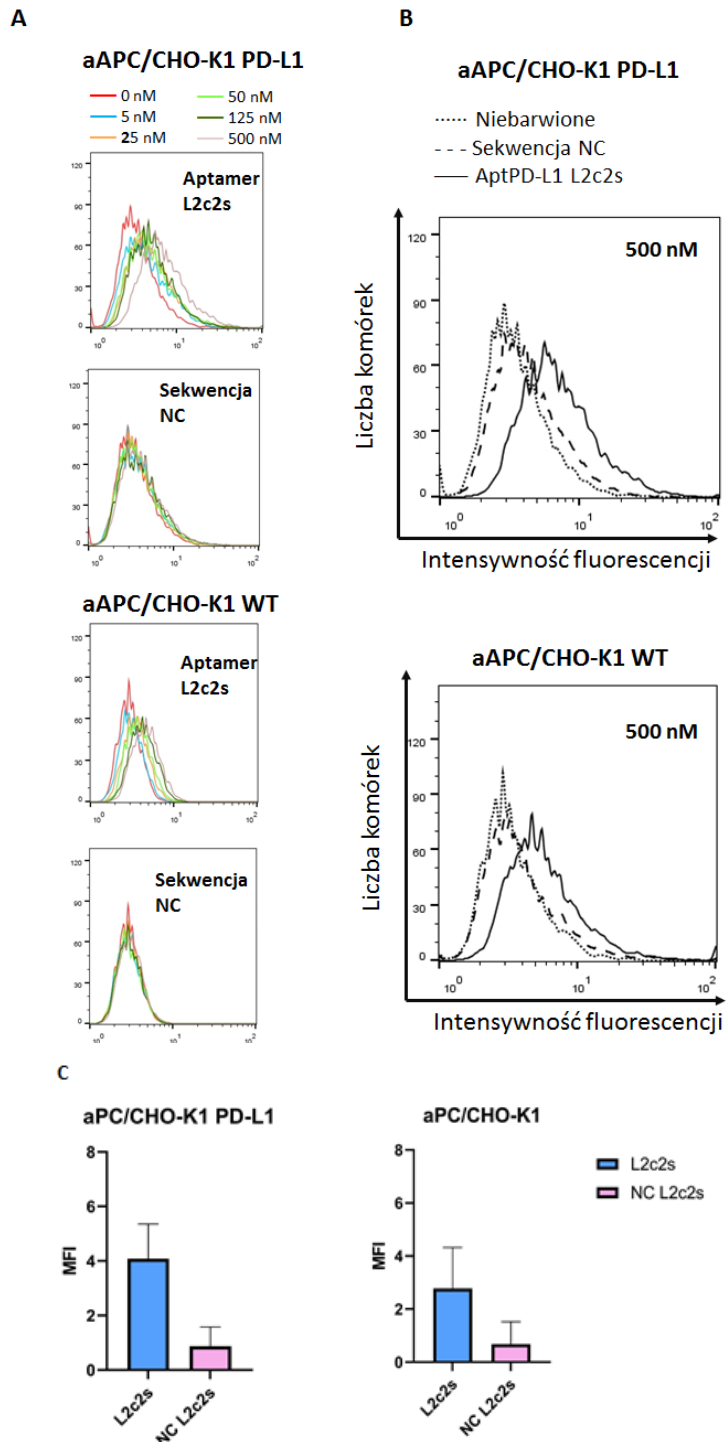
7.9.4 Analiza zdolności wiązania aptameru L2c2s z PD-L1 w warunkach *in vitro*

W celu potwierdzenia specyficznego wiązania PD-L1 przez aptamer L2c2s, wykonano testy *in vitro* wykorzystując komórki aAPC/CHO-K1 hPD-L1. Obecność hPD-L1 na powierzchni komórek została potwierdzona cytofluorymetrycznie za pomocą barwienia przeciwciałami znakowanymi fluorescencyjnie. Procedurę barwienia opisano w rozdziale 6.2.14. Wynik wskazuje, że komórki aAPC/CHO-K1 hPD-L1 wykazują wysoką ekspresję hPD-L1 (Rysunek 21).



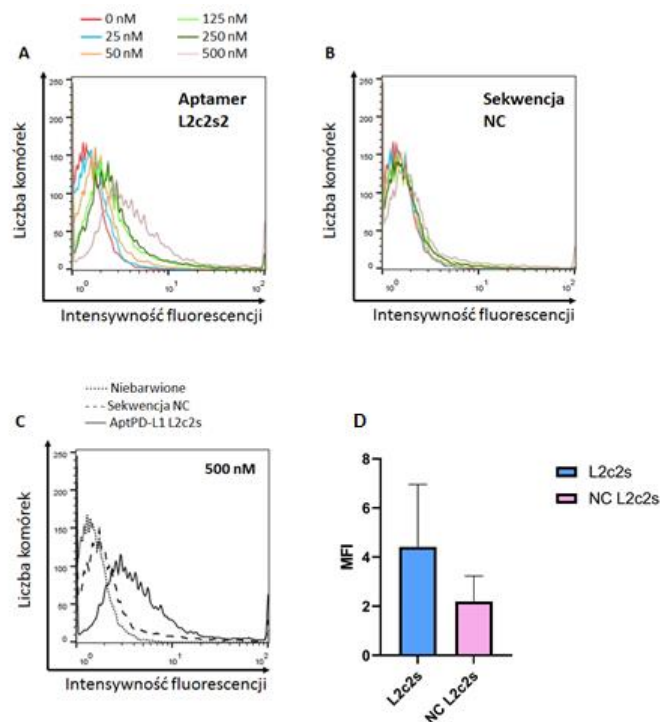
Rysunek 21. Analiza cytofluorymetryczna poziomu nadekspresji receptora hPD-L1 na powierzchni komórek aAPC/CHO-K1 WT i aAPC/CHO-K1 hPD-L1. Do barwienia cytochemicznego użyto przeciwciał monoklonalnych MIH1 sprzęgniętych z FITC.

Analiza cytofluorymetryczna (Rysunek 22) potwierdza wiązanie aptameru ssDNA L2c2s zawierającego znacznik fluorescencyjny FITC na powierzchni komórek aAPC/CHO-K1 hPD-L1 w sposób zależny od stężenia. Jednak sam poziom wiązania aptameru L2c2s jest stosunkowo niski. Niespecyficzna sekwencja ssDNA (NC) wykazuje nieco słabszy efekt wiązania niż badany aptamer L2c2s. Wiązanie L2c2s jest obserwowane również w pewnym stopniu w przypadku komórek aAPC/CHO-K1 WT, które nie wykazują ekspresji hPD-L1. Efekt ten jest nieco słabszy niż w przypadku wiązania L2c2s do komórek wykazujących nadekspresję receptora PD-L1, wskazuje jednak na znaczny poziom niespecyficznego oddziaływania L2c2s względem innych celów molekularnych.

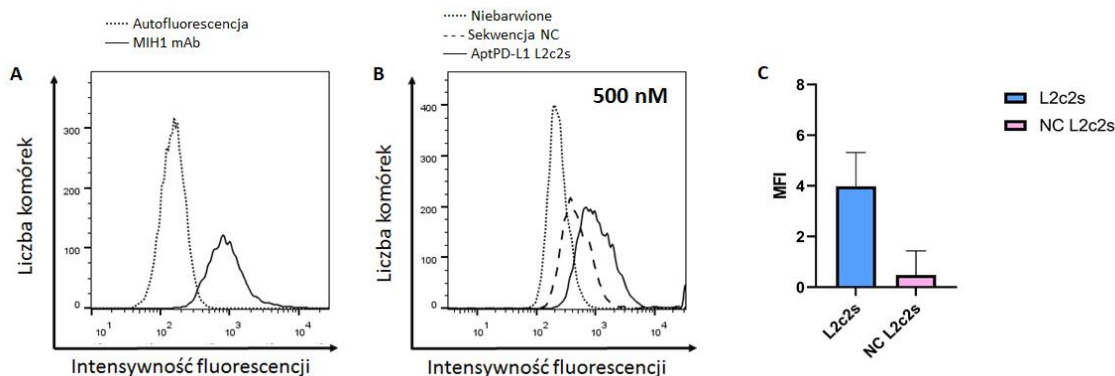


Rysunek 22. Analiza cytofluometryczna wiązania aptameru L2c2s do hPD-L1 na powierzchni komórek aAPC/CHO-K1 WT oraz aAPC/CHO-K1 hPD-L1. Poglądowe histogramy przedstawiają oddziaływanie komórek aAPC/CHO-K1 z nadekspresją hPD-L1 i komórek typu dzikiego (niewykazujących nadekspresji hPD-L1) z fluorescencyjnie znakowanym aptamerem L2c2s w zakresie stężeń 25-500 nM lub niespecyficzną sekwencją ssDNA w tych samych stężeniach (A). W panelu (B) przedstawiono wiązania aptameru L2c2s w stężeniu 500 nM w komórkach z nadekspresją PD-L1 oraz komórkach typu dzikiego. Panel C przedstawia średnie wartości fluorescencji (MFI) dla poszczególnych oligonukleotydów użytych w stężeniu 500 nM w badaniu komórek aPC/CHO-K1 PD-L1 i aPC/CHO-K1. Podano wartości średnie \pm SD dla dwóch eksperymentów.

Zdolność wiązania aptameru L2c2s do powierzchniowego PD-L1 została dodatkowo przebadana przy użyciu komórek ludzkiej linii gruczolaka nerek 786-0 z wysoką endogenną ekspresją receptora PD-L1. Test został wykonany przez Dr Annę Goldę w Zakładzie Mikrobiologii WBBiB UJ (obecność powierzchniowego PD-L1 została wcześniej potwierdzona; wyniku nie załączono). Selektywne wiązanie aptameru L2c2s do białka PD-L1 w porównaniu do niespecyficznego ssDNA było wyraźnie widoczne w przypadku zastosowania komórek linii 786-0 (Rysunek 23 C). Analizując wartości MFI zaobserwowano, że L2c2s wiązał w podobnym stopniu PD-L1 na powierzchni komórek 786-0 w porównaniu do komórek aAPC/CHO-K1 hPD-L1 przy zastosowaniu tego samego stężenia badanego aptameru (Rysunek 22, Rysunek 23). Aptamer L2c2s wiązał także powierzchniowy PD-L1 komórek ludzkiej linii nowotworu nerki Caki-2 w porównywalnym stopniu do komórek aAPC/CHO-K1 hPD-L1. Zaobserwowano porównywalny poziom wiązania niespecyficznego ssDNA do powierzchni komórek Caki-2, który był porównywalny do poziomu obserwowanego dla komórek aAPC/CHO-K1 hPD-L1 (Rysunek 24).



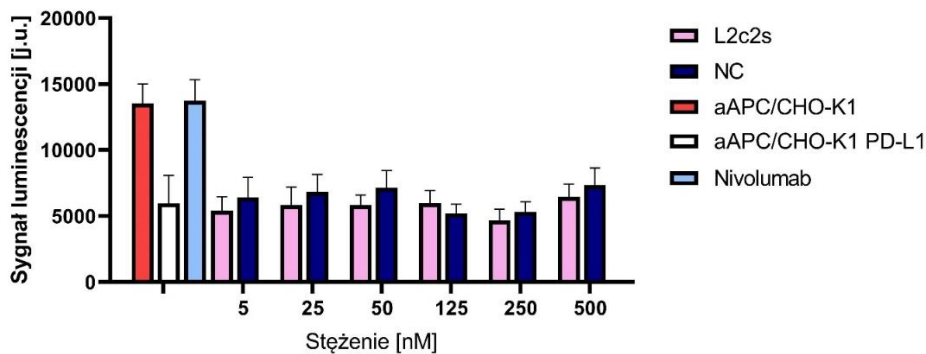
Rysunek 23. Analiza cytofluometryczna wiązania aptameru L2c2s do PD-L1 na powierzchni komórek 786-0. Histogramy przedstawiają oddziaływanie komórek 786-0 wykazujących endogenną ekspresję PD-L1 z fluorescencyjnie znakowanym aptamerem L2c2s w zakresie stężeń 25-500 nM (A) lub niespecyficzną sekwencją ssDNA (NC L2c2s) w tych samych stężeniach (B); (C) histogram przedstawiający wiązanie aptameru i sekwencji niespecyficznej w stężeniu 500 nM. Panel D przedstawia średnie wartości fluorescencji (MFI) dla poszczególnych oligonukleotydów użytych w stężeniu 500 nM w badaniu komórek 786-0. Podano wartości średnie \pm SD z trzech niezależnych eksperymentów.



Rysunek 24. Analiza cytofluometryczna wiązania aptameru L2c2s do PD-L1 na powierzchni komórek Caki-2. Histogram przedstawia analizę poziomu nadekspresji PD-L1 na powierzchni komórek Caki-2 (A). Do barwienia cytochemicznego użyto przeciwciał monoklonalnych MIH1 sprzęgniętych z FITC. Histogram przedstawia wiązanie aptameru i sekwencji niespecyficznej w stężeniu 500 nM (B). Panel C przedstawia średnie wartości fluorescencji (MFI) dla poszczególnych oligonukleotydów użytych w stężeniu 500 nM w badaniu komórek Caki-2. Podano wartości średnie \pm SD dla dwóch eksperymentów.

7.9.5 Analiza hamowania interakcji białek kompleksu PD-1/PD-L1 przez aptamer L2c2s w warunkach *in vitro*

Następnie badano zdolność aptameru L2c2s do hamowania interakcji PD-1/PD-L1. W tym celu posłużono się modelem *in vitro* kokultury komórek aAPC/CHO-K1 z ekspresją ludzkiego PD-L1 oraz białka aktywującego TCR na drodze niezależnej od antygeny z komórkami linii Jurkat T zmodyfikowanymi genetycznie, tak aby wykazywały nadekspresję PD-1 oraz ekspresję genu reporterowego wrażliwego na aktywację szlaku PD-1/PD-L1 (w dalszej części pracy komórki te są nazywane Jurkat T PD-1). Komórki Jurkat T PD-1 posiadają gen lucyferazy znajdujący się pod kontrolą sekwencji NFAT-RE (ang. *NFAT response element*). Aktywacja TCR komórek Jurkat T PD-1 w wyniku oddziaływania tego receptora z aktywatorem obecnym na powierzchni komórek aAPC/CHO-K1 prowadzi do aktywacji ścieżki przekazu sygnału, która docelowo aktywuje ekspresję czynnika transkrypcyjnego NFAT. NFAT rozpoznając sekwencję NFAT-RE stymuluje ekspresję genu lucyferazy. Z kolei interakcja białek PD-1/PD-L1 znajdujących się na komórkach opisanego układu hamuje aktywację komórek Jurkat T PD-1, obniżając tym samym poziom NFAT, co przekłada się na spadek poziomu lucyferazy w komórkach. Efekt ten można odwrócić stosując inhibitory zdolne do zniesienia oddziaływania białek w kompleksie PD-1/PD-L1, takie jak np. przeciwciała czy, potencjalnie, aptamery. Tę ostatnią ewentualność testowano w niniejszej pracy.



Rysunek 25. Wpływ aptameru L2c2s na zahamowanie interakcji białek PD-L1 i PD-1 w warunkach *in vitro*. Interakcja receptora PD-1 z PD-L1 prowadzi do wygaszenia sygnału luminescencji. Jako kontrolę pozytywną potwierdzającą przywrócenie luminescencji w wyniku hamowania tworzenia kompleksu PD-1/PD-L1 użyto przeciwciała terapeutycznego Nivolumab; aAPC/CHO-K1 – kontrola wzbudzenia sygnału luminescencji w komórkach Jurkat T PD-1; aAPC/CHO-K1 hPD-L1 – kontrola wygaszenia sygnału luminescencji w komórkach Jurkat T PD-1 w wyniku interakcji PD-1 z PD-L1. Komórki aAPC/CHO-K1 oraz aAPC/CHO-K1 hPD-L1 użyte w tym eksperymencie wykazywały ekspresję aktywatora TCR. NC – sekwencja niespecyficzna ssDNA. Podano wartości średnie \pm SD z trzech niezależnych eksperymentów.

Zahamowanie interakcji PD1/PD-L1 z zastosowaniem Nivolumabu, terapeutycznych przeciwciał monoklonalnych anti-PD-1 użytych w stężeniu 60 nM, przywróciło w konsekwencji aktywność lucyferazy i wzrost luminescencji do podstawowego poziomu. Niezależnie od zastosowanej dawki aptameru L2c2s nie dochodzi do przywrócenia sygnału luminescencji uzyskiwanego w wyniku aktywności lucyferazy indukowanej przerwaniem interakcji PD-L1 z PD-1 na powierzchni komórek prowadzonej kokultury (Rysunek 25). Uzyskany wynik wskazuje na brak potencjału aptameru L2c2s do blokowania oddziaływania PD-1 z PD-L1.

7.9.6 Charakterystyka aptamerów ssDNA rozpoznających domenę IgV ludzkiego białka PD-1

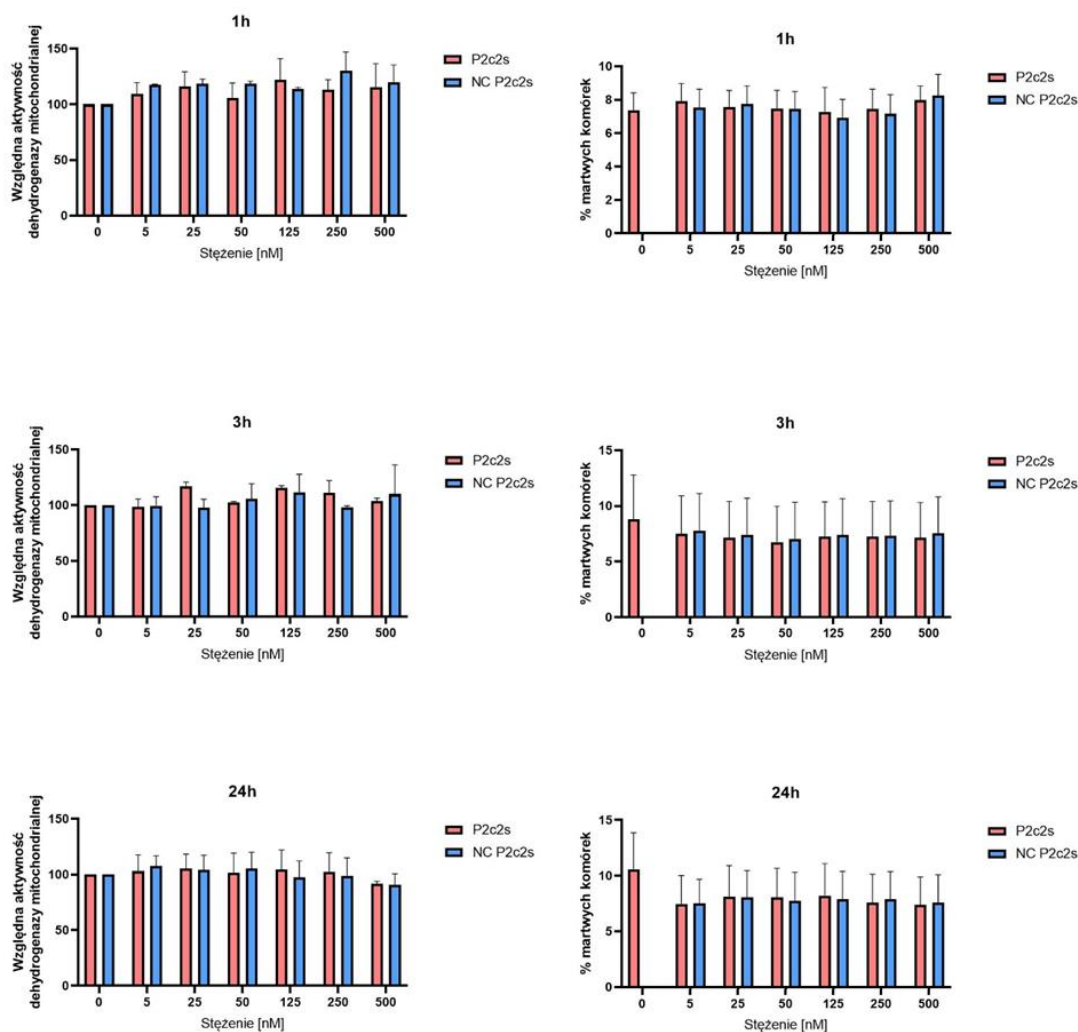
Kolejnym aptamerem, który został poddany charakterystyce w ramach niniejszej pracy był P2c2s otrzymany w wyniku selekcji metodą SELEX przez dra Stanisława Malickiego w Zakładzie Mikrobiologii WBBiB UJ. Do selekcji użyto dwóch różnych rekombinowanych zewnątrzkomórkowych domen IgV ludzkiego PD-1 (o zakresie reszt aminokwasowych 21-168 oraz 25-167). Wiązanie do PD-1 przez wyselekcjonowane w kolejnych cyklach aptamery było monitorowane za pomocą techniki ELISA przez dra Malickiego (test został wykonany z użyciem biotynylowanego aptameru i streptawidyny skoniugowanej z HRP). Aptamery rozpoznające PD-1, które zostały otrzymane po 5., 6. oraz 7. rundzie selekcji zostały poddane sekwencjonowaniu i analizie bioinformatycznej, co pozwoliło na ich podział względem

podobieństwa sekwencji. Selekcja względem PD-1 (21-168) pozwoliła na otrzymanie dwóch grup P1c oraz P2c, podczas gdy selekcja względem PD-1 (25-167) pozwoliła na otrzymanie jednej grupy odpowiadającej grupie P2c. Grupa P2c, zawierająca sekwencje rozpoznające oba warianty białka PD-1 (21-168 i 25-167) wykazywała wyższy poziom wiązania do PD-1 w teście z wykorzystaniem metody ELISA w porównaniu do grupy P1c. Do dalszych analiz wybrano sekwencję aptameru P2c2s dominującą w obrębie grupy P2c. Aptamer P2c2s wykazywał znacznie wyższy stopień wiązania PD-1 w porównaniu do sekwencji kontrolnej NC P2c2s w testach z użyciem metody ELISA. Selektywność aptameru P2c2s zweryfikowano metodą ELISA poprzez porównanie jego zdolności do wiązania się do hPD-1, mysiego PD-1, mysiego PD-L1 (19-134), albuminy surowicy bydlęcej i trypsyny. Aptamer P2c2s, oprócz oddziaływania z hPD-1 wykazywał zdolność wiązania się do mysiego PD-1.

Otrzymany aptamer P2c2s wymagał charakterystyki w układzie komórkowym. Część doświadczeń została wykonana przez autorkę i opisana w ramach niniejszej pracy. Podobnie jak w przypadku aptameru L2c2s badania obejmowały testy zdolności wiązania aptameru P2c2s do jego targetu (w tym wypadku ludzkiego PD-1) eksponowanego na powierzchni komórek ludzkiej linii limfoidalnej Jurkat T z nadekspresją receptora PD-1, jak również określenie jego potencjału do hamowania tworzenia kompleksu PD-1/PD-L1 w układzie komórkowym i określenie cytotoksyczności aptameru względem badanych komórek.

7.9.7 Oznaczenie cytotoksyczności aptameru P2c2s względem komórek Jurakt T PD-1 w warunkach *in vitro*

W celu określenia cytotoksyczności aptameru P2c2s oraz sekwencji kontrolnej NC P2c2s (sekwencji niespecyficznej), przeprowadzono pomiary aktywności cytoplazmatycznego enzymu LDH wydzielanego do pożywki hodowlanej pod wpływem naruszenia integralności błony komórkowej oraz test MTT badający poziom aktywności mitochondrialnej komórek. Użyte w dalszych testach *in vitro* stężenia 5-500 nM aptameru P2c2s oraz sekwencji kontrolnej nie wykazywały cytotoksycznego wpływu na komórki Jurkat T PD-1 (Rysunek 26).

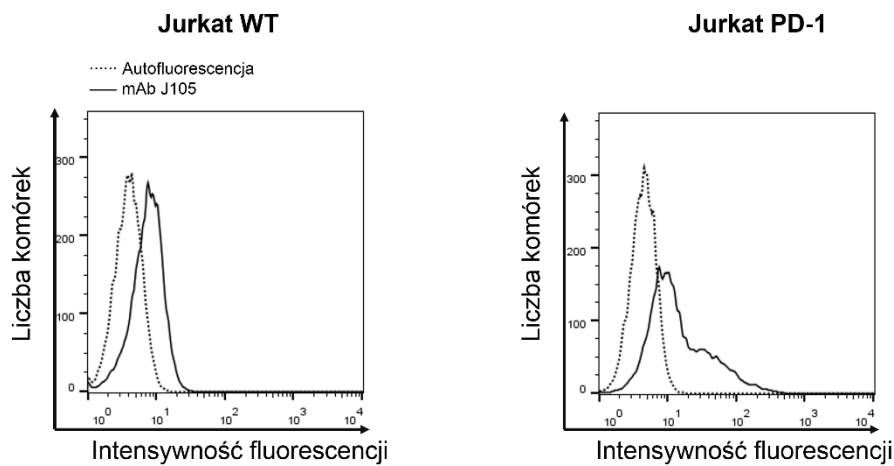


Rysunek 26. Badanie cytotoksycznego wpływu aptamerów P2c2s oraz sekwencji kontrolnej (niespecyficznej) na komórki Jurkat PD-1. Wykres przedstawia porównanie poziomu śmiertelności komórek po 1, 3 i 24 h w teście MTT badającym aktywność mitochondrialną komórek (A) oraz w teście aktywności uwolnionego do medium cytoplazmatycznego LDH (B) po dodaniu aptamerów P2c2s lub sekwencji kontrolnej NC P2c2s. Za 100% przyjęto aktywność LDH uwolnionej ze zlizowanych Tritonem-X100 komórek (kontrola pozytywna testu aktywności uwolnionego enzymu LDH). Podano wartości średnie \pm SD z trzech niezależnych doświadczeń prowadzonych w tryplikatach.

7.9.8 Analiza zdolności wiązania aptameru P2c2s z PD-1 w warunkach *in vitro*

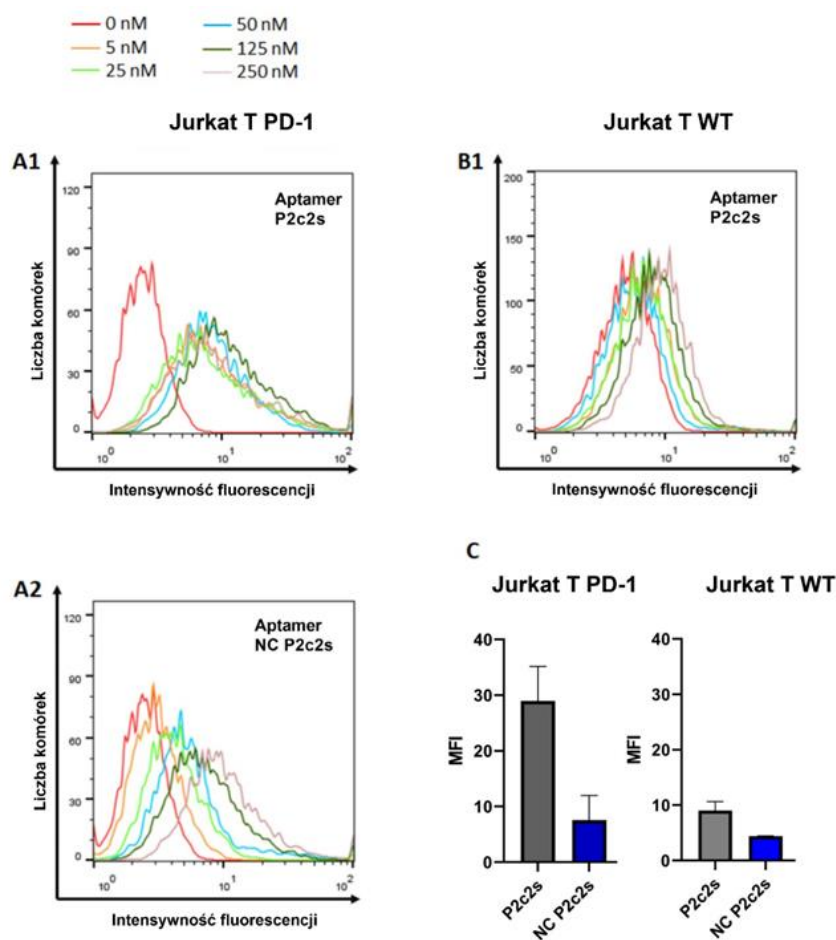
Badanie wiązania aptameru ssDNA P2c2s do receptora PD-1 zostało wykonane z użyciem komórek Jurkat szczepu dzikiego (Jurkat T WT) oraz komórek Jurkat T z nadekspresją PD-1 (Jurkat PD-1). Obecność PD-1 na powierzchni komórek została potwierdzona cytofluorymetrycznie za pomocą przeciwciał znakowanych fluorescencyjnie (Rysunek 27). Otrzymany wynik wskazuje, że komórki Jurkat T PD-1 wykazują nierównomierną ekspresję

receptora, niemniej w pewnej ich populacji ekspresja jest wyraźna. Wyniki sugerują, że niewielką ilość endogennego PD-1 jest obecna na powierzchni komórek Jurkat T WT.



Rysunek 27. Analiza cytofluometryczna poziomu nadekspresji receptora hPD-1 na powierzchni komórek Jurkat T oraz Jurkat T z nadekspresją PD-1. Do barwienia immunocytochemicznego użyto przeciwciała monoklonalne J105 sprzęgnięte z FITC.

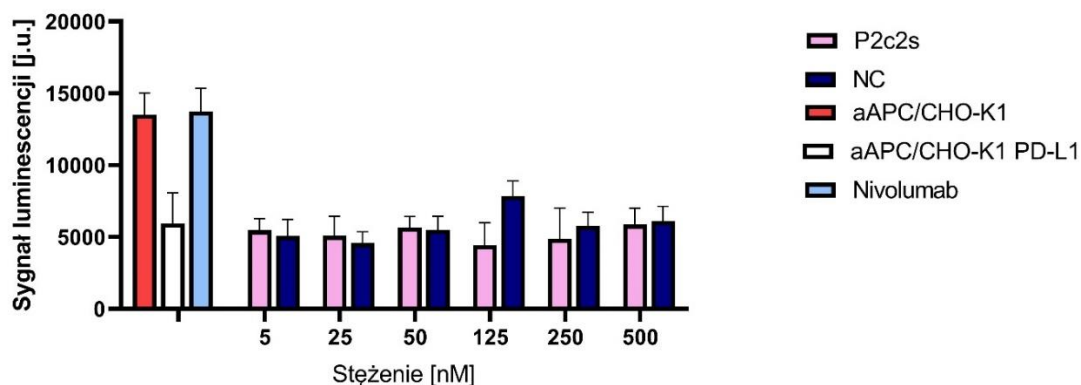
Komórki zostały poddane inkubacji z aptamerem P2c2s lub aptamerem kontrolnym w różnych stężeniach. Aptamer P2c2s w znacznie wyższym stopniu wiąże się do komórek Jurkat PD-1 niż do komórek Jurkat WT (Rysunek 28 A1, A2, B1, C). Niespecyficzny oligonukleotyd ssDNA oddziaływał z powierzchnią komórek Jurkat PD-1 jedynie w niewielkim stopniu w zakresie stężeń 0-50 nM i obserwowano jego niespecyficzne oddziaływanie z powierzchnią komórek Jurkat T PD-1 w zakresie stężeń 125-250 nM (Rysunek 28 A1, A2). Aptamer kontrolny wiązał się w porównywalnym stopniu do powierzchni komórek Jurkat WT w porównaniu do powierzchni komórek Jurkat PD-1 (Rysunek 28 C; histogramu nie pokazano).



Rysunek 28. Analiza cytofluorometryczna wiązania aptameru P2c2s do PD-1 na powierzchni komórek Jurkat T PD-1 i Jurkat T WT. Histogramy przedstawiają wiązanie aptameru P2c2s zakreśie stężeń 5-250 nM (A1) oraz sekwencji kontrolnej NC P2c2s w tym samym zakresie stężeń (A2) na powierzchni komórek Jurkat T z nadekspresją PD-1 jak również na powierzchni komórek Jurkat T WT (B1). Panel C przedstawia średnie wartości fluorescencji (MFI) dla oligonukleotydów użytych w stężeniu 50 nM w badaniu komórek Jurkat T z nadekspresją PD-1 oraz Jurkat WT. Podano wartości średnie \pm SD dla dwóch eksperymentów.

7.9.9 Hamowanie interakcji białek kompleksu PD-1/PD-L1 przez aptamer P2c2s – w warunkach *in vitro*

Aptamer P2c2s został następnie poddany testom badającym jego aktywność biologiczną polegającą na zdolności do hamowania interakcji PD1/PD-L1. Aktywność biologiczna aptameru P2c2s została sprawdzona za pomocą testu aktywności lucyferazy w warunkach *in vitro*. Test wykonano analogicznie jak dla aptameru L2c2s (aptamery rozpoznające PD-1 zostały dodane do komórek Jurkat PD-1, a następnie całość przeniesiono do komórek aAPC/CHO-K1 hPD-L1). Nie zaobserwowano przywrócenia sygnału luminescencji pod wpływem aptameru P2c2s (Rysunek 29). Oznacza to, że mimo selektywnego wiązania do powierzchniowego receptora PD-1, aptamer P2c2s nie posiada potencjału do hamowania interakcji PD1/PD-L1 w badanym zakresie stężeń.



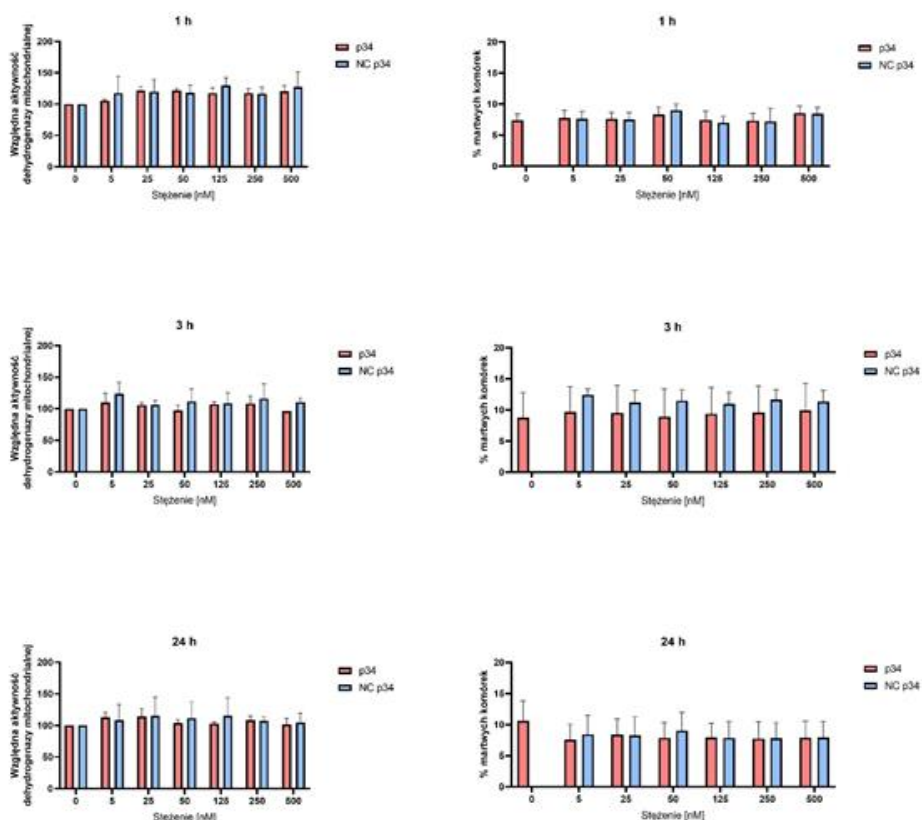
Rysunek 29. Wpływ aptameru P2c2s na zahamowanie interakcji białek PD-L1 i PD-1 w układzie komórkowym. Interakcja receptora PD-1 z PD-L1 prowadzi do wygaszenia sygnału luminescencji. Jako kontrolę pozytywną potwierdzającą przywrócenie luminescencji w wyniku hamowania tworzenia kompleksu PD-1/PD-L1 użyto przeciwciała terapeutyczne anti-PD1, Nivolumab w stężeniu 60 nM; aAPC/CHO-K1 – kontrola wzbudzenia sygnału luminescencji w komórkach Jurkat T PD-1; aAPC/CHO-K1 hPD-L1 – kontrola wygaszenia sygnału luminescencji w komórkach Jurkat T PD-1 w wyniku interakcji PD-1 z PD-L1; komórki aAPC/CHO-K1 oraz aAPC/CHO-K1 hPD-L1 użyte w tym eksperymencie wykazywały ekspresję aktywatora TCR. NC – sekwencja niespecyficzna ssDNA. Podano wartości średnie \pm SD z trzech niezależnych doświadczeń.

Aptamer P2c2s został następnie poddany procedurze skracania w celu poprawienia jego właściwości (procedura została przeprowadzona przez dra Stanisława Malickiego z Zakładzie Mikrobiologii WBBIB UJ). Jak wspomniano w rozdziale 4.8 skracanie aptamerów pozwala usunąć z sekwencji te nukleotydy, które nie są istotne dla zapewnienia struktury promującej oddziaływanie z białkiem i nie pełnią ważnej roli w interakcji z białkiem, co niekiedy może znacząco poprawić powinowactwo aptameru do targetu. Aptamer P2c2s został poddany skracaniu za pomocą techniki częściowej fragmentacji sekwencji (ang. *partial fragmentation*). W tym celu sekwencja aptameru P2c2s została podzielona na dwanaście segmentów (po 6-10 nukleotydów każdy). Następnie, zsyntezowano warianty P2c2s, z których usunięto po jednym z segmentów. Powstałe warianty umożliwiły mapowanie sekwencji P2c2s pod kątem ich znaczenia dla zdolności aptameru do wiązania PD-1, co zostało przetestowane z użyciem metody ELISA (doświadczenia przeprowadzone przez dra Malickiego). Na podstawie uzyskanych wyników wybrano te warianty, które nie oddziaływały z PD-1 (tj. nie posiadały kluczowego dla interakcji fragmentu sekwencji). Sekwencje usuniętych fragmentów z wybranych wariantów P2c2s zostały następnie wykorzystane do resyntezy aptameru. W efekcie uzyskano aptamer p34 (68 nukleotydów), który był skróconą formą aptameru P2c2s (88 nukleotydów) i który składał się tylko z niezbędnych fragmentów sekwencji tworzących minimalne miejsca wiązania PD-1 (aptamer p34 został pozbawiony sekwencji regionów

stałych na końcu 3' oznaczonych jako 3 i 4; Rysunek S 4). Podobnie jak w przypadku P2c2s, potwierdzono specyficzne wiązanie PD-1 przez aptamer p34 z użyciem metody ELISA. Otrzymany aptamer p34 wymagał analogicznej charakterystyki jak P2c2s, która rozstała przedstawiona w poniższym rozdziale.

7.9.10 Oznaczenie cytotoksyczności aptameru p34 względem komórek Jurkat T PD-1 w warunkach *in vitro*

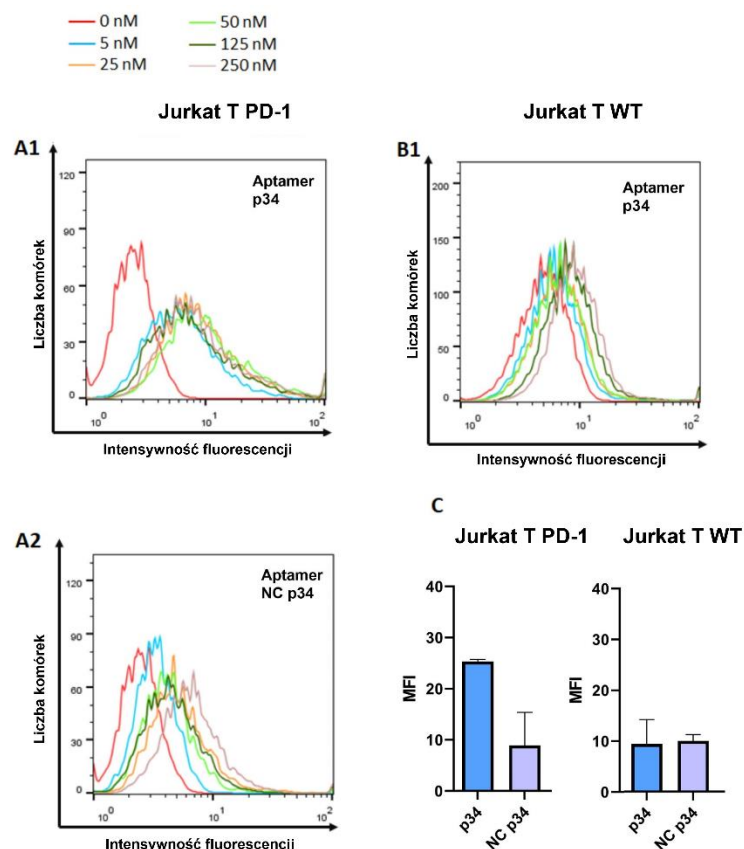
W celu oznaczenia cytotoksyczności aptameru p34 oraz sekwencji kontrolnej (NC p34) wykonano pomiar aktywności mitochondrialnej komórek za pomocą MTT oraz aktywności uwolnionego do pożywki hodowlanej enzymu cytoplazmatycznego LDH w sposób analogiczny jak dla aptameru P2c2s. Otrzymane wyniki wskazują, że zarówno aptamer p34 jak i odpowiadająca mu sekwencja kontrolna NC p34 nie wykazywały cytotoksyczności względem komórek Jurkat T PD-1 w zakresie stężeń 5-500 nM (Rysunek 30). W związku z tym w dalszych badaniach posługiwano się aptamerami p34 i NC p34 we wskazanym zakresie stężeń.



Rysunek 30. Badanie cytotoksycznego wpływu aptamerów p34 oraz sekwencji kontrolnej (niespecyficznej) na komórki Jurkat PD-1. Wykres przedstawia porównanie poziomu żywności komórek po 1, 3 i 24 h w teście MTT badającym aktywność mitochondrialną komórek (A) oraz w teście aktywności uwolnionego do medium cytoplazmatycznego LDH (B) po dodaniu aptamerów p34 i sekwencji kontrolnej NC p34. Za 100% przyjęto aktywność LDH uwolnionej ze zlizowanych komórek (kontrola pozytywna testu aktywności uwolnionego enzymu LDH). Podano wartości średnie \pm SD z trzech niezależnych doświadczeń prowadzonych w tryplikatach.

7.9.11 Analiza zdolności wiązania aptameru p34 z PD-1 w warunkach *in vitro*

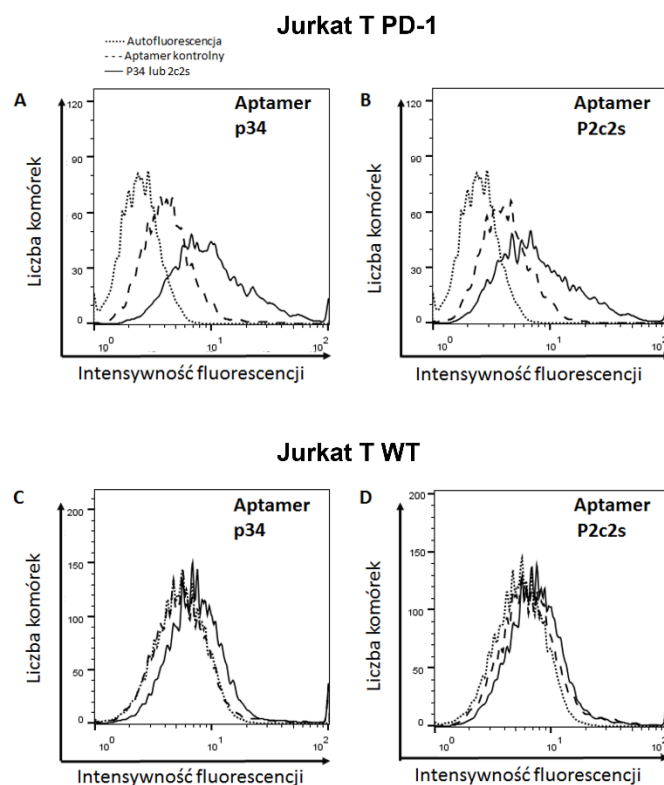
Badanie wiązania aptameru ssDNA p34 do powierzchniowego receptora PD-1 zostało wykonane analogicznie jak dla aptameru P2c2s z użyciem komórek Jurkat WT i komórek Jurkat T z nadekspresją PD-1. Analiza cytofluorymetryczna potwierdza wiązanie aptameru ssDNA p34 na powierzchni komórek Jurkat T PD-1 (Rysunek 31). Aptamer kontrolny wiązał się w porównywalnym stopniu do powierzchni komórek Jurkat WT w porównaniu do powierzchni komórek Jurkat PD-1 (Rysunek 31 C; histogramu nie pokazano).



Rysunek 31. Analiza cytofluorymetryczna wiązania aptameru p34 do PD-1 na powierzchni komórek Jurkat T PD-1 i Jurkat T WT. Histogramy przedstawiają wiązanie aptameru p34 w zakresie stężeń 5-250 nM (A1) oraz sekwencji kontrolnej NC p34 w tym samym zakresie stężeń (A2) na powierzchni komórek Jurkat T z nadekspresją PD-1 jak na powierzchni komórek Jurkat T WT (B1). Panel C przedstawia średnie wartości fluorescencji (MFI) dla poszczególnych oligonukleotydów użytych w stężeniu 50 nM w badaniu komórek Jurkat T z nadekspresją PD-1 oraz Jurkat WT. Podano wartości średnie \pm SD dla dwóch eksperymentów.

Aptamer p34 selektywnie wiąże receptor PD-1 na powierzchni komórek Jurkat PD-1 (Rysunek 31). Aptamer p34 wiąże się znacznie silniej do PD-1 obecnego na powierzchni komórek Jurkat T PD-1 w porównaniu z kontrolą negatywną NC p34 (sekwencji o długości odpowiadającej p34). Różnica w oddziaływaniu p34 i NC p34 z komórkami Jurkat PD-1 maleje

wraz ze wzrostem ich stężenia. Skrócenie badanego aptameru poprawiło jego zdolność wiązania się do PD-1 na powierzchni komórek Jurkat T PD-1 tylko w niewielkim stopniu (Rysunek 32). Mimo wyższego stopnia wiązania aptameru p34 w porównaniu do P2c2s nie zaobserwowano biologicznego efektu, czyli zahamowania interakcji PD-1/PD-L1 w warunkach *in vitro* w teście aktywności lucyferazy (wyniku nie załączono).



Rysunek 32. Analiza cytofluorymetryczna wiązania aptamerów rozpoznających PD-1 z użyciem komórek Jurkat z nadekspresją PD1 oraz Jurkat T WT. Histogramy przedstawiają aptamer p34 i P2c2s rozpoznający PD-1 na powierzchni komórek Jurkat T PD-1 (A, B) oraz na powierzchni komórek Jurkat T WT (C, D). Sekwencje kontrolne NC p34 (A, C) oraz NC P2c2s (B, D) oznaczono linią przerywaną. Komórki inkubowano z aptamerami w stężeniu 50 nM.

Podsumowanie

Przedstawione w pracy wyniki dotyczące aptameru L2c2s stanowią tylko część badań prowadzonych w celu jego charakterystyki. Otrzymane w ramach niniejszej pracy wyniki wskazują, że aptamer L2c2s wiąże PD-L1 na powierzchni komórek chemicznej linii aAPC/CHO-K1 hPD-L1 jak również na dwóch ludzkich liniach komórkowych wykazujących endogenną ekspresję PD-L1 – gruczolaka nerek 786-0 i nowotworu nerki Caki-2. Aptamer L2c2s nie wykazywał potencjału do hamowania tworzenia kompleksu PD-1/PD-L1 w badaniach

z wykorzystaniem modelu komórkowego w warunkach *in vitro*. Niemniej jednak pomimo braku aktywności biologicznej aptamer taki może w przyszłości zostać wykorzystany jako narzędzie diagnostyczne po jego wcześniejszej optymalizacji, zwłaszcza, że nie wykazywał cytotoksyczności względem badanych komórek. Dalsze badania prowadzone nad L2c2s w ramach projektu wskazywały, że aptamer może być wykorzystany do obrazowania guzów wykazujących ekspresję PD-L1, co w przyszłości może znaleźć zastosowanie w diagnostyce nowotworów. Otrzymane wyniki zostały przygotowane do publikacji.

Badane w tej części pracy aptamery P2c2s i p34 rozpoznające PD-1 wykazywały silniejsze wiązanie do powierzchni komórek Jurkat T PD-1 w porównaniu do odpowiadających im sekwencji kontrolnych NC P2c2s i NC p34. Skrócenie aptameru P2c2s do p34 nie spowodowało istotnego wzrostu poziomu wiązania aptameru do powierzchni komórek Jurkat T PD-1, choć zauważono niewielkie przesunięcie sygnału fluorymetrycznego pochodzącego od znakowanego aptameru p34 w porównaniu do znakowanego P2c2s podczas analiz cytofluorymetrycznych.

Zarówno P2c2s jak i p34 nie wykazywały efektu biologicznego w postaci hamowania interakcji komórkowych receptorów PD-1/PD-L1. Ze względu na brak aktywności biologicznej przewidzianą rolę dla P2c2s i p34 jest ich wykorzystanie w celach diagnostycznych do rozpoznawania PD-1 na powierzchni komórek.

Wyniki przedstawione w tym rozdziale stanowią część danych wykorzystanych do przygotowania manuskryptu pt.: „Development of selective ssDNA micro-probe for PD1 detection as a novel strategy for cancer imaging”.

7.10 Charakterystyka biochemiczna i strukturalna kompleksu białka PD-L1 z makrocyklicznym peptydem p104

Celem ostatniej części prac opisanych w rozprawie było poznanie strukturalnych mechanizmów tworzenia kompleksu PD-L1 z makrocyklicznym peptydem p104 należącym do III klasy makrocyklicznych inhibitorów BMS [331]. W odróżnieniu od peptydów klasy I i II, cechą charakterystyczną peptydów III klasy BMS jest to, że są one w całości zbudowane z aminokwasów naturalnie występujących w białkach. Dla peptydu p101, pierwszego scharakteryzowanego strukturalnie przedstawiciela klasy III wykazano dualistyczny

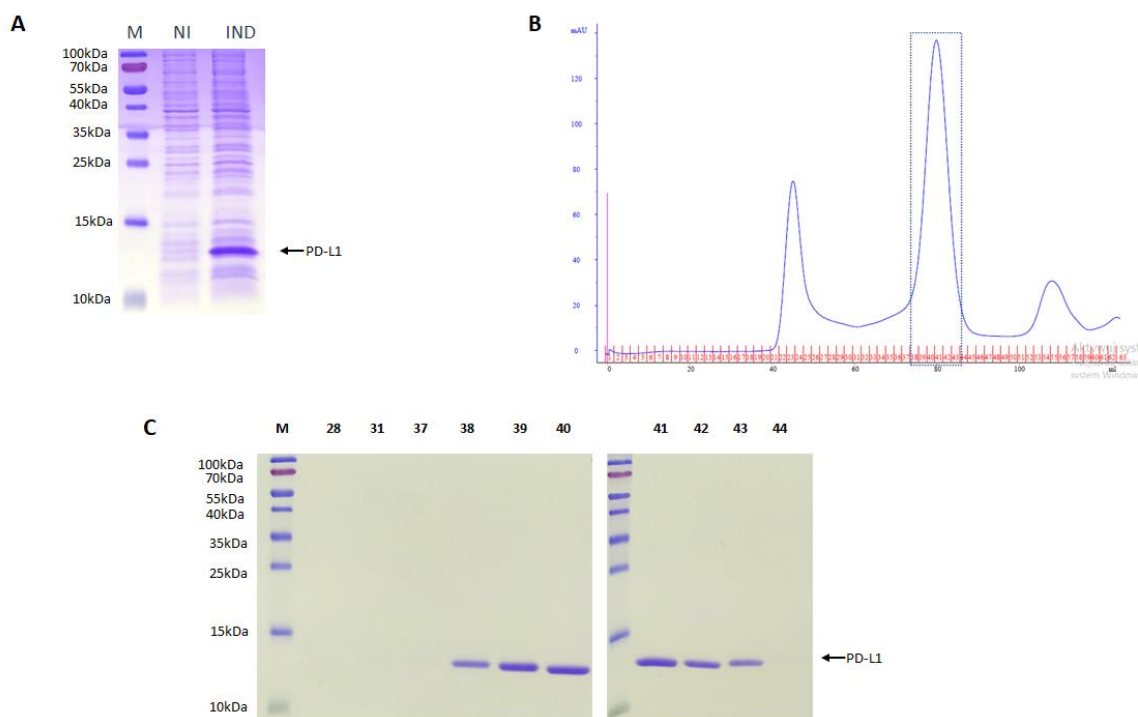
mechanizm wiązania do PD-L1 [398]. Dla lepszego poznania tego nietypowego mechanizmu, w niniejszej pracy scharakteryzowano mechanizm wiązania peptydu p104 należącego do tej samej klasy, ale charakteryzującego się sekwencją nieznacznie odbiegającą od p101. Zakładano, iż różnice w sekwencji obu peptydów są na tyle znaczące by wpłynąć nieznacznie na sposób wiązania, ale jednocześnie na tyle niewielkie by umożliwić charakterystykę porównawczą.

7.11 Ekspresja i oczyszczanie białka PD-L1

Produkcja białka PD-L1 została przeprowadzona w prokariotycznym systemie ekspresyjnym z użyciem bakterii *E. coli* szczepu BL21 (DE3), który poddano transformacji plazmidem pET-21b-PD-L1 zawierającym sekwencję kodującą fragment Ala18-Tyr134 białka PD-L1 (dalej nazywany PD-L1) pod promotorem laktozowym. Ekspresję prowadzono przez 5 h w temperaturze 37°C przy wytrząsaniu 250 rpm. Obecność białka PD-L1 w lizacie bakteryjnym potwierdzono poprzez analizę porównawczą profilu białkowego bakterii indukowanych IPTG i nieindukowanych (Rysunek 33 A). Otrzymane wyniki potwierdzają efektywną ekspresję białka PD-L1. Wcześniejsze prace prowadzone w Pracowni Krystalografii Białek MCB UJ potwierdziły, że produkowany PD-L1 znajduje się we frakcji nierozpuszczalnej (wyników nie zamieszczono).

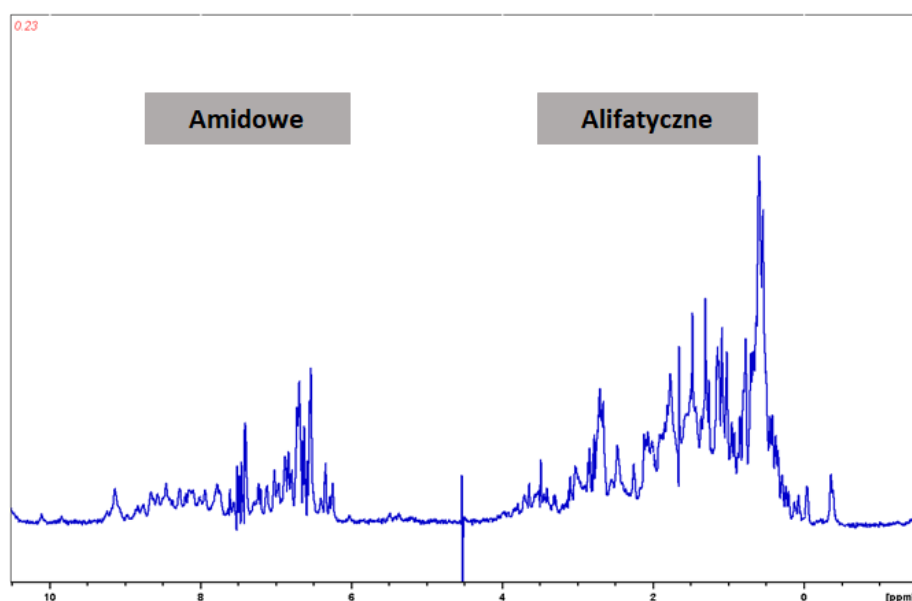
W celu oczyszczenia białka PD-L1 z frakcji nierozpuszczalnej, ciątka inkluzyjne (IB) były trzykrotnie płukane buforem płuczącym (składy buforów przedstawiono w rozdziale 6.1) w celu usunięcia białek frakcji rozpuszczalnej. Dodatek detergentu w buforze płuczącym umożliwił usunięcie fragmentów błony komórkowej bakterii oraz białek błonowych. IB rozpuszczono w buforze denaturującym zawierającym 6 M chlorowodorek guanidyny. Dodatek 10 mM β -merkaptioetanolu w buforze denaturującym pozwalał na utrzymanie redukującego środowiska, co zapobiegało tworzeniu mostków disulfidowych, natomiast obecność 200 mM NaCl pozwalała na zniesienie słabych interakcji jonowych pomiędzy białkami. Rozpuszczone IB zostały rozcieńczone do stężenia białka 1 mg/ml w buforze denaturującym bez dodatku β -merkaptioetanolu. Obniżenie stężenia β -merkaptioetanolu pozwala na ponowne tworzenie mostków disulfidowych podczas procedury refałdowania. Ponowne fałdowanie białka przeprowadzono metodą wkraplania roztworu białka do buforu z dodatkiem 1 M L-argininy. Dodatek argininy zapobiega tworzeniu agregatów. Zastosowanie układu redoks (zredukowy/utleniony glutation) w buforze do refałdowania ułatwił tworzenie

mostków disulfidowych. W kolejnym kroku roztwór białka dializowano w celu usunięcia czynnika stabilizującego (L-argininy) oraz wymiany buforu na taki, który umożliwi dalszą analizę próbki białka i jego krystalizację. Tak uzyskany preparat białka został poddany sączeniu molekularnemu na kolumnie HiLoad 16/600 Superdex 75. Chromatogram otrzymany w wyniku filtracji żelowej wykazuje obecność trzech szczytów (Rysunek 33 B). Pierwszy z nich, charakteryzujący się najmniejszym czasem retencji, pojawia się zaraz za objętością pustą kolumny (~40 ml) i zawiera agregaty białka (Rysunek 33 C). Kolejny szczyt (Rysunek 33 B; ramka), którego objętość retencji wynosi ok. 80 ml odpowiada spodziewanej objętości retencji białka PD-L1 o masie cząsteczkowej 14,5 kDa (na podstawie kalibracji kolumny; wyniki niezamieszczone w pracy). Ostatni szczyt najprawdopodobniej pochodzi od jednego ze składników buforu, na co wskazuje brak prążków białek w próbce (frakcja 56) po rozdziale elektroforetycznym SDS-PAGE (Rysunek 33 C). Na podstawie analizy SDS-PAGE do dalszych prac wybrano frakcje 38-44, w których znajdowało się białko PD-L1 o czystości >95% (Rysunek 33 C).



Rysunek 33. Oczyszczanie białka PD-L1. Przykładowy rozdział elektroforetyczny profilu białkowego lizatu bakteryjnego BL21(DE3) przed (NI) i po indukcji ekspresji (IND) białka PD-L1 (**A**), przykładowy chromatogram przedstawiający rozdział białka PD-L1 metodą filtracji żelowej (**B**) oraz rozdział elektroforetyczny SDS-PAGE wybranych frakcji profilu elucyjnego (**C**); M – standard mas cząsteczkowych białek, 28-44 – kolejne frakcje rozdziału chromatograficznego białka PD-L1.

W kolejnym etapie próbka białka PD-L1 została poddana analizie NMR. Profil jednowymiarowego widma protonowego 1D ^1H NMR wskazuje jednoznacznie na ustrukturyzowanie białka. Świadczą o tym wąskie i odseparowane sygnały w regionie alifatycznym (-1,0 – 1,0 ppm) oraz amidowym/aromatycznym (6 – 9 ppm) (Rysunek 34). W przypadku białka niesfałdowanego lub agregatów, w widmie ^1H obserwowaliby się poszerzone sygnały, a w zakresie około 0 ppm tylko linię bazową (brak widocznych sygnałów ^1H). Wynik ten jest istotny w kontekście potwierdzenia spodziewanego efektu procedury refałdowania.



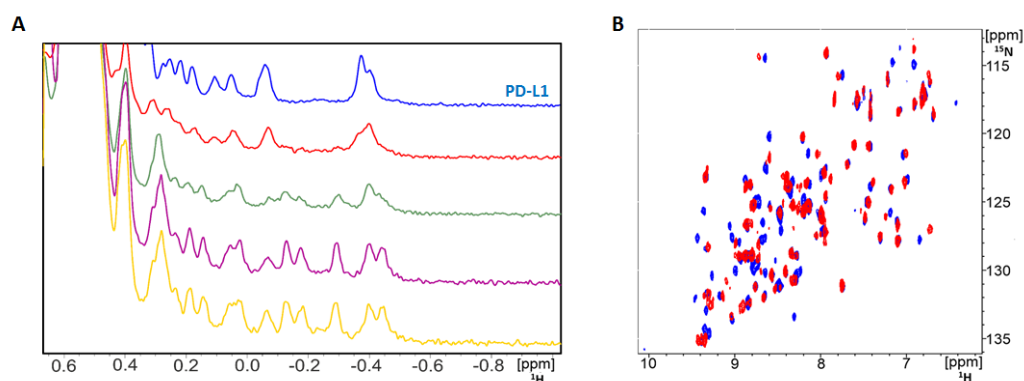
Rysunek 34. Jednowymiarowe widmo ^1H NMR NMR białka PD-L1

Dalsze potwierdzenie ustrukturyzowania białka uzyskano analizując dwuwymiarowe widma NMR. Preparat białka wzbogacono izotopem ^{15}N przez produkcję w pożywce minimalnej w obecności ^{15}N . Zarejestrowane widmo ^1H - ^{15}N SOFAST HSQC NMR białka potwierdziło, iż białko występuje w formie sfałdowanej (sygnały korelacyjne ^1H - ^{15}N są dobrze rozdzielone).

7.12 Badanie interakcji białka PD-L1 z makrocyklicznym peptydem p104

Interakcję białka PD-L1 z p104 potwierdzono przez miareczkowanie NMR. Zarejestrowano jednowymiarowe widmo ^1H NMR próbki białka bez dodatku liganda (Rysunek 35 A). Następnie, do próbki białka dodawano porcjami p104 do uzyskania konkretnych stężeń peptydu, po czym ponownie zarejestrowano widma jednowymiarowe. Analiza otrzymanych widm wykazała zmiany przesunięć chemicznych sygnałów rezonansowych białka w porównaniu do próby kontrolnej PD-L1. Wraz ze wzrastającym stężeniem p104

obserwowano przesunięcia sygnałów w zakresie -0,6 – 0,4 ppm rejonu alifatycznego. Zmiany takie w widmie jednowymiarowym jednoznacznie wskazują na wiązanie się peptydu do białka PD-L1. W przypadku braku interakcji z białkiem widmo nie ulegałoby zmianie. Dodatkowo można wykluczyć, że pojawiające się sygnały w widmie pochodzą od peptydu, ponieważ w tym zakresie bardzo rzadko widoczne są sygnały od peptydów. Zmiany przesunięć sygnałów chemicznych białka świadczą o tworzeniu się kompleksu PD-L1/p104 (Rysunek 35 A). Ponadto, stosując nadmiar p104 nie zaobserwowano dalszych zmian intensywności i przesunięć sygnałów w widmie, co wskazuje na silne wiązanie peptydu do białka PD-L1.



Rysunek 35. Badanie interakcji PD-L1 z makrocyclicznym peptydem p104. Widmo jednowymiarowe ^1H NMR białka PD-L1 (niebieski), PD-L1 w obecności makrocyclicznego peptydu p104 w stosunku molowym 5:1 (czerwony), 2:1 (zielony), 1:1 (fioletowy), 1:2 (żółty) (A). Dwuwymiarowe widmo ^1H - ^{15}N SOFAST HMQC białka PD-L1 (niebieski) i kompleksu PD-L1/p104 (czerwony) w stosunku molowym 1:1 (B).

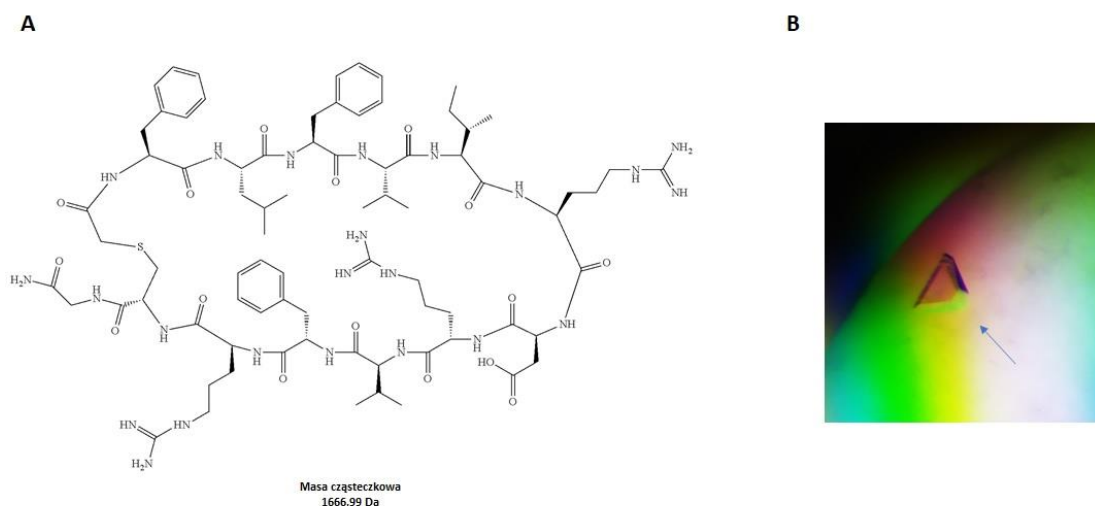
Analogiczny eksperyment przeprowadzono rejestrując widma dwuwymiarowe, w przypadku których interpretacja przesunięć chemicznych jest łatwiejsza i bardziej jednoznaczna, ponieważ obserwujemy zmiany przesunięć sygnałów korelacyjnych ^1H - ^{15}N pochodzących od białka, po dodaniu inhibitora. Podobnie jak w przypadku widm ^1H , brak interakcji peptydu z białkiem nie powodowałaby tak znaczących zmian w widmie 2D. Ponadto zmiany widoczne w widmie HMQC pochodzą tylko i wyłącznie od sygnałów białka, ponieważ peptyd nie był znakowany izotopem ^{15}N stąd niemożliwe jest obserwowanie od niego sygnałów w tym widmie NMR. Tym samym wykazano, iż peptyd p104 oddziałuje z białkiem PD-L1.

Istotnym było również sprawdzenie czy peptyd p104 występuje w dwóch alternatywnych konformacjach, jak obserwowano wcześniej w strukturze krystalograficznej kompleksu p101 z PD-L1. W widmie dwuwymiarowym ^1H - ^{15}N SOFAST HSQC NMR kompleksu PD-L1/p104 nie zaobserwowano podwojenia sygnałów, które świadczyłyby o podwójnej konformacji kompleksu w roztworze. Ponieważ podczas badania kompleksu PD-L1/p101

również nie obserwowano podwojenia sygnałów, dlatego przeprowadzono badania krystalograficzne, które miały zweryfikować występowanie podwójnej konformacji kompleksu PD-L1/p104 [398], [477]

7.13 Krystalizacja kompleksu białka PD-L1 z makrocyclicznym peptydem p104

Uzyskany w poprzednich etapach pracy preparat białka PD-L1 charakteryzował się wysokim stopniem czystości oraz poprawnym sfałdowaniem. W celu poznania struktury krystalograficznej kompleksu PD-L1 z makrocyclicznym peptydem p104 (Rysunek 36 A) podjęto próby krystalizacji kompleksu PD-L1/p104. Białko PD-L1 zostało zagęszczone do stężenia 5 mg/ml, a następnie preparat miareczkowano inhibitorem p104 do osiągnięcia stosunku molowego 1:3 (PD-L1: p104). Tak przygotowany kompleks odwirowano w celu usunięcia precypitatu, a następnie wykonano wstępny test warunków krystalizacji metodą kropli siedzącej z użyciem komercyjnie dostępnych buforów (lista zestawów komercyjnie dostępnych buforów została przedstawiona w p. 6.1). Pierwsze próby krystalizacji prowadzone w stosunku objętościowym kompleksu PD-L1/p104 do buforu krystalizacyjnego 1:1 nie pozwoliły na uzyskanie kryształów. Kolejne próby krystalizacji w innych stosunkach objętościowych kompleksu PD-L1/p104 do buforu krystalizacyjnego pozwoliły na uzyskanie kryształów przy stosunku 1,5:1 w wielu różnych warunkach krystalizacyjnych. Morfologia i wielkość kryształów nie były zadowalające, co potwierdziła niska zdolność do rozpraszania promieniowania synchrotronowego stwierdzona we wstępnych pomiarach. Procedurę krystalizacji poddano dalszej optymalizacji (jak opisano w rozdziale 6.2.19). W wyniku optymalizacji otrzymano kryształy o kształcie tetrahedralnym i zadowalających właściwościach rozpraszania promieniowania synchrotronowego. Kryształy uzyskano w następujących warunkach: 0,1 M cytrynianu sodu z dodatkiem 1,95 M siarczanu amonu o pH 6,24 w temperaturze pokojowej (Rysunek 36 B). Dane uzyskane z pomiarów dyfrakcyjnych posłużyły do rozwiązania struktury krystalicznej kompleksu PD-L1/p104.



Rysunek 36. Wzór chemiczny makrocyklicznego peptydu p104 (A) oraz kryształ kompleksu PD-L1/p104 (B). Kryształ wskazano strzałką.

7.14 Struktura krystaliczna białka PD-L1 z makrocyklicznym peptydem p104

Uzyskanie struktury krystalicznej kompleksu dystalnej, zewnątrzkomórkowej domeny IgV białka PD-L1 z makrocyklicznym peptydem p104 pozwoliło na określenie natury oddziaływań białka z tym ligandem.

Struktura kompleksu PD-L1/p104 została rozwiązana w grupie przestrzennej P 2 3 metodą podstawienia molekularnego z rozdzielczością 1,9 Å. Do podstawienia molekularnego wykorzystałam jako model strukturę białka PD-L1 (PDB ID 5O45). Komórka elementarna o parametrach $a=86,5$ Å, $b=86,5$ Å, $c=86,5$ Å zawierała jedną cząsteczkę białka PD-L1 w kompleksie z p104. Statystyki danych rozwiązanej struktury zestawiono w Tabela 5.

Tabela 5. Statystyki danych i udokładniania struktury kompleksu PD-L1 z makrocyclicznym peptydem p104

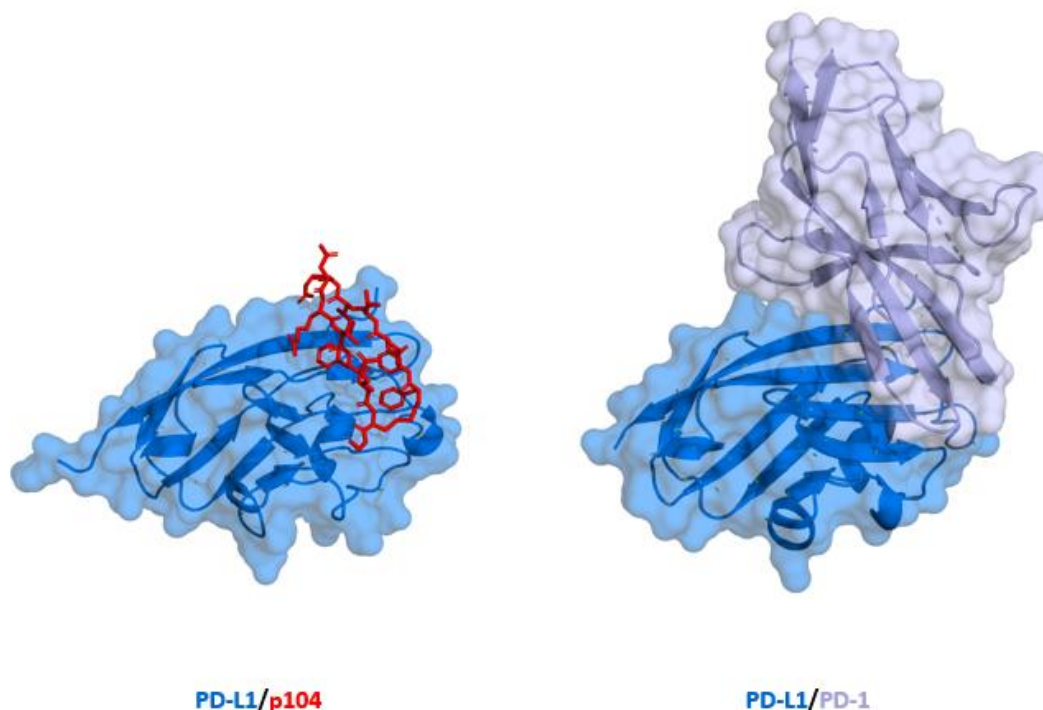
Dane pomiarowe:	
Długość fali (Å)	0.9184
Grupa przestrzenna	<i>P</i> 2 3
Wymiary komórki elementarnej	
a,b,c (Å)	86,5 86,5 86,5
α,β,γ (°)	90,0 90,0 90,0
zakres rozdzielczości (Å)	61,1–1,9
Rmerge	0,091 (1,576)
$I/\sigma(I)$	18,1 (2,6)
Kompletność (%)	100,00 (100,00)
Liczba unikalnych refleksów	17,309
CC1/2	1,000 (0,666)
Statystyki udokładniania	
Liczba refleksów	480,286
Rwork/Rfree	0,232/0,246
Średni współczynnik temperaturowy – Wilson B-factor	40,2
Liczba atomów	1098
Liczba atomów białka	1061
Liczba wód	37
Procent reszt w preferowanych regionach	91,0
Procent reszt w dozwolonych regionach	5,7
Procent reszt w niedozwolonych regionach	3,3
R.m.s.d. długości wiązań (Å)	0,016
R.m.s.d. kątów między wiązaniami (°)	2,262

Otrzymana struktura domeny IgV białka PD-L1 obejmowała aminokwasy Ala18-Tyr134, zaś konstrukt użyty do produkcji białka zawierał sekwencję Ala18-His145. Brak widocznego fragmentu Ala135-His145 w strukturze może być wynikiem jego wysokiej ruchomości w przestrzeni, przez co nie posiada on dobrze zdefiniowanej orientacji w kryształach a tym samym gęstości elektronowej.

Struktura białka PD-L1 składa się z β -kartek, które tworzą dwupoziomowy motyw β -kanapki stabilizowany poprzez utworzenie pojedynczego mostka disulfidowego pomiędzy resztami Cys40 i Cys140. Ułożenie β -łańcuchów w każdym z obecnych motywów β -kartek jest

antyrownolegle. Fałdowanie takie jest charakterystyczne dla białek należących do superrodziny immunoglobulin [478].

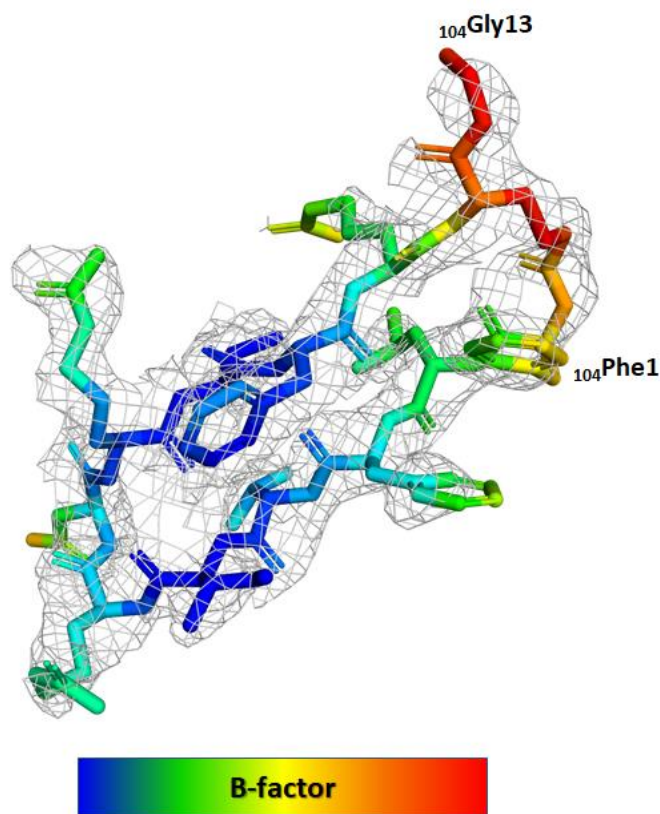
Porównanie struktur kompleksu PD-1/PD-L1 ze strukturą kompleksu PD-L1/p104 pokazuje, że peptyd p104 wiąże się do tego samego miejsca na PD-L1, w którym dochodzi do wiązania PD-1. Pokrywanie się powierzchni interakcji PD-1/PD-L1 i PD-L1/p104 wskazuje, że p104 jest kompetycyjnym inhibitorem aktywacji osi PD-1/PD-L1 (Rysunek 37).



Rysunek 37. Struktura przestrzenna kompleksu PD-L1 z makrocyklicznym peptydem p104 oraz kompleksu PD-L1 z PD-1. Zestawienie struktur obu kompleksów wskazuje na to samo miejsce wiązania peptydu i PD-1 przez białko PD-L1. Rysunek przygotowano w programie PyMol.

Makrocykliczny peptyd p104 występuje w formie spinki do włosów (ang. *β -hairpin*), której antyrównoległe nici β są ułożone prostopadle do nici C, C', G i F domeny IgV białka PD-L1 (Rysunek S 5 w rozdziale Załączniki). Oprócz wiązań wodorowych zapewniających stabilizację struktury spinki do włosów, można zaobserwować hydrofobowe interakcje pomiędzy łańcuchami bocznymi aminokwasów wewnątrz peptydu, które dodatkowo zapewniają stabilizację cząsteczki p104. Obecność acetamidowego łącznika łączącego atom siarki $_{104}\text{Cys12}$ z atomem azotu grupy aminowej $_{104}\text{Phe1}$ (cyklizacja peptydu) powoduje dodatkowe usztywnienie struktury ułatwiając utrzymanie kształtu pierścienia, co z kolei zapewnia centralne ułożenie aromatycznego łańcucha bocznego $_{104}\text{Phe10}$, który pełni istotną rolę w oddziaływaniu z PD-L1.

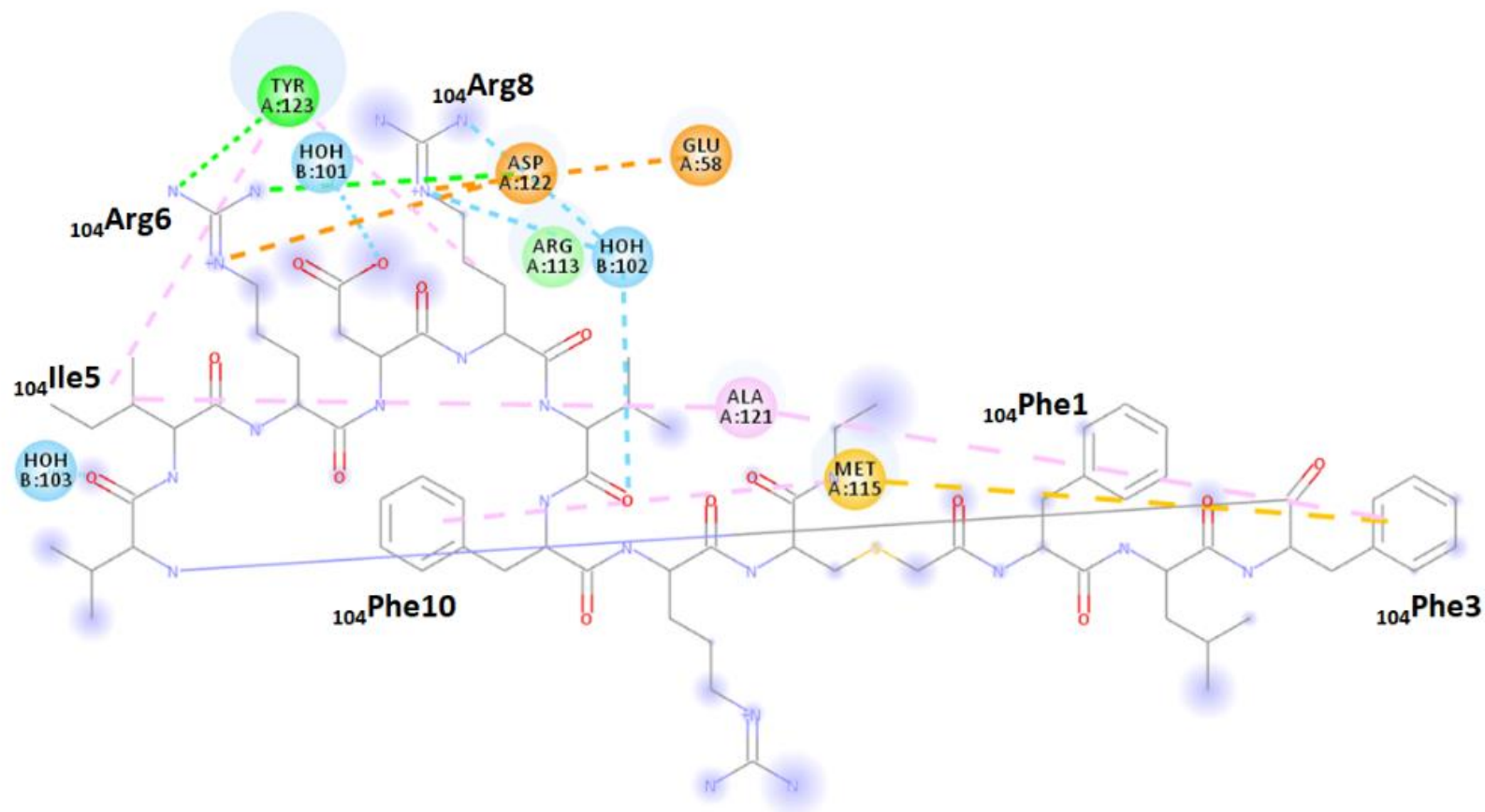
W budowie peptydu można wyróżnić dwie płaszczyzny: (i) skierowaną w stronę białka, która zawiera łańcuchy boczne aminokwasów hydrofobowych $_{104}\text{Phe1}$, $_{104}\text{Phe3}$, $_{104}\text{Ile5}$, $_{104}\text{Phe10}$ biorących udział w interakcji z PD-L1 oraz (ii) skierowaną w stronę roztworu, zbudowaną z reszt hydrofobowych: $_{104}\text{Leu2}$, $_{104}\text{Val4}$, $_{104}\text{Val9}$ biorących udział w tworzeniu oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych stabilizujących cząsteczkę p104, oraz polarnych: $_{104}\text{Asp7}$, $_{104}\text{Arg11}$, które mogą brać udział oddziaływaniu z rozpuszczalnikiem. Peptyd p104 zawiera ponadto reszty polarne $_{104}\text{Arg6}$ i $_{104}\text{Arg8}$, które co prawda nie są bezpośrednio skierowane w stronę białka PD-L1, ale dzięki obecności długich łańcuchów bocznych mogą z nim oddziaływać. Rejony makrocyklicznego peptydu p104 wchodzące w interakcję z płaszczyzną białka PD-L1 posiadają niższe wartości współczynników temperaturowych Wilson B, co wskazuje na mniejsze oscylacje atomów. Wyższe wartości współczynników temperaturowych Wilson B są obserwowane w rejonie zbudowanym z reszt aminokwasowych $_{104}\text{Cys12}$ i $_{104}\text{Gly13}$, co wskazuje na ich niewielkie zaangażowanie w interakcję z PD-L1 (Rysunek 38).



Rysunek 38. Reprezentacja współczynników temperaturowych Wilson B (B-factor) makrocyklicznego peptydu p104. Na rysunku uwzględniono mapę pokazującą ciągłą gęstość elektronową, która definiuje położenie makrocyklicznego inhibitora p104. Rysunek przygotowano w programie PyMol.

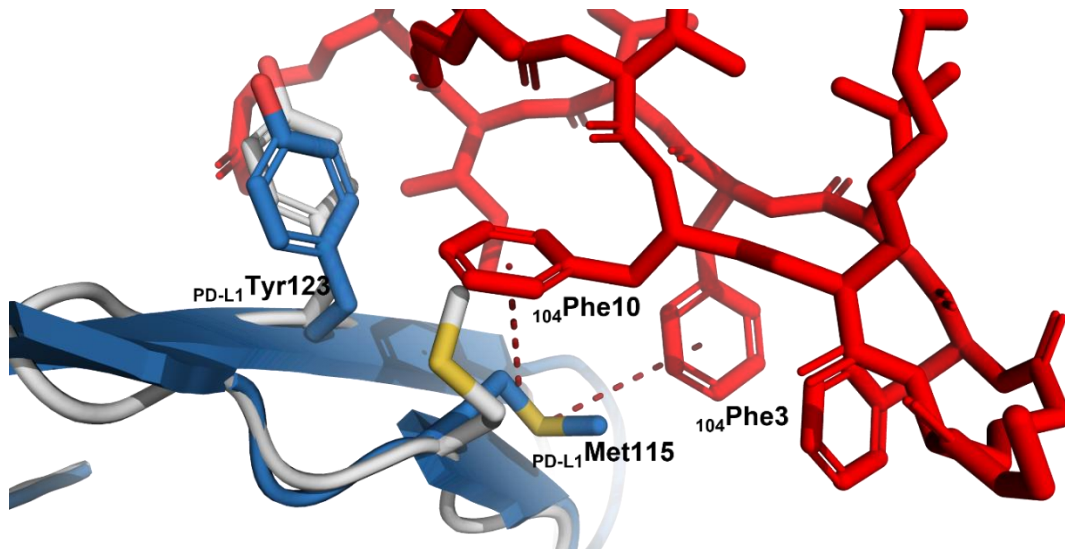
Szczegółowa analiza struktury kompleksu PD-L1/p104 ujawniła, że kluczowe miejsca interakcji białka PD-L1 z peptydem znajdują się w obrębie łańcuchów F i G białka (Rysunek S 5 w rozdziale Załączniki), podczas gdy wkład do oddziaływania aminokwasów nici C i C' jest znacznie mniejszy. Należy podkreślić, że cechą charakterystyczną interakcji PD-1/PD-L1 jest brak klasycznych, dobrze zdefiniowanych i głębokich kieszeni wiążących, zaś oddziaływanie jest utrzymywane przez interakcje aminokwasów w obrębie płytkich rowków tworzących się na powierzchni białek (które na potrzeby niniejszej pracy będą opisywane jako kieszenie wiążące).

Tworzenie kompleksu PD-L1/p104 wynika w dużej mierze z oddziaływań hydrofobowych pomiędzy partnerami (Rysunek 39).



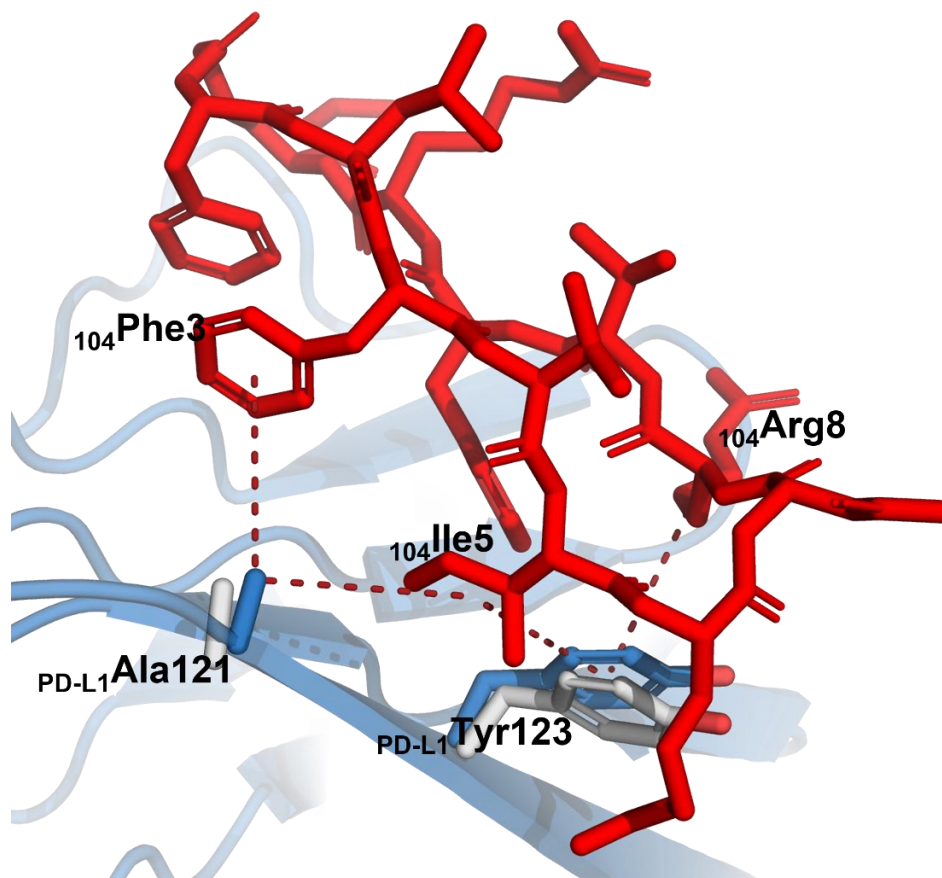
Rysunek 39. Schematyczne przedstawienie oddziaływań kompleksu p104/PD-L1. Wiązania hydrofobowe – kolor różowy; wiązania wodorowe – kolor zielony; wiązanie π -siarka – kolor żółty; wiązania elektrostatyczne – kolor pomarańczowy. Peptyd przedstawiono wzorem strukturalnym. Aminokwasy PD-L1 biorące udział w oddziaływaniu przedstawiono schematycznie jako kolorowe koła. Rysunek przygotowany w programie Discovery Studio.

Oddziaływanie p104 z PD-L1 wprowadza łańcuchy boczne $_{104}\text{Phe3}$ i $_{104}\text{Phe10}$ w miejsce wiążące białka PD-L1, co wymusza zmiany konformacyjne odpowiednio $_{\text{PD-L1}}\text{Met115}$ i $_{\text{PD-L1}}\text{Tyr123}$. Przemieszczenie się łańcucha bocznego $_{\text{PD-L1}}\text{Met115}$ generuje oddziaływanie π -siarka z $_{104}\text{Phe3}$ przy jednoczesnym oddziaływaniu hydrofobowym typu π -alkil z $_{104}\text{Phe10}$ (Rysunek 40).



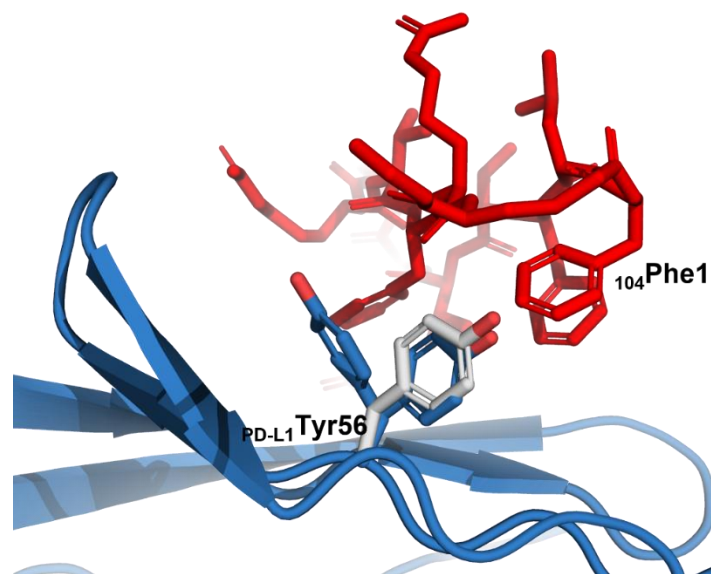
Rysunek 40. Zmiana położenia Met115 i Tyr123 białka PD-L1 pod wpływem wiązania p104. Strukturę formy apo-PD-L1 (szary) nałożono na strukturę białka PD-L1 w kompleksie z p104 (niebieski). Peptyd p104 oznaczono kolorem czerwonym. Wiązania hydrofobowe – czerwona przerywana linia; atom siarki zaznaczono na żółto. Rysunek przygotowano w programie PyMol.

Pozostałe oddziaływania hydrofobowe są utworzone przez zakotwiczenie $_{104}\text{Phe3}$ i $_{104}\text{Ile5}$ wokół łańcucha bocznego $_{\text{PD-L1}}\text{Ala121}$ za pomocą wiązań typu π -alkil oraz dwóch oddziaływań typu π -alkil pomiędzy $_{104}\text{Ile5}$, $_{104}\text{Arg8}$ i $_{\text{PD-L1}}\text{Tyr123}$ (Rysunek 41). Ponadto relokacja łańcucha bocznego $_{\text{PD-L1}}\text{Tyr123}$ wymusza oddziaływanie rodzaju π -kation z $_{104}\text{Arg6}$ (opisane w dalszej części rozdziału).



Rysunek 41. Zmiana położenia Ala121 i Tyr123 oraz interakcje im towarzyszące. Strukturę formy apo-PD-L1 (szary) nałożono na strukturę białka PD-L1 w kompleksie z p104 (niebieski). Peptyd p104 oznaczono kolorem czerwonym. Wiązania hydrofobowe – czerwona przerywana linia

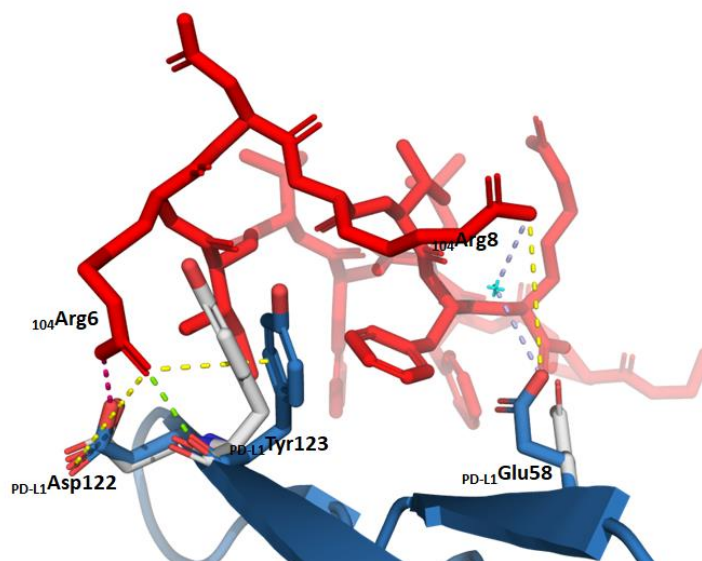
Pomimo niewielkiego wkładu w oddziaływanie aminokwasów należących do łańcucha C, zaobserwowano znaczące przemieszczenie się łańcucha bocznego reszty ${}_{\text{PD-L1}}\text{Tyr56}$ (Rysunek 42). Obecność ${}_{104}\text{Phe1}$ w miejscu interakcji z PD-L1 wymusza zmianę położenia aromatycznego pierścienia ${}_{\text{PD-L1}}\text{Tyr56}$. Gęstość elektronowa reszty ${}_{\text{PD-L1}}\text{Tyr56}$ wskazuje na występowanie dwóch konformacji łańcucha bocznego tego aminokwasu. Jednak jest to wyjątek i nie odnotowano innych reszt aminokwasowych białka PD-L1, które występują w dwóch konformacjach. Taka obserwacja jest trudna do interpretacji, jednak potencjalnie może być wynikiem nieidealnego dopasowania użytego modelu białka PD-L1 do otrzymanej gęstości elektronowej pomimo długotrwałego udokładniania struktury kompleksu PD-L1/p104.



Rysunek 42. Zmiana położenia Tyr56 białka PD-L1 pod wpływem wiązania p104. Łańcuch boczny $_{PD-L1}Tyr56$ formy apo-PD-L1 (szary) nałożono na strukturę białka PD-L1 w kompleksie z p104 (niebieski), w której Tyr56 występuje w dwóch konformacjach.

W przeciwieństwie do opisanych powyżej łańcuchów β , fragment C' nie bierze udziału w wiązaniu liganda p104. Jedyne zmiany jakie zaobserwowano w położeniu reszt aminokwasowych w obrębie tego fragmentu pod wpływem tworzenia kompleksu PD-L1/p104 dotyczą nieznacznego przesunięcia łańcuchów bocznych reszt $_{PD-L1}Gln66$ i $_{PD-L1}Asp73$.

Rolę w wiązaniu p104 odgrywają także oddziaływania elektrostatyczne. Pod wpływem wiązania p104 dochodzi do przesunięcia łańcucha bocznego $_{PD-L1}Glu58$ w kierunku $_{104}Arg8$. W wyniku tej relokacji, jeden z atomów tlenu łańcucha bocznego $_{PD-L1}Glu58$ tworzy oddziaływanie elektrostatyczne z jednym z atomów azotu łańcucha bocznego $_{104}Arg8$ (Rysunek 43). Z kolei pozycja drugiej z występujących w p104 reszt argininy – $_{104}Arg6$ jest stabilizowana parą oddziaływań elektrostatycznych z białkiem PD-L1, w tym mostkiem solnym należącym do silnych wiązań jonowych. Oddziaływania te powstają w wyniku interakcji atomów azotu łańcucha bocznego $_{104}Arg6$ i atomów tlenu łańcucha bocznego $_{PD-L1}Asp122$. Łańcuch boczny $_{104}Arg6$ oddziałuje również z pierścieniem aromatycznym $_{PD-L1}Tyr123$ tworząc wiązanie π -kation (Rysunek 43).



Rysunek 43. Oddziaływania elektrostatyczne stabilizujące interakcje p104 z PD-L1. Reszty boczne apo-PD-L1 (szary) nałożono na strukturę białka PD-L1 w kompleksie z p104 (niebieski). Wiązania elektrostatyczne – żółta, przerywana linia, mostek solny – różowa, przerywana linia. Na rysunku oznaczono jedyne bezpośrednie wiązanie wodorowe – zielona, przerywana linia oraz jedyną interakcję z udziałem cząsteczki wody (oznaczonej kolorem jasno turkusowym) – niebieska, przerywana linia. Rysunek przygotowano w programie PyMol.

Podsumowując, w tworzenie kompleksu PD-L1/p104 zaangażowane są głównie oddziaływania hydrofobowe przy mniejszym udziale oddziaływań elektrostatycznych. Oddziaływania polarne nie pełnią istotnej funkcji w wiązaniu liganda.

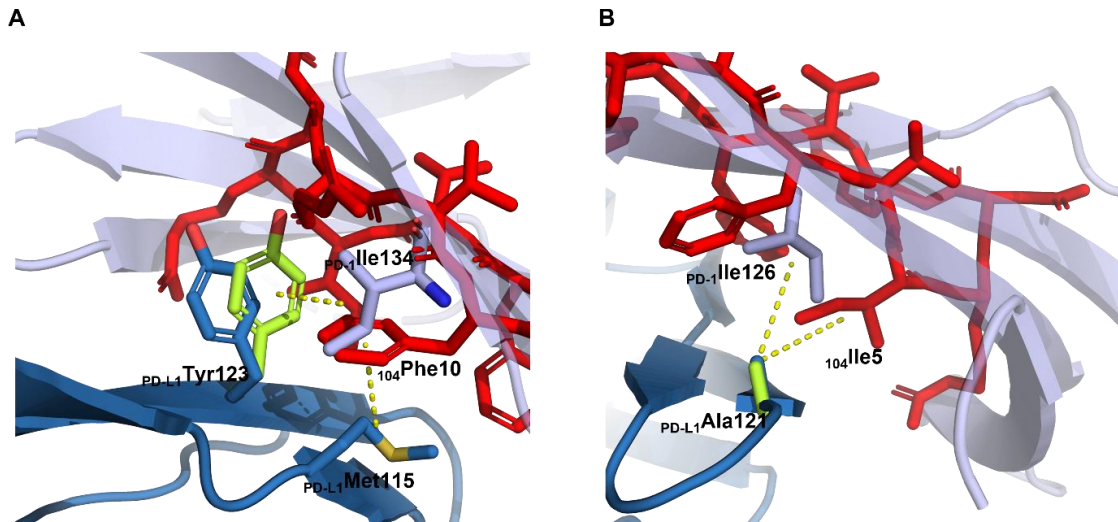
7.15 Porównanie mechanizmu wiązania PD-1 i makrocyklicznego peptydu p104 do PD-L1

Porównując struktury kompleksów PD-L1/p104 i PD-1/PD-L1 przedstawionej w [395] przez Żaka i wsp. w 2015 r. można wskazać ogólne podobieństwo jakim jest to samo miejsce wiązania na powierzchni PD-L1 (Rysunek 37). Wiązanie PD-1 obejmuje trzy płytkie kieszenie na powierzchni PD-L1, które są również obserwowane podczas wiązania p104.

Szczegółowa analiza ujawnia różną naturę oddziaływań w obu kompleksach (Rysunek 37). W strukturach kompleksów położenie reszt $_{PD-1}Leu128$, $_{PD-1}Ile126$ oraz $_{PD-1}Tyr68$ pokrywa się z położeniem reszt $_{104}Phe3$, $_{104}Ile5$ i $_{104}Arg6$.

Miejsce wiązania $_{PD-1}Ile134$ utworzone przez łańcuchy boczne $_{PD-L1}Tyr56$, $_{PD-L1}Glu58$, $_{PD-L1}Arg113$, $_{PD-L1}Met115$ i $_{PD-L1}Tyr123$ jest zajmowane przez $_{104}Phe10$ podczas wiązania inhibitora p104. Mimo, że $_{104}Phe10$ i $_{PD-1}Ile134$ dokują w tym samym miejscu

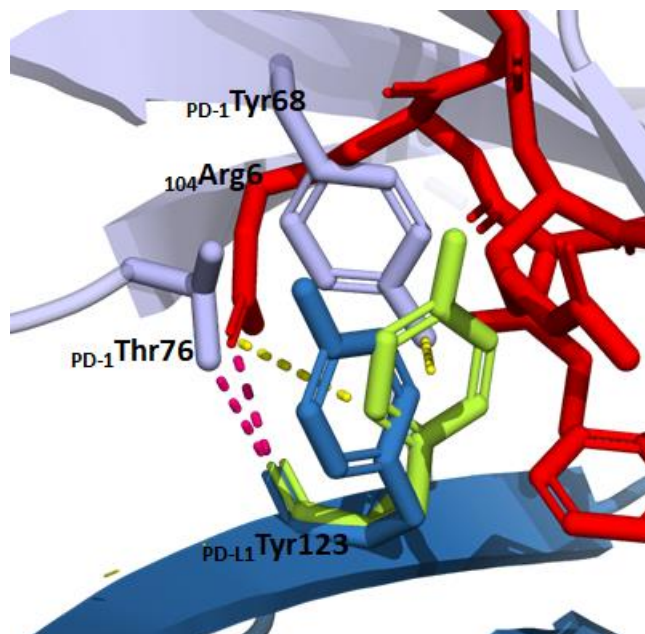
na powierzchni PD-L1 za pomocą wiązania hydrofobowego π -alkil, to miejscem kontaktu dla p104 jest łańcuch boczny $_{PD-L1}Met115$, zaś dla PD-1 jest to reszta $_{PD-L1}Tyr123$ (Rysunek 44 A).



Rysunek 44. Porównanie interakcji białka PD-L1 z PD-1 oraz p104 w obrębie dwóch kluczowych kieszeni wiążących. Reszty boczne PD-L1 (jasnozielony) w kompleksie z PD-1 (jasnoniebieski) nałożono na strukturę białka PD-L1 (niebieski) w kompleksie z p104 (czerwony) w obrębie pierwszej (A) i drugiej (B) kieszeni wiążącej. Oddziaływania hydrofobowe – żółte, przerywane linie. Rysunek przygotowano w programie PyMol.

Podobnie jak w przypadku wiązania PD-1 przez PD-L1, p104 dokuje także w drugiej płytce kieszeni utworzonej z reszt $_{PD-L1}Met115$, $_{PD-L1}Ala121$ i $_{PD-L1}Tyr123$. $_{104}Ile5$ peptydu p104 tworzy hydrofobowe oddziaływania z grupą metylową $_{PD-L1}Ala121$ naśladując kotwiczenie reszty $_{PD-1}Ile126$, a jedyna różnica polega na różnej orientacji przestrzennej łańcuchów bocznych obu reszt izoleucyny (Rysunek 44 B).

Peptyd p104 oddziałuje również z trzecią kieszenią wiążącą utworzoną przez reszty aminokwasowe od $_{PD-L1}Asp122$ do $_{PD-L1}Arg125$ oraz łańcuch boczny $_{PD-L1}Asp26$. Łańcuch boczny $_{104}Arg6$ tworząc wiązanie π -kation z pierścieniem aromatycznym $_{PD-L1}Tyr123$ naśladuje niekonwencjonalne wiązanie wodorowe typu π z resztą $_{PD-1}Tyr68$. Z kolei reszta $_{104}Arg6$ oddziałując z atomem tlenu łańcucha głównego $_{PD-L1}Tyr123$ naśladuje wiązanie wodorowe utworzone przez $_{PD-1}Thr76$ (Rysunek 45).



Rysunek 45. Porównanie interakcji białka PD-L1 z PD-1 oraz p104 w obrębie trzeciej kluczowej kieszeni wiążącej. Reszty boczne PD-L1 (jasnozielony) w kompleksie z PD-1 (jasnoniebieski) nałożono na strukturę białka PD-L1 (niebieski) w kompleksie z p104 (czerwony) w obrębie trzeciej kieszeni wiążącej. Oddziaływania typu π – żółte, przerywane linie, wiązania wodorowe – różowe, przerywane linie. Rysunek przygotowano w programie PyMol.

Podsumowując, miejsce wiązania makrocyklicznego peptydu p104 jest analogiczne do miejsca zajmowanego przez PD-1 na powierzchni PD-L1. Niektóre z interakcji p104 imitują oddziaływania obserwowane w kompleksie PD-1/PD-L1, jednak nie dotyczy to wszystkich oddziaływań z których część jest charakterystyczna jedynie dla p104.

7.16 Porównanie mechanizmu wiązania makrocyklicznych peptydów BMS III klasy

Poznanie struktury kompleksu PD-L1/p104 pozwoliło na dokładny opis wiązania. Istniejąca przed podjęciem opisywanych w pracy zagadnień literatura dostarczała opisu oddziaływania pojedynczych przedstawicieli trzech klas makrocyklicznych peptydów BMS z PD-L1. Szczególnie w przypadku klasy III ograniczona informacja strukturalna nie wyjaśniała w pełni oddziaływania peptydu z uwagi na niewyjaśnioną bifurkację cząsteczki inhibitora w dostępnej strukturze krystalicznej [398]. Celem pracy było scharakteryzowanie oddziaływania innego przedstawiciela klasy III (opisano w rozdziale 4.15) [331]. Pytanie dotyczyło powszechności bifurkacji oddziaływania w tej klasie peptydów makrocyklicznych.

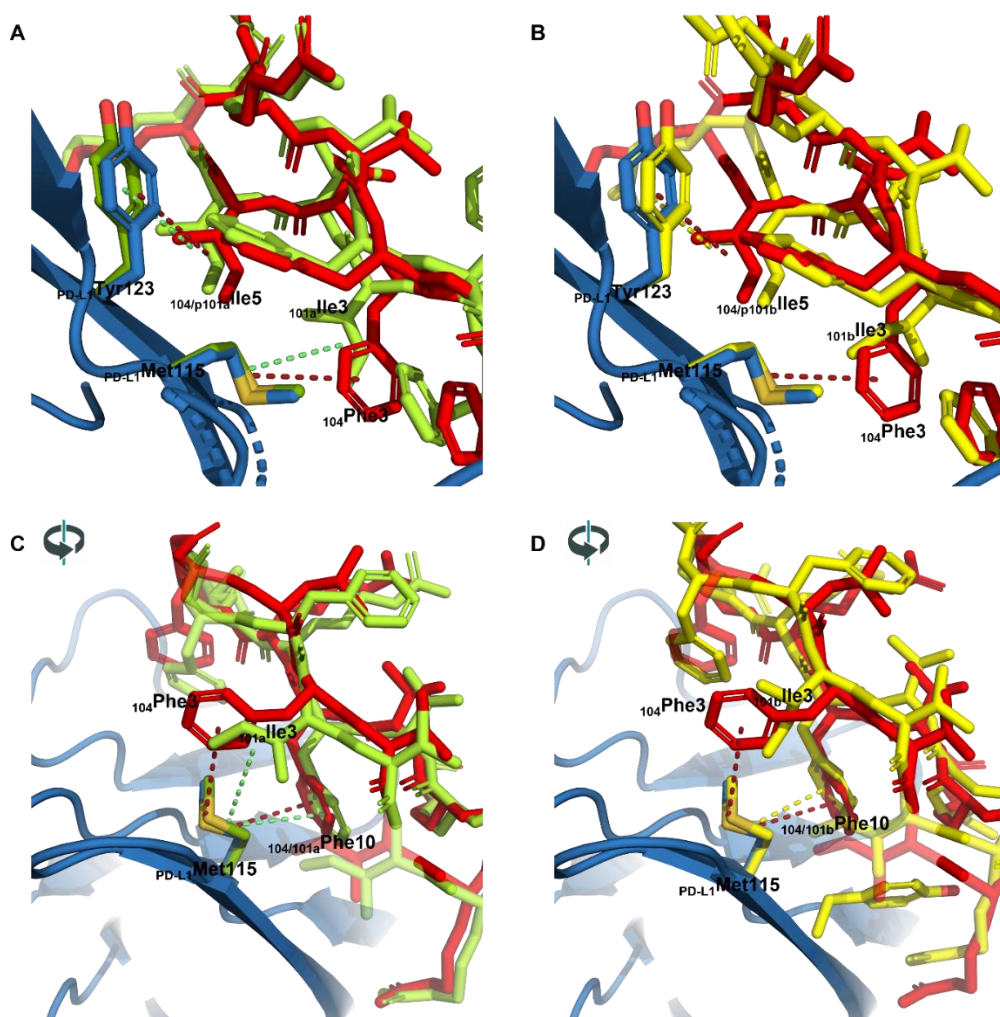
Jak wykazano wcześniej metodą HTRF (ang. *Homogeneous Time Resolved Fluorescence*) peptydy p101 (poprzednio scharakteryzowany przedstawiciel klasy III)

i p104 wykazują znacząco różną zdolność do dysocjowania kompleksu PD-1/PD-L1 pomimo znacznego podobieństwa sekwencji. Zamiana aminokwasów na dwóch pozycjach $_{101}\text{Ile3}$ na $_{104}\text{Phe3}$ oraz $_{101}\text{Phe2}$ na $_{104}\text{Leu2}$ prowadzi do znacznego spadku powinowactwa inhibitora p104 ($K_i = 380 \text{ nM}$) w stosunku do inhibitora p101 ($K_i = 120 \text{ nM}$) [331].

Jak można było się spodziewać, duże podobieństwo sekwencji obu inhibitorów przekłada się na podobieństwo strukturalne sposobu wiązania na powierzchni wiążącej domeny IgV białka PD-L1.

Analiza porównawcza struktur peptydów p104, p101a i p101b (alternatywne konformacje p101 obserwowane w strukturze krystalicznej kompleksu) w kompleksach z PD-L1 pokazuje, że łańcuch główny p104 znajduje się dokładnie pomiędzy orientacjami łańcucha głównego dwóch konformacji obserwowanych w przypadku peptydu p101. W obu przypadkach ważną rolę w utrzymaniu oddziaływań z PD-L1 pełnią te same kieszenie wiążące. Tym samym wykazano, że bifurkacja nie jest charakterystyczna dla całej trzeciej klasy inhibitorów BMS a jedynie dla struktury z peptydem p101.

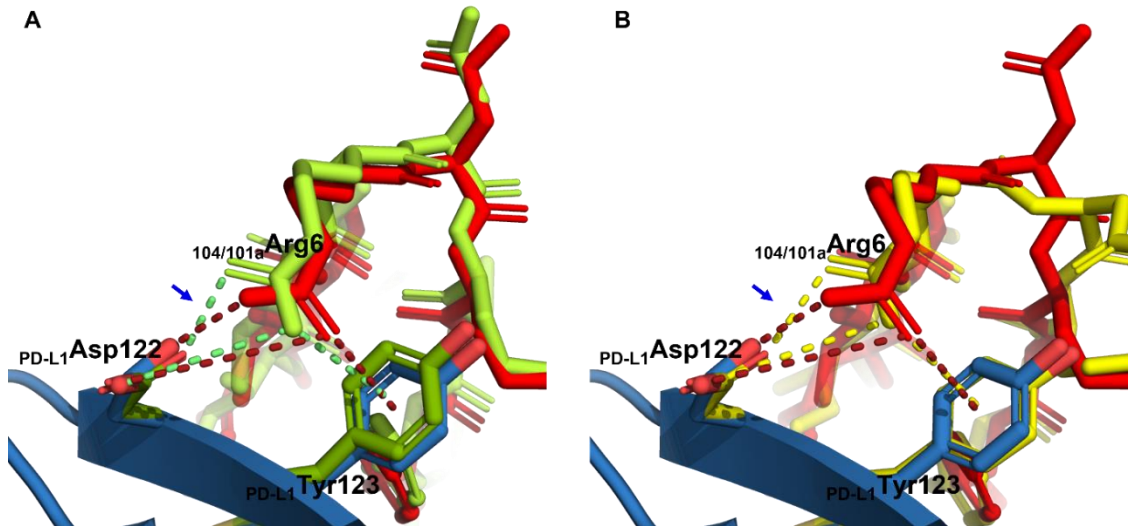
Porównując interakcje obu peptydów z PD-L1 wykazano, że kluczową rolę w ich kotwiczeniu pełni $_{\text{PD-L1}}\text{Met115}$, która to reszta oddziałuje z pierścieniem aromatycznym pochodzącym od $_{104}\text{Phe10}$ lub $_{101}\text{Phe10}$ za pomocą wiązania π -alkil. Warto dodać, że wiązanie występuje niezależnie od konformacji peptydu p101. Podczas wiązania p104 łańcuch boczny $_{\text{PD-L1}}\text{Met115}$ jest dodatkowo stabilizowany wiązaniem π -siarka z $_{104}\text{Phe3}$, które wcześniej zostało zaobserwowane tylko w jednym przypadku, a mianowicie podczas oddziaływania PD-L1 z peptydem p71 należącym do klasy II [418]. Analogiem tej interakcji może być oddziaływanie typu π -alkil pomiędzy $_{101a}\text{Ile3}$ i $_{\text{PD-L1}}\text{Met115}$, którego nie obserwuje się w konformacji p101b. Zauważono również podobieństwo pomiędzy p104 i p101a w oddziaływaniu $_{104}\text{Ile5}$ za pomocą wiązania π -alkil z $_{\text{PD-L1}}\text{Tyr123}$, czego nie obserwuje się podczas wiązania p101b. Z kolei $_{101a}\text{Ile3}$ podobnie jak $_{101b}\text{Ile3}$ tworzą wiązanie hydrofobowe z $_{\text{PD-L1}}\text{Ala121}$, którego odpowiednikiem podczas interakcji z p104 jest wiązanie π -alkil tworzone poprzez $_{104}\text{Phe3}$ (Rysunek 46).



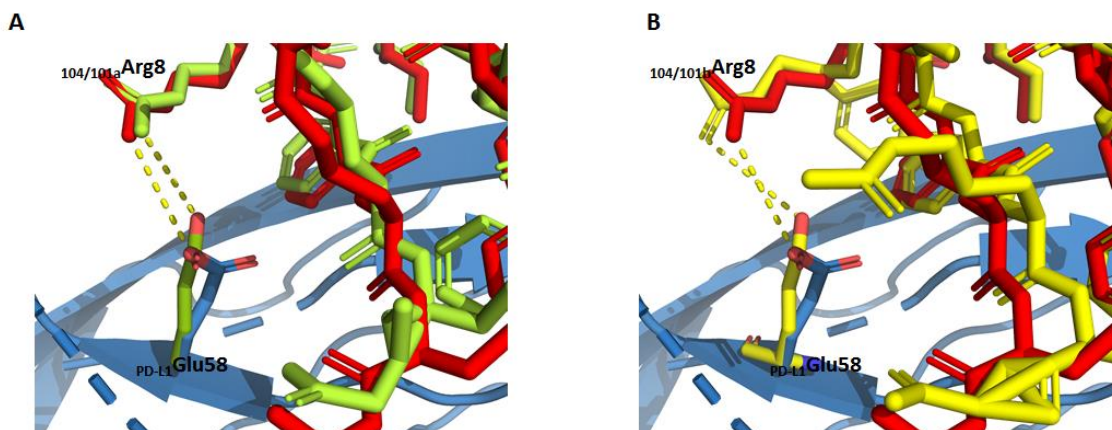
Rysunek 46. Porównanie zmiany położenia Ala121 białka PD-L1 pod wpływem wiązania p101 oraz p104. Reszty boczne PD-L1 w kompleksie z konformacją p101a – peptyd jak i reszty PD-L1 z nim oddziałujące oznaczono kolorem zielonym (A,C), oraz z konformacją p101b – peptyd p101b jak i reszty PD-L1 z nim oddziałujące oznaczono kolorem żółtym (B,D) nałożono na strukturę białka PD-L1 (niebieski) w kompleksie z p104 (czerwony). Oddziaływania hydrofobowe między p104 a PD-L1 – bordowe, przerywane linie. Rysunek przygotowano w programie PyMol.

Podczas wiązania peptydu p104 dochodzi do utworzenia mostka solnego pomiędzy łańcuchami bocznymi $_{104}\text{Arg6}$ i $_{\text{PD-L1}}\text{Asp122}$ (Rysunek 47). Powstały mostek solny jest dodatkowo stabilizowany przez oddziaływanie elektrostatyczne utworzone pomiędzy drugą parą atomów azotu i tlenu łańcuchów bocznych $_{104}\text{Arg6}$ i $_{\text{PD-L1}}\text{Asp122}$ (Rysunek 42). Takie same wiązania są obserwowane pomiędzy $_{\text{p101}}\text{Arg6}$ i $_{\text{PD-L1}}\text{Asp122}$ także podczas oddziaływania PD-L1 z p101. Dodatkowo, łańcuch boczny $_{104}\text{Arg6}$ wchodzi w interakcję z aromatycznym ugrupowaniem $_{\text{PD-L1}}\text{Tyr123}$ tworząc silne wiązanie typu π -kation jak i z atomem tlenu grupy karboksylowej łańcucha głównego $_{\text{PD-L1}}\text{Tyr123}$ za pomocą wiązania wodorowego (Rysunek 43 i Rysunek 47). Ostatnie dwa wiązania z $_{\text{PD-L1}}\text{Tyr123}$ (wiązanie π -kation oraz wiązanie wodorowe) także są zaangażowane

w wiązanie p101 do PD-L1. Zarówno podczas wiązania p101 jak i p104 dochodzi do oddziaływania elektrostatycznego pomiędzy łańcuchami bocznymi 101a/104Arg8 i PD-L1Glu58 (Rysunek 48).



Rysunek 47. Porównanie zmiany położenia Asp122 i Tyr123 białka PD-L1 pod wpływem wiązania p101 oraz p104. Reszty boczne PD-L1 w kompleksie z konformacją p101a (peptyd jak i reszty PD-L1 z nim oddziałujące oznaczono kolorem zielonym) (A), oraz z konformacją p101b (peptyd p101b jak i reszty PD-L1 z nim oddziałujące oznaczono kolorem żółtym) (B) nałożono na strukturę białka PD-L1 (niebieski) w kompleksie z p104 (czerwony). Oddziaływania hydrofobowe p104- PD-L1 – bordowe, przerywane linie; niebieska strzałka – mostek solny. Rysunek przygotowany w programie PyMol.



Rysunek 48. Porównanie zmiany położenia Glu58 białka PD-L1 pod wpływem wiązania p101 oraz p104. Reszty boczne PD-L1 w kompleksie z konformacją p101a (peptyd jak i reszty PD-L1 z nim oddziałujące oznaczono kolorem zielonym) (A) i z konformacją p101b (peptyd p101b jak i reszty PD-L1 z nim oddziałujące oznaczono kolorem żółtym) (B) nałożono na strukturę białka PD-L1 w kompleksie (niebieski) z p104 (czerwony). Oddziaływania hydrofobowe – żółte, przerywane linie. Rysunek przygotowany w programie PyMol.

Odnotowano również, że p101b tworzy więcej interakcji podczas oddziaływania z PD-L1 w porównaniu do p101a. Niektóre interakcje obecne podczas oddziaływania

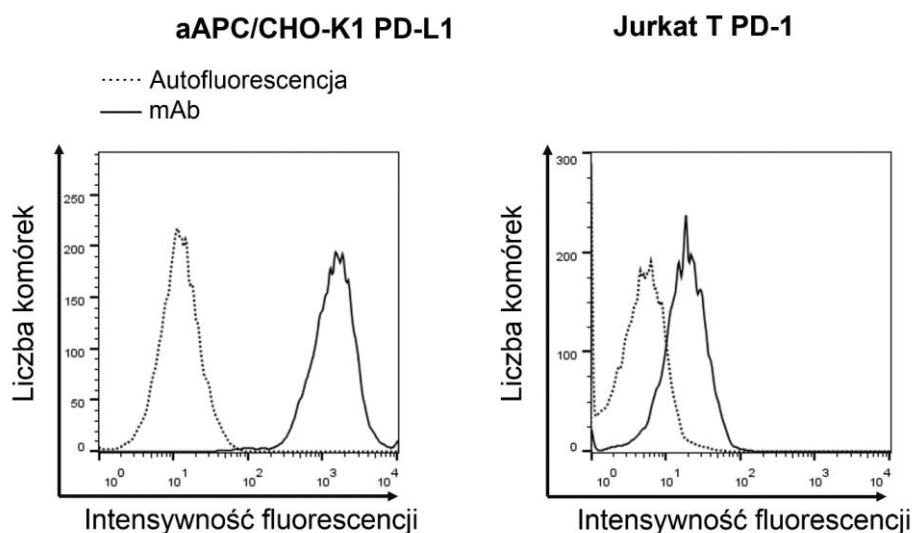
konformacji p101b z PD-L1 nie są także obserwowane podczas tworzenia kompleksu p104/PD-L1. Charakterystyczne dla p101b/PD-L1 oddziaływania angażują łańcuch boczny ^{101b}Asp7 tworząc wiązanie wodorowe z hydroksylowym ugrupowaniem łańcucha bocznego _{PD-L1}Tyr123. łańcuch boczny ^{101b}Asp7 peptydu p101b tworzy również mostek solny z łańcuchem bocznym _{PD-L1}Arg125, który dodatkowo jest stabilizowany poprzez polarne oddziaływania obu aminokwasów z udziałem cząsteczki wody. Podczas wiązania p101b do PD-L1 dochodzi także do interakcji π - π przyjmującej kształt litery T pomiędzy aromatycznymi ugrupowaniami ^{101b}Phe10 i _{PD-L1}Tyr123, której nie obserwuje się podczas tworzenia kompleksów PD-L1 z p101a czy p104.

W przeciwieństwie do p104, interakcja p101 z białkiem PD-L1 angażuje oddziaływania polarne z resztami aminokwasów w obrębie łańcucha C' domeny wiążącej białka PD-L1. W zależności od przyjętej konformacji peptydu p101 dochodzi do utworzenia oddziaływań różniących się od siebie. Związanie peptydu o konformacji p101a z białkiem PD-L1 zachodzi za pośrednictwem cząsteczki wody pomiędzy łańcuchem bocznym ^{101a}Arg8 i _{PD-L1}Asp61, natomiast podczas oddziaływania białka PD-L1 z p101b łańcuch boczny _{PD-L1}Gln66 uczestniczy w tworzeniu dwóch wiązań wodorowych. Pierwsze z nich występuje pomiędzy azotem grupy amidowej łańcucha bocznego _{PD-L1}Gln66 (azot NE2) i grupą karboksylową łańcucha głównego ^{101b}Cys12, a drugie pomiędzy tlenem grupy karbonylowej łańcucha bocznego _{PD-L1}Gln66 (tlen OE2) i grupą aminową łańcucha głównego ^{101b}Gly13.

7.17 Zdolność makrocyclicznego inhibitora p104 do inhibicji oddziaływania PD-1/PD-L1 w układzie komórkowym

Badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej wykazały, że peptyd p104 oddziałuje z domeną dystalną IgV białka PD-L1, zaś przedstawiona struktura krystaliczna kompleksu PD-L1/p104 pozwoliła scharakteryzować naturę tej interakcji. W następnej kolejności zweryfikowano hipotezę, że obecność peptydu p104 jest w stanie hamować tworzenie kompleksu PD-1/PD-L1 w układzie komórkowym, przez co w konsekwencji może doprowadzać do odtworzenia aktywacji limfocytów T. W tym celu posłużono się modelem *in vitro* kokultury komórek aAPC/CHO-K1 hPD-L1 z komórkami Jurkat T PD-1, tak jak opisano wcześniej w przypadku analizy aptamerów (rozdział 6.2.14).

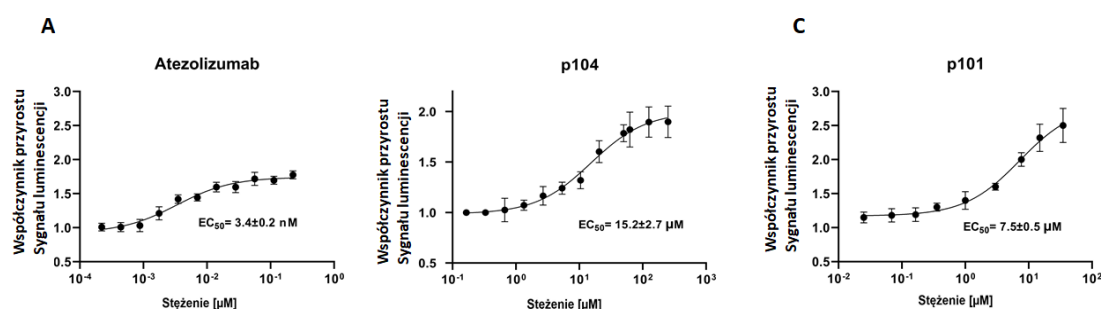
Obecność białek PD-L1 i PD-1 na powierzchni komórek CHO aAPC/PD-L1 i Jurkat T PD-1 została potwierdzona za pomocą cytometrii przepływowej (Rysunek 49).



Rysunek 49. Analiza cytofluorymetryczna poziomu nadekspresji receptora hPD-L1 na powierzchni komórek aAPC/CHO-K1 PD-L1 i Jurkat T PD-1. Do barwienia cytochemicznego użyto przeciwciał monoklonalnych mAb MIH1 (rozpoznających PD-L1) sprzęgniętych z APC lub mAb J105 (rozpoznających PD-1) sprzęgniętych z FITC.

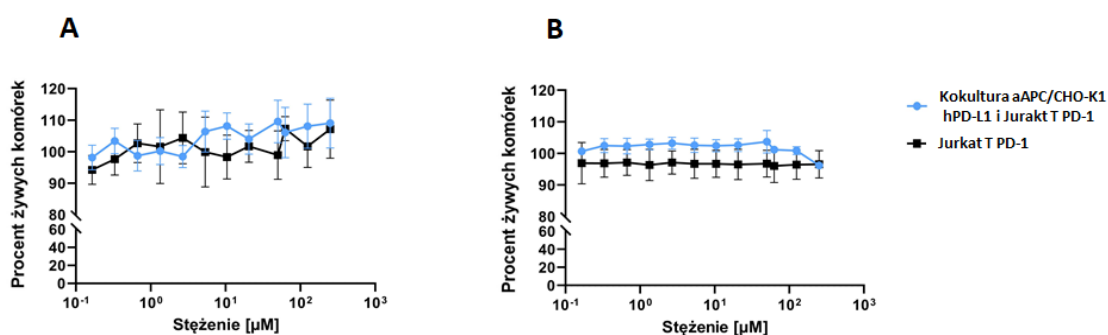
Funkcjonalność testu aktywności lucyferazy została potwierdzona przy użyciu przeciwciał terapeutycznych Atezolizumab skierowanych przeciwko białku PD-L1 (Rysunek 50 A), analogicznie do przeciwciał Nivolumab użytych podczas badań opisanych w rozdziale 7.9.5. Obecność przeciwciał skutecznie przywraca aktywność lucyferazy w komórkach Jurkat T PD-1 w sposób zależny od dawki, co oznacza, że dochodzi do zahamowania tworzenia kompleksu PD-1/PD-L1 i zniesienia zahamowania ekspresji lucyferazy wynikającego z oddziaływania PD-L1 z PD-1. Wyznaczone dla Atezolizumabu EC₅₀ hamowania tworzenia kompleksu PD-1/PD-L1 wyniosło $3,4 \pm 0,2$ nM. Również makrocycliczne peptydy hamują oddziaływanie PD-1/PD-L1 w sposób zależny od dawki, jednak ich efekty są znacznie słabsze niż efekt przeciwciała. Wartość EC₅₀ dla p101 wynosi $7,5 \pm 0,5$ μ M a EC₅₀ dla p104 jest jeszcze dwukrotnie wyższa ($15,2 \pm 2,7$ μ M). Obecność peptydu p104 przywraca sygnał luminescencji, co wskazuje na jego skuteczne działanie jako inhibitora ścieżki przekazu sygnału PD-1/PD-L1 w układzie komórkowym (Rysunek 50 B). Razem przedstawione dane

ukazują jednak konieczność dalszej optymalizacji właściwości tych cząsteczek z uwagi na ich niższą w porównaniu do przeciwciał aktywność.



Rysunek 50. Analiza zahamowania interakcji białek PD-1 i PD-L1 w układzie komórkowym przez makrocykliczne peptydy p104 i p101 oraz przeciwciała anty-PD-L1. Wykresy przedstawiają względny przyrost sygnału luminescencji obserwowany w obecności peptydu p104 (A), p101 (B) lub przeciwciała monoklonalnych Atezolizumab zastosowanych jako kontrola pozytywna (C). Podano wartości średnie ± OD z trzech niezależnych doświadczeń prowadzonych w tryplikatach.

W stężeniach wywołujących efekt biologiczny peptyd p104 nie wykazywał efektu cytotoksycznego na badane komórki. Nie zaobserwowano spadku aktywności mitochondriów jak i śmierci wywołanej lizą komórkową wraz z uwolnieniem zawartości cytoplazmy komórek Jurkat T PD-1. Podobnie nie zaobserwowano cytotoksycznego wpływu p104 na komórki kokultury aAPC/CHO-K1 hPD-L1 i Jurkat T PD-1 (Rysunek 51).



Rysunek 51. Badanie cytotoksycznego wpływu makrocyklicznego peptydu p104 na komórki Jurkat PD-1 oraz komórki kokultury aAPC/CHO-K1 hPD-L1 wraz z Jurkat T PD-1. Porównanie poziomu śmiertelności komórek po 24 godz. w teście MTT badającym aktywność mitochondrialną (A) oraz w teście aktywności uwolnionego do pożywki hodowlanej cytoplazmatycznego LDH (B). Podano wartości średnie ± OD z dwóch niezależnych doświadczeń prowadzonych w tryplikatach.

Podsumowanie

W ostatnim rozdziale przedstawiono wyniki dotyczące charakterystyki makrocyklicznego peptydu p104 należącego do III klasy makrocyklicznych peptydów BMS. Główna hipoteza poddana weryfikacji w ramach pracy dotyczyła powszechności bifurkacji oddziaływania peptydu z PD-L1 w tej klasie peptydów BMS. Interakcję białka PD-L1 z p104 potwierdzono przez miareczkowanie NMR. Analiza otrzymanych widm ^1H NMR oraz ^1H - ^{15}N SOFAST HSQC wykazała zmiany przesunięć chemicznych sygnałów rezonansowych w porównaniu do próby kontrolnej PD-L1, co świadczyło o tworzeniu kompleksu PD-L1/p104. Podczas analizy widma dwuwymiarowego ^1H - ^{15}N SOFAST HSQC NMR kompleksu PD-L1/p104 nie zaobserwowano podwojenia sygnałów, których obecność sugeruje podwójną konformację kompleksu.

Analiza struktury krystalicznej kompleksu PD-L1/p104 wskazuje, że powierzchnie interakcji PD-L1/PD-1 i PD-L1/p104 pokrywają się, co sugeruje, że peptyd p104 jest kompetycyjnym inhibitorem aktywacji osi PD-1/PD-L1. Podczas szczegółowej analizy zaobserwowano, że peptyd p104 jest dokowany w każdej z trzech kieszeni wiążących na powierzchni PD-L1 obecnych podczas interakcji z PD-1. Otrzymanie struktury krystalicznej kompleksu PD-L1/p104 pozwoliło określić, że jego tworzenie jest w dużej mierze wynikiem hydrofobowych oddziaływań pomiędzy partnerami, przy mniejszym udziale oddziaływań elektrostatycznych i polarnych. Niektóre reszty aminokwasowe peptydu p104 imitują część z oddziaływań obserwowanych podczas wiązania PD-1.

Do tej pory poznano charakterystykę tylko jednego peptydu klasy III BMS – p101, który wykazywał bifurkację cząsteczki w strukturze krystalicznej w kompleksie z PD-L1. Łańcuch główny peptydu p104 w kompleksie z PD-L1 znajduje się dokładnie pomiędzy orientacjami łańcuchów głównych dwóch konformacji peptydu p101. Analiza porównawcza struktur p104 i obu konformacji p101 pokazała, że w obu przypadkach istotną rolę w utrzymaniu oddziaływań z PD-L1 pełnią te same kieszenie wiążące. Porównując struktury p101 i p104 w kompleksie z PD-L1 dodatkowo potwierdzono, że bifurkacja nie jest charakterystyczna dla całej trzeciej klasy inhibitorów BMS a jedynie (jak do tej pory) dla struktury z peptydem p101.

Przeprowadzono także doświadczenia, które miały odpowiedzieć na pytanie, czy peptyd p104 jest w stanie hamować tworzenie kompleksu PD-1/PD-L1 w układzie komórkowym, przez co w konsekwencji mógłby doprowadzić do odtworzenia aktywacji limfocytów T. Badania *in vitro* przeprowadzone na komórkach modelowych wykazały, że peptyd p104 posiada biologiczną aktywność inhibitora kompleksu PD-1/PD-L1. Peptyd ten wykazywał niższą aktywność biologiczną w porównaniu do przeciwciał terapeutycznych. Otrzymane wyniki jednoznacznie wskazują na potrzebę prowadzenia dalszych badań nad optymalizacją makrocyklicznych peptydów.

8. Dyskusja

Immunoterapia przeciwnowotworowa skierowana przeciw osi PD-1/PD-L1 odniosła w ostatnich latach spektakularne sukcesy kliniczne [479]. To stosunkowo nowe podejście otwiera wiele nieeksploatowanych do tej pory możliwości i w kolejnych latach spodziewane są dalsze sukcesy kliniczne w terapiach nowotworów do tej pory nieuleczalnych lub opornych na leczenie. W ten nurt wpisuje się tematyka mojej pracy, w której przedstawiono charakterystykę trzech alternatywnych strategii immunoterapii przeciwnowotworowych, skupiających się na zahamowaniu interakcji białek PD-L1 i PD-1. Białko PD-L1, ze względu na powszechne występowanie na powierzchni komórek wielu typów nowotworów oraz innych komórek rezydujących w tkance guza, wydaje się być odpowiednim celem, którego zablokowanie może doprowadzić do przełamania immunosupresji i indukcji odpowiedzi immunologicznej.

Przeciwciała monoklonalne są obecnie wiodącym typem terapeutyków stosowanych w immunoterapiach nowotworów. Za opracowanie terapii przeciwciałami monoklonalnymi hamującymi punkty kontrolne odpowiedzi immunologicznej została przyznana Nagroda Nobla w 2018 r. [480]. Możliwość produkcji w pełni ludzkich przeciwciał oraz wprowadzania metodami inżynierii genetycznej modyfikacji zmieniających wielkość cząsteczek, ich czas półtrwania w osoczu i funkcje efektorowe eliminuje wiele z negatywnych cech przypisywanych przeciwciałom terapeutycznym. Jednakże, równocześnie z pracami nad udoskonalaniem przeciwciał monoklonalnych, wiele ośrodków na świecie szuka alternatywnych rozwiązań, które byłyby równie jak przeciwciała albo bardziej skuteczne i miałyby dodatkowe atrybuty np. byłyby tańsze w produkcji, bardziej stabilne, czy też charakteryzowałyby się lepszą farmakokinetyką i farmakodynamiką [481], [482]. Droga do zastosowania w medycynie takich alternatywnych rozwiązań jest daleka, jednak u jej początku zawsze znajdują się badania podstawowe.

8.1 Zastosowanie systemu flagelinowego bakterii *S. Typhimurium* jako układu transportującego białka fuzyjne o potencjalnie terapeutycznym

Pierwszym przedstawionym w rozprawie podejściem do blokowania PD-L1 na komórkach nowotworowych była próba wykorzystania systemu flagelinowego bakterii *S. Typhimurium* do wydajnej sekrecji białka HAC-V stanowiącego zmodyfikowaną

domenę IgV białka PD-1 o zwiększonym powinowactwie do PD-L1 [439]. Bakterie *S. Typhimurium* są zdolne do kolonizowania tkanki guza w odpowiedzi na znajdujące się w nim silne chemoatraktanty do których należą m.in.: składniki odżywcze uwalniane w wyniku nekrozy komórek nowotworowych. Ponadto, bakterie *Salmonella*, są fakultatywnymi beztlenowcami i tolerują obniżone stężenie tlenu w tkance guza. Badania prowadzone w Zakładzie Biochemii Komórki (ZBchK) WBBIB UJ skupiały się na uzyskaniu takiego szczepu, który zachowałby funkcjonalność i zdolność do akumulowania się i przeżywania w tkance guza i jednocześnie do wydzielania białek terapeutycznych. Zespół kontynuował prace dra Michała Berety, w których wykorzystywano atenuowany szczep VNP20009. Ekspresja scFv rozpoznającego antygen nowotworowy CEA przez te bakterie nasilała ich akumulację w tkankach guzów nowotworowych wykazujących ekspresję CEA [219]. Poprzednie badania zespołu obejmowały próby otrzymania szczepu VNP20009 produkującego białko PD-1 za pomocą T3SS, jednak bez powodzenia. Zaproponowałam wykorzystanie alternatywnego, flagelinowego systemu sekrecyjnego F-T3SS do sekrecji białka terapeutycznego. W tym miejscu warto dodać, że bakterie *S. Typhimurium* dysponują przynajmniej czterema systemami sekrecyjnymi (T1SS, T3SS, T4SS oraz T6SS) [483]. Zdecydowałam się na użycie flagelinowego systemu sekrecyjnego należącego do T3SS ponieważ system ten (i) jest wykorzystywany do efektywnej sekrecji szeregu białek, (ii) których ekspresja podlega ścisłej kontroli podczas składania F-T3SS. System sekrecji F-T3SS bakterii *S. Typhimurium* odpowiada za wydzielanie własnych białek m.in.: FlgM (białko regulatorowe), FlgL (monomer dystalnej części łącznika) czy FlgD (monomer czapeczki haka; Rysunek 4). W ramach pracy, domeny białek FlgL i FlgD oraz pełnej długości FlgM zostały połączone w fuzji genetycznej z białkiem HAC-V. Zakładano, że w tym układzie białka bakteryjne dostarczą sygnałów sekrecyjnych rozpoznawanych przez F-T3SS i spowodują transport HAC-V przez kanał flagelinowy. Hipoteza badawcza zakładała wydajną sekrecję białek fuzyjnych z wykorzystaniem systemu flagelinowego bakterii. Docelowo, białko HAC-V dostarczone do tkanki guza mogłoby oddziaływać z PD-L1 i hamować interakcję z natywnym PD-1 na powierzchni limfocytów, co w założeniu miało doprowadzić do przełamania bariery immunosupresyjnej w tkance nowotworu.

W celu weryfikacji tej hipotezy opracowano modyfikację genetyczną szczepu *S. Typhimurium* VNP20009 prowadzącą do usunięcia genu *fliC*, kodującego białko budujące wic – flagelinę. Ponieważ filament flagelinowy jest zbudowany z ok. 20 000 monomerów białka FliC, a sama wic podlega złuszczeniu i ponownej odbudowie, istniało ryzyko preferencyjnego transportu białek FliC kanałem flagelinowym w stosunku do niewystępujących naturalnie u bakterii białek fuzyjnych FlgM-HAC-V, FlgL-HAC-V czy FlgD-HAC-V [223], [226], [228]. Podejrzenia te zrodziły się podczas pierwszych prowadzonych przeze mnie prób sekrecji zewnątrzkomórkowej domeny PD-1 z użyciem krótkich sekwencji białka FliC, potencjalnie pełniących funkcję sygnałów sekrecyjnych (badania zakończone niepowodzeniem; wyników nie umieszczono w pracy). Moje przypuszczenia potwierdziły w późniejszym czasie doniesienia literaturowe [460]. Dlatego zdecydowałam się usunąć gen kodujący białko FliC z genomu bakterii.

Delecja genu *fliC* nie wpłynęła negatywnie na żywotność bakterii *S. Typhimurium* szczepu VNP20009, jak również nie wywołała zmian w przebiegu krzywej wzrostu hodowli bakteryjnej w porównaniu do bakterii wyjściowych. Usunięcie genu *fliC* spowodowało jednak znaczne obniżenie poziomu zakażenia komórek linii monocytarno-makrofagowej RAW264.7 przez bakterie. Bakterie *Salmonella* produkujące wic zbudowaną z FliC wykazują wyższą zjadliwość niż bakterie z wicią zbudowaną z FljB [484]. Elhadad i wsp. a także Olsen i wsp. wykazali, że obecność wici zbudowanej z FliC nie tylko zwiększa prawdopodobieństwo spotkania bakterii *S. Typhimurium* z komórkami gospodarza w odpowiedzi na chemotaksję, ale również może pełnić kluczową rolę w adhezji do infekowanych komórek, co przekłada się na wydajną inwazję [485], [486]. Prace te potwierdzają obserwowany przeze mnie obniżony poziom zakażenia komórek eukariotycznych przez bakterie pozbawione wici zbudowanej z monomerów FliC. Wpływ obniżonej inwazyjności na skuteczność projektowanej terapii nowotworowej jest trudny do przewidzenia. Jednak ta obserwacja jest istotna z kilku powodów. Obniżona infekcyjność może wydłużyć czas przebywania bakterii w przestrzeni zewnątrzkomórkowej w guzie z jednoczesnym wydłużeniem czasu ekspozycji PD-L1 na wydzielany HAC-V, co znacząco mogłoby poprawić zniesienie immunosupresji. Dodatkowo, wydłużony czas obecności bakterii w tkance guza może je narazić na wzmożone działanie układu immunologicznego. Jak wspomniano w rozdziale 4.6,

obecność bakterii w guzie może doprowadzić do ekspozycji sygnałów niebezpieczeństwa, co z kolei może przyczynić się do przełamania immunosupresji. To z kolei będzie z korzyścią dla terapii przeciwnowotworowej, której celem jest aktywacja układu odpornościowego w tkance guza. Ostatecznie, przy założeniu, że doszło do przełamania immunosupresji i bakterie nie są już dłużej potrzebne w organizmie, korzystnym zjawiskiem byłoby ich niszczenie przez układ odpornościowy [171].

Ciekawe, iż w przypadku bakterii szczepu VNP20009, brak białka FliC nie spowodował obniżonej śmiertelności komórek linii RAW264.7. Spodziewałam się niższego poziomu śmiertelności komórek gospodarza w wyniku (i) niskiej wydajności zakażenia bakteriami VNP20009 Δ fliC w porównaniu do zakażenia bakteriami VNP20009, (ii) braku oddziaływania białka bakteryjnego FliC w cytozolu zakażonych komórek na receptor NLRC4 (ang. *NLR family CARD domain-containing protein 4*), którego aktywacja prowadzi do śmierci komórki na drodze pyroptotycznej [469], [486], [487]. Ponieważ niewielki odsetek komórek został zainfekowany przez bakterie VNP20009 Δ fliC w porównaniu do bakterii VNP20009, a NLRC4 jest receptorem wewnątrzkomórkowym, prawdopodobnie obserwowany efekt cytotoksyczny jest wynikiem działania innego mechanizmu. Cytotoksyczny wpływ bakterii VNP20009 Δ fliC na zakażane komórki powinien pochodzić od bakterii wewnątrzkomórkowych (a nie zewnątrzkomórkowych), ponieważ w wykonanych przeze mnie eksperymentach zewnątrzkomórkowe bakterie były zabijane gentamycyną. Jak pokazuje Miao i wsp. śmierć komórek gospodarza (poprzez aktywację receptora NLRC4) może być indukowana pod wpływem innych elementów bakteryjnych niż wić takich jak białko PrgJ wydzielane przez bakterie *S. Typhimurium* za pomocą NF-T3SS [488]. Istnieją również inne receptory, których aktywacja przez elementy bakteryjne prowadzi do śmierci komórki gospodarza. W dalszym ciągu nie wyjaśnia to jednak, dlaczego prawie niezainfekowane komórki ulegały śmierci. Nie wykluczone, że mogło dochodzić do iniekcji cytotoksycznych białek bakteryjnych do cytoplazmy komórek gospodarza przez zewnątrzkomórkowe bakterie (które pozostawały żywe w pierwszej fazie procedury zakażenia). Niemniej jednak powyższe stwierdzenie nie jest możliwe do weryfikacji bez dalszych badań. W tym miejscu warto dodać, że aktywacja śmierci makrofagów spowodowana fagocytozą martwych bakterii VNP20009 Δ fliC wydaje się być mało

prawdopodobna, ponieważ martwe bakterie nie indukują śmierci makrofagów (pomimo, że martwe bakterie mogą zostać zfagocytowane, co może prowadzić do aktywacji makrofagów) [489]–[491]. Hipoteza badana w ramach rozprawy, zakładała możliwość produkcji i wydajnej sekrecji jednego z białek fuzyjnych FlgM-HAC-V, FlgL-HAC-V lub FlgD-HAC-V w bakteriach *S. Typhimurium* VNP20009 $\Delta fliC$. Białka partnerskie dla HAC-V zostały dobrane w wyniku analizy literatury, by zmaksymalizować szanse powodzenia sekrecji kanałem flagelinowym. W naturalnych warunkach białko FlgM musi zostać wyeksportowane kanałem flagelinowym zanim nastąpi składanie wici. W przeciwnym razie FlgM oddziałuje z cytoplazmatycznym czynnikiem regulującym transkrypcję FliA (sigma28), co prowadzi do zahamowania ekspresji genów klasy III, do których zalicza się m.in.: *fliC*, przez co nie dochodzi do utworzenia wici. Z kolei monomery białka FlgL tworzą dystalny łącznik pomiędzy hakiem a wicią, a białko FlgD odpowiada za utworzenie czapeczki na końcu haka zanim dojdzie do utworzenia łącznika i wici. Wszystkie te białka ze względu na pełnioną funkcję muszą być wyeksportowane na zewnątrz komórki przez system flagelinowy [234], [460], [492]–[494]. W celu uniknięcia zbyt wysokiej produkcji białek fuzyjnych do kontroli ekspresji użyłam promotora laktozowego. Bakterie *S. Typhimurium* utraciły represor laktozowy w toku ewolucji, dzięki czemu ekspresja białek spod promotora laktozowego może zachodzić na stałym, choć niskim poziomie, co zapobiega tworzeniu ciałek inkluzyjnych, powstających w wyniku nadprodukcji białka [472]. Ponadto zastosowanie takiego układu ekspresji nie wymaga indukcji, co miałoby znaczenie w planowanych badaniach *in vivo*.

Białka fuzyjne FlgM-HAC-V, FlgL-HAC-V oraz FlgD-HAC-V ulegają ekspresji w bakteriach *S. Typhimurium* VNP20009 jak i w VNP20009 $\Delta fliC$. Niestety, przeciwieństwo do założeń, białka te nie ulegają transportowi na zewnątrz komórki, a są akumulowane w komórkach i ulegają degradacji. Białko FlgL-HAC-V jest w niewielkim stopniu uwalniane do pożywki przez obydwa szczepy, jednak nie na drodze sekrecji, a w wyniku uwolnienia wraz z zawartością martwych komórek bakteryjnych. Singer i wsp. wykorzystali analogiczny fragment białka FlgD, którego fuzja do β -galaktozydazy prowadziła do wydajnej sekrecji białka fuzyjnego w bakteriach szczepu *S. Typhimurium* LT2 z wprowadzoną delecją genów *flgB* i *flgC* [458]. Delecja *flgB* i *flgC* prowadzi do usunięcia fragmentu periplazmatycznego kanału F-T3SS. Tak ogromna różnica – brak

wydzielania białka FlgD-HAC-V vs wydajne wydzielanie białka FlgD- β -galaktozydaza może wynikać (i) z cech partnera fuzyjnego, którym jest białko ludzkie vs białko bakteryjne, (ii) wprowadzenia do genomów bakteryjnych odmiennych mutacji w genach białek aparatu flagelinowego (*fliC* vs *flgB* i *flgC*) czy (iii) wykorzystania odmiennych szczepów bakteryjnych: atenuowanego VNP20009 wywodzącego się ze szczepu S14028S vs LT2.

Podsumowując, przygotowane konstrukty ekspresyjne nie pozwoliły na uzyskanie wydajnej sekrecji białek fuzyjnych w szczepie VNP20009.

Brak sekrecji poprzez F-T3SS może mieć związek z charakterystyką szczepu VNP20009, którego atenuacja nie została przeprowadzona w sposób kontrolowany, przez co jego genom niesie wiele mutacji, możliwe, iż także w obrębie białek systemu flagelinowego. Mutacje takie, gdyby np. dotyczyły białek F-T3SS, mogłyby negatywnie wpływać na funkcjonalność zaprojektowanego układu [495], [496]. Przykładem wpływu mutacji jest praca Brodway i wsp., która wskazuje, że nawet punktowe mutacje mogą znacząco wpłynąć na poprawne działanie F-T3SS. Autorzy stwierdzili, że punktowa mutacja w obrębie genu *cheY* kodującego białko, które jest odpowiedzialne za zmianę kierunku rotacji rotora F-T3SS, znacznie pogarsza funkcjonowanie systemu flagelinowego bakterii szczepu VNP20009. W tym układzie nawet komplementacja genu *cheY* na plazmidzie nie jest wystarczająca do odtworzenia wyjściowego poziomu ruchliwości [466], [467]. Ponieważ do tej pory w genomie bakterii szczepu VNP20009 rozpoznano przynajmniej 128 przypadkowych delecji oraz co najmniej 50 polimorfizmów SNP (ang. *Single Nucleotide Polymorphism*) [210], [213], nie było wykluczone na etapie planowania dalszej pracy, że to właśnie one mogły wpływać na brak wydzielania zaprojektowanych białek fuzyjnych przez system F-T3SS [210], [213].

Podjęto zatem próbę wykorzystania bakterii *S. Typhimurium* szczepu dzikiego LT2. Analogicznie jak dla szczepu VNP20009, przeprowadziłam procedurę delecji genów *fliC* oraz *fliB* i *flgK* w bakteriach szczepu LT2. Wprowadzenie delecji genu *fliC* w genomie bakterii LT2 nie wpłynęło na żywotność bakterii. Jednocześnie dodatkowe usunięcie genu *flgK* spowodowało obniżenie żywotności o 23% i szybsze osiągnięcie fazy stacjonarnego wzrostu w stosunku do bakterii szczepu LT2 oraz LT2 Δ *fliC*.

Delecja genów *fliC* oraz *fliC* i *flgK* w znaczny sposób osłabiła patogenność bakterii szczepu LT2, co podobnie jak w przypadku bakterii szczepu VNP20009 może być skorelowane z funkcją wici podczas adhezji bakterii do komórki gospodarza [485], [486]. Jednocześnie delecja genu *flgK* nie pogłębia utraty inwazyjności bakterii w stosunku do LT2 $\Delta fliC$, co wskazuje, że FlgK nie pełni w infekcji komórek dodatkowej funkcji, niezależnej od wici. Zmniejszonej infekcyjności towarzyszyła także obniżona śmiertelność zakażonych komórek linii monocytarno-makrofagowej RAW264.7 (o ok. 21% LT2 $\Delta fliC$ vs LT2 oraz o ok. 24% LT2 $\Delta fliC flgK$ vs LT2). Wynik ten potwierdza istotny wpływ wici na zjadliwość bakterii *S. Typhimurium* szczepu LT2. Podobny efekt usunięcia genu *fliC* z genomu bakterii *S. Typhi* oraz *S. Typhimurium* szczepu SL1344 na śmiertelność komórek linii makrofagowych obserwowały inne zespoły badawcze [497], [498]. Negatywny wpływ delecji genu *flgK* na aktywację śmierci makrofagów pochodzenia szpikowego na drodze pyroptozy został udokumentowany przez Miao i wsp., jednak autorzy nie analizowali poziomu ich zakażenia [499].

Zauważono także brak znaczących różnic w poziomie infekcyjności bakterii szczepu LT2 pomiędzy MOI 50 (~65%) i 100 (~70%). Analogicznie, nie obserwowano wyraźnych różnic w poziomie infekcyjności dla bakterii szczepów LT2 $\Delta fliC$ i LT2 $\Delta fliC \Delta flgK$, przy stosowaniu wysokich MOI. Efekt ten został wyjaśniony w pracy Gog i wsp., którzy wykazali, że odsetek zakażonych komórek posiadających tę samą liczbę wewnątrzkomórkowych bakterii *S. Typhimurium* szczepu SL1344 jest porównywalny dla MOI 50 i 100, a ilość zakażonych komórek nie jest wprost proporcjonalna do wzrastającej wartości MOI [475].

Po uzyskaniu wstępnej charakterystyki funkcjonalnej, szczepy bakteryjne LT2 $\Delta fliC$ i LT2 $\Delta fliC \Delta flgK$ zostały przetestowane pod kątem zdolności produkcji i sekrecji białek fuzyjnych FlgM-HAC-V, FlgL-HAC-V oraz FlgD-HAC-V. Przeprowadzone badania potwierdziły sekrecję białka FlgD-HAC-V w bakteriach szczepu LT2 $\Delta fliC \Delta flgK$. Pomimo tego, że wszystkie białka fuzyjne były syntetyzowane we wszystkich szczepach bakteryjnych, jedynie białko FlgD-HAC-V było w pewnym stopniu wydzielane. Najwyższy stopień wydzielania (ok. 50%) zaobserwowano dla bakterii szczepu LT2 z mutacjami $\Delta fliC \Delta flgK$, a więc brak aktywnego białka FlgK ułatwia wydzielanie rekombinowanych białek

przez kanał flagelinowy. Najprawdopodobniej poprzez brak łącznika wici (co wynika z usunięcia genu *flgK*) obecne w dalszym ciągu w bakteriach monomery białka FljB nie są w stanie polimeryzować na szczycie powstałej struktury haka przez co nie dochodzi do utworzenia filamentu wici (Rysunek 4). W tym miejscu należy dodać, że proces składania F-T3SS podlega ścisłej regulacji, a jego geny są podzielone na klasy i ulegają ekspresji na konkretnym etapie tworzenia systemu (ponadto istnieje przynajmniej kilka pętli sprzężeń zwrotnych regulujących aktywność promotorów genów klasy II). W dodatku każda wić na powierzchni bakterii jest składana indywidualnie; poszczególne wici mogą więc być w różnych stadiach tworzenia [476]. Przed naukowcami wciąż jeszcze stoi pytanie: jak delecja poszczególnych genów systemu F-T3SS, należących do różnych klas, wpływa na jego składanie i funkcjonowanie (dotychczasowe badania skupiają się na delecjach tylko niektórych białek). Wiedza taka ułatwiłaby bardziej racjonalne podejście do wykorzystania tego systemu do wydzielania białek rekombinowanych.

Pomimo, że poziom sekrecji FlgD-HAC-V nie był wysoki, to niewykluczone, że przy odpowiedniej optymalizacji byłby wystarczający do wywołania efektu biologicznego w postaci przywrócenia aktywacji limfocytów T. Dalsze badania powinny dotyczyć kilku zagadnień. Po pierwsze należałoby dogłębniej scharakteryzować bakterie LT2 $\Delta fliC \Delta flgK$. Ponieważ usunięcie genów *fliC* i *flgK* może spowodować zmiany w motoryce bakterii należy przetestować, w jaki sposób mutacje te wpływają na ich sposób poruszania się i czy mają wpływ na akumulację w tkankach: w tkance guza oraz w narządach, w których dochodzi do akumulacji bakterii po dożylnym ich podaniu, czyli w wątrobie i śledzionie. Jak donosi Park i wsp. utrata FliC, przy jednoczesnej obecności FljB, nie wywołuje całkowitego zahamowania ruchliwości bakterii (co również zaobserwowałam w swoich badaniach dla szczepu VNP20009; wyników nie zamieszczono w pracy) [500]. Podejrzewam, że utrata ekspresji białka FlgK kodującego łącznik może doprowadzić do całkowitej utraty ruchliwości, ponieważ pomimo obecności flageliny drugiej fazy – FljB, nie będzie możliwe jej zakotwiczenie na wierzchołku haka. Równolegle należy przetestować aktywność biologiczną białka fuzyjnego FlgDHAC-V jako inhibitora kompleksu PD-1/PD-L1 w układzie komórkowym *in vitro*. Gdyby konstrukt nie był w pełni aktywny należałoby wyjaśnić, czy niższa od

spodziewanej aktywność wynika z obecności FlgD czy z nieaktywnej konformacji HAC-V. W kolejnym etapie należałoby zbadać *in vivo*, w mysich modelach nowotworowych, czy akumulacja bakterii w guzach i poziom syntezy oraz sekrecji FlgD-HAC-V przynosiłby oczekiwany efekt terapeutyczny. Trzeba jednak pamiętać, że bakterie LT2 (i ich pochodne np. LT2 $\Delta fliC \Delta flgK$) nie posiadają, w przeciwieństwie do VNP20009, statusu szczepu terapeutycznego, co może rodzić pewne problemy zwłaszcza na etapie badań *in vivo*. Dlatego też w dalszych pracach nad LT2 $\Delta fliC \Delta flgK$ powinno się również zaplanować jego atenuację, którą, w przeciwieństwie do historii uzyskania szczepu VNP20009, osiągnięto by w wyniku wprowadzenia konkretnych, zaprojektowanych mutacji, które w sposób kontrolowany wpływałyby na metabolizm i zjadliwość bakterii.

8.2 Charakterystyka wybranych aptamerów skierowanych przeciwko osi PD-1/PD-L1

Druga część pracy dotyczyła potencjalnego narzędzia terapii przeciwnowotworowej jakim są aptamery. Jak wspomniano w rozdziale 4.8 w przeciwieństwie do białkowych terapeutyków aptamery nie są immunogenne [243]. Aptamery są stosunkowo łatwe do manipulacji, dzięki czemu można stosunkowo szybko uzyskać zoptymalizowaną cząsteczkę o pożądanych cechach. Aptamery mogą być poddawane modyfikacjom, które poprawiają ich właściwości takie jak np.: stabilność struktury, powinowactwo do liganda czy czas półtrwania w organizmie. Ponadto stosując pośredni etap selekcji negatywnej SELEX, można w łatwy sposób znacząco obniżyć zdarzenia niepożądane wynikające z niespecyficznego oddziaływania z innymi białkami, co jest częstym problemem przy zastosowaniu niskocząsteczkowych inhibitorów chemicznych [248], [272], [296]. Z powyższych powodów szereg zespołów prowadzi próby zastosowania aptamerów w klinice.

Jeden z celów pracy zakładał charakterystykę aptamerów ssDNA skierowanych przeciwko osi PD-1/PD-L1 w układzie komórkowym. Opracowane przez dra Malickiego aptamery zostały poddane wstępnym testom potwierdzającym ich zdolności do wiązania białek PD-1 lub PD-L1 za pomocą techniki ELISA. Następnie, otrzymane aptamery tj. L2c2s rozpoznający zewnątrzkomórkową domenę PD-L1 oraz aptamer P2c2s rozpoznający zewnątrzkomórkową domenę PD-1, jak również skrócona jego wersja, p34, zostały poddane badaniom w układzie komórkowym *in vitro*. Badania przedstawione w pracy miały za zadanie określić poziom wiązania receptorów PD-L1

(L2c2s) oraz PD-1 (P2c2s i p34) na powierzchni komórek modelowych, określenie potencjału aptamerów do blokowania tworzenia kompleksu PD-1/PD-L1 w układzie komórkowym jak również ocenę ich cytotoksyczności względem badanych komórek.

Wiązanie aptameru L2c2s z receptorem hPD-L1 na powierzchni komórek aAPC/CHO-K1 było w pewnym stopniu zależne od dawki, jednak sam poziom wiązania L2c2s był stosunkowo niski. Zaobserwowano również pewien stopień niespecyficznego wiązania aptameru L2c2s do powierzchni komórek aAPC/CHO-K1 WT, które nie wykazywały ekspresji hPD-L1. Efekt ten był słabszy w porównaniu do komórek z ekspresją receptora hPD-L1, jednak sugeruje niespecyficzne oddziaływanie L2c2s z powierzchnią komórek. Jednocześnie, zaobserwowano, że L2c2s wiąże się do powierzchni komórek ludzkiego gruczolaka nerki linii 786-0, a oddziaływanie to jest zależne od dawki i znacznie wyższe niż aptameru kontrolnego. Analogiczny wynik został otrzymany dla komórek ludzkiego guza nerki linii Caki-2. Dodatkowe badania realizowane w ramach projektu, które nie zostały zamieszczone w pracy wykazały wiązanie L2c2s do powierzchni komórek ludzkich linii modelowych czerniaka WM115, WM266.4 oraz ludzkiego glejaka wielopostaciowego LN18 (badania były prowadzone przez innych członków zespołu) [501]. Pierwotnie sądzono, że niski poziom wiązania aptameru do komórek aAPC/CHO-K1 hPD-L1 może być po części wynikiem spadku nadekspresji hPD-L1 po kolejnych pasażach komórek obserwowanego w innych eksperymentach. Dlatego, aby zapobiec fałszywie negatywnym wynikom każdorazowo testowano poziom zewnątrzkomórkowego hPD-L1 na powierzchni komórek aAPC/CHO-K1 hPD-L1 bezpośrednio przed testami wiązania L2c2s, co wykluczyło obniżony poziom wiązania wynikający z niewielkiej nadekspresji hPD-L1.

Ponieważ wysoki poziom ekspresji PD-L1 jest charakterystyczny dla niektórych komórek nowotworów pierwotnych [502], [503] jak i metastatycznych [503]–[505] przedstawiony aptamer ssDNA L2c2s może zostać wykorzystany jako narzędzie diagnostyczne w celu identyfikacji komórek z ekspresją powierzchniowego PD-L1. W badaniach innych autorów z zespołu wykazano, że aptamer ssDNA L2c2s jest obserwowany w tkance guza w organizmie myszy. W połączeniu z niską cytotoksycznością może być z powodzeniem podawany do krwioobiegu w celu identyfikacji nowotworowych komórek charakteryzujących się wysoką ekspresją PD-L1.

Równoległe do badania zdolności wiązania aptameru do receptorów powierzchniowych weryfikowano hipotezę dotyczącą zdolności L2c2s do hamowania interakcji PD-1/PD-L1 w układzie komórkowym *in vitro*. Założono, iż pomimo słabego wiązania L2c2s do powierzchni komórek aAPC/CHO-K1 hPD-L1, aptamer będzie wykazywał pewną aktywność inhibitora kompleksu PD-1/PD-L1. W tym celu wykorzystano kokultury komórek aAPC/CHO-K1 hPD-L1 oraz komórek Jurakt T z nadekspresją powierzchniowego PD-1 i genu reporterowego wrażliwego na aktywację szlaku PD-1/PD-L1. Nie zaobserwowano przywrócenia sygnału luminescencji wynikającego z aktywności lucyferazy, która byłaby wyindukowana po dysocjacji kompleksu PD-1/PD-L1. Jedno z możliwych wyjaśnień jest takie, że aptamer L2c2s oddziałuje z takim fragmentem PD-L1, który nie uczestniczy w tworzeniu kompleksu z PD-1. Alternatywnie, powinowactwo aptameru do naturalnego PD-L1 jest znacząco niższe niż powinowactwo PD-1 do PD-L1. Brak aktywności biologicznej aptameru L2c2s nie dyskwalifikuje go jednak z użytku w celach medycznych. Aptamer L2c2s może znaleźć zastosowanie jako narzędzie do obrazowania PD-L1 na powierzchni komórek nowotworowych, wymaga to jednak dalszego potwierdzenia specyficzności uzyskanych molekuł w badaniach *in vitro*. Takie użycie aptameru może znaleźć zastosowanie w diagnostyce nowotworów zwłaszcza, że aptamer nie wykazywał cytotoksycznego wpływu na badane komórki.

W ramach pracy także aptamer P2c2s skierowany przeciwko zewnątrzkomórkowej domenie PD-1 poddano charakterystyce obejmującej badanie jego zdolności do wiązania białka PD-1 w teście ELISA (wykonanym przez dra Malickiego) i badanie jego aktywności w układzie komórkowym *in vitro*. Testowano poziom wiązania P2c2s do powierzchniowego PD-1 komórek Jurkat T typu dzikiego oraz wykazujących nadekspresję PD-1, aktywność biologiczną aptameru jako inhibitora tworzenia kompleksu PD-1/PD-L1 na powierzchni komórek oraz potencjalną cytotoksyczność względem badanych komórek .

Analiza cytofluorymetryczna potwierdziła wiązanie aptameru P2c2s do powierzchniowego receptora PD-1 komórek Jurkat T PD-1. Niewielki stopień wiązania P2c2s do powierzchni komórek Jurkat T WT prawdopodobnie wynika z endogennej ekspresji powierzchniowego PD-1, z którym oddziałuje badany aptamer. Znacznie

silniejszy sygnał fluorescencyjny pochodzący od aptamerów wiążących PD-1 niż od aptameru wiążącego PD-L1 sugeruje, że oddziaływanie aptameru P2c2s ze swoim targetem charakteryzuje się wyższym powinowactwem. Jednakże i ten aptamer, nawet w wysokim stężeniu, nie blokował oddziaływania PD-1 z PD-L1 na powierzchniach komórek, co stwierdzono w teście komórkowym, w którym zniesienie tworzenia kompleksu PD1/PD-L1 prowadziło do ekspresji lucyferazy i pojawienia się sygnału chemiluminescencyjnego. Pierwotnie planowane zastosowanie tego aptameru jako alternatywy dla przeciwciał przeciwko PD-1 hamujących oddziaływanie PD-1 i PD-L1 nie jest więc możliwe. Aptamer ten rozwijano dalej jako narzędzie do obrazowania komórek wykazujących ekspresję PD-1.

W celu poprawy właściwości aptameru P2c2s został on poddany procedurze skracania za pomocą techniki częściowej fragmentacji. Dane literaturowe donoszą, że taka procedura może pozytywnie wpłynąć na zdolność wiązania. W wyniku procedury skracania otrzymano aptamer p34, będący skróconą formą P2c2s, który składał się jedynie z tych fragmentów sekwencji, które są istotne dla przyjęcia przez aptamer struktury zdolnej do interakcji z PD-1. Aptamer P2c2s został skrócony o sekwencję znajdującą się na 3' końcu obejmującą jeden z regionów stałych, umożliwiających amplifikację sekwencji aptamerów; Rysunek S 4). Region stały znajdujący się na 5' końcu sekwencji okazał się być istotny dla utworzenia funkcjonalnej struktury aptameru. Podobnie jak P2c2s, p34 został poddany wstępnej analizie wiązania do PD-1 z użyciem testu ELISA oraz analogicznym testom *in vitro* z wykorzystaniem komórek. Uzyskano analogiczne wyniki jak dla P2c2s. Nie zaobserwowano wpływu na aktywność biologiczną badanego aptameru p34 jako inhibitora kompleksu PD-1/PD-L1 na powierzchni komórek. Stopień powinowactwa obu aptamerów został określony metodą SPR, a otrzymany wynik jednoznacznie wskazywał, że skrócenie P2c2s do p34 doprowadziło do znaczącego wzrostu powinowactwa ($K_{d_{P2c2s}} = 934 \text{ nM}$ vs. $K_{d_{p34}} = 508 \text{ nM}$). Otrzymane wartości K_d wskazują, że aptamery P2c2s i p34 powinny hamować interakcję kompleksu PD-1/PD-L1, którego K_d wynosi $8,2 \text{ }\mu\text{M}$ [419]. Badania przedstawione w 2022 r. przez Rurlioni i wsp. sugerują, że PD-L1 może tworzyć klastry w błonie komórkowej w obrębie tratw lipidowych [506]. Równocześnie istnieją doniesienia, mówiące o tym, że zgrupowanie białek w błonie może prowadzić do obniżenia prawdopodobieństwa

napotkania rozpuszczalnego liganda [507]. Dlatego te informacje mogą wskazywać, że może dochodzić do obniżonego wiązania aptameru przez PD-L1 na rzecz wiązania PD-1 w przedstawionych w pracy testach komórkowych. Niewykluczone również, że badane aptamery oddziałują z takim fragmentem PD-1, który nie uczestniczy w tworzeniu kompleksu z PD-L1.

Proponowanym zastosowaniem dla P2c2s i p34 jest ich wykorzystanie w diagnostyce do obrazowania i w tym kierunku rozwijano dalej prace badawcze, w których nie uczestniczyłam. Wstępne badania, prowadzone w ramach projektu, mające na celu potwierdzić użyteczność aptamerów w obrazowaniu PD-1 zostały przeprowadzone z użyciem kokultury komórek mysiego modelu 3D nowotworu trzustki i mysich limfocytów T. Otrzymane wyniki potwierdziły selektywne wiązanie aptameru p34 do powierzchni komórek Jurkat T PD-1 przy jednoczesnym braku wiązania do komórek tworzących organoid. Powyższe metody charakterystyki aptamerów pozwalają na określenie jedynie ich stopnia wiązania do powierzchni komórek. Otrzymane w ramach projektu wyniki charakterystyki P2c2s i p34 wskazują, że aptamery mogą znaleźć zastosowanie jako sondy do wykrywania komórek wykazujących ekspresję powierzchniowego receptora PD-1. Wybrane badania prowadzone w tym kierunku przez innych członków zespołu oraz wyniki autorki opisano w przygotowanej do druku publikacji pt.: „Development of selective ssDNA micro-probe for PD1 detection as a novel strategy for cancer imaging”.

Przedstawione w pracy aptamery mogłyby również zostać w przyszłości wykorzystane do utworzenia platform multipleksowych wykorzystujących aptamery. Takie zastosowanie aptamerów pozwoliłoby na szybkie wykrywanie PD-L1 lub PD-1 w preparacie, jednocześnie uwzględniając ocenę współekspresji wielu innych markerów. Z kolei tak kompleksowa analiza pozwoliłaby na precyzyjną identyfikację komórek środowiska nowotworowego [508], [509]. W tym miejscu warto dodać, że istnieją także badania potwierdzające ekspresję PD-1 na powierzchni komórek nowotworowych w niektórych typach nowotworów, choć wpływ takiej nadekspresji na rozwój guza nie jest znany takiej nadekspresji na rozwój guza nie jest znany [510]. Dlatego zastosowanie platformy multipleksowej z użyciem aptamerów rozpoznających

PD-1 mogłoby umożliwić obrazowanie komórek z powierzchniowym PD-1 z rozróżnieniem na komórki nowotworowe i limfocyty T.

Choć literatura podaje przykłady aptamerów o powinowactwie do swoich targetów porównywalnym z powinowactwem białkowych partnerów, to w praktyce trudno uzyskać aptamery o wysokim powinowactwie i wysokiej specyficzności do wskazanych targetów [511]. Obecnie coraz częściej postuluje się, że aptamery mają znacznie większy potencjał do użycia w diagnostyce niż w terapii i są obecnie szeroko testowane jako sondy diagnostyczne do obrazowania *in vivo* [512].

Syntetyczne oligonukleotydy, jakimi są cząsteczki aptamerów, mogą być w łatwy sposób poddane modyfikacjom chemicznym. Dzięki temu mogą zostać zaadaptowane do wielu różnych metod obrazowania stosowanych w diagnostyce i monitorowaniu przebiegu choroby nowotworowej takich jak PET (*ang. Positron emission tomography*) czy SPECT (*ang. Single-photon emission computed tomography*), które wykorzystują znaczniki radioizotopowe. Przykład zastosowania aptamerów w diagnostyce przedstawił w 2022 roku Choi i wsp., używając aptamerów wyznakowanych izotopem ^{68}Ga do obrazowania za pomocą metody PET obecności PD-L1 w nowotworach płuc u myszy [513]. Znaczniki radioizotopowe mogą zostać przyłączone do oligonukleotydów za pomocą wielu różnych chelatorów takich jak MAG, DOTA czy NOTA [514]–[516]. Przykładowo Hicke i wsp. zaprezentowali aptamer (rozpoznający tanascynę C) z przyłączonym $^{99\text{m}}\text{Tc}$ za pomocą linkera MAG2-PEG3400, który dodatkowo poprawiał czas półtrwania aptameru w organizmie myszy [517]. Z kolei Wu i wsp. poddali bezpośrednio znakowaniu aptamer (rozpoznający EGFRvIII) za pomocą ^{188}Re [518]. Jednak nadmierna ekspozycja pacjenta na promieniowanie może prowadzić do niepożądanych skutków zdrowotnych. Dlatego aptamery z dołączonym znacznikiem fluorescencyjnym mogłyby okazać się w przyszłości praktyczną alternatywą dla dotychczas stosowanych sond diagnostycznych dzięki ich specyficznemu rozpoznawaniu celów molekularnych [519]. W tym miejscu warto nadmienić, że w ostatnich latach doszło także do rozwoju technik wykorzystujących sondy fluorescencyjne w czasie rzeczywistym *in vivo*. Przykładem jest chirurgia sterowana obrazem podczas której zastosowanie obrazowania za pomocą sond fluorescencyjnych pozwala na zlokalizowanie np. tkanki guza dzięki wyświetlaniu jej lokalizacji i orientacji w czasie rzeczywistym. To z kolei umożliwia bardziej precyzyjne

kierowanie procedurą w trakcie jej trwania, co m.in.: zwiększa bezpieczeństwo pacjenta [508]. W tym ujęciu, białko PD-L1, którego ekspresja towarzyszy wielu typom nowotworów zdaje się być odpowiednim targetem, przeciwko któremu opracowuje się kolejne aptamery o potencjalnie diagnostycznym [502]–[505].

W przypadku nowotworów jest to o tyle istotne, że diagnostyka nie opiera się jedynie na badaniach morfologii ale również barwieniu immunohistochemicznym w celu wizualizacji biomarkerów nowotworowych. Oznaczenie poziomu ekspresji PD-L1 na powierzchni komórek nowotworowych może mieć wpływ na podjęcie dalszych decyzji dotyczących leczenia np. przy stwierdzeniu wysokiego poziomu PD-L1 może wskazywać na zasadność terapii przeciwciałami blokującymi interakcję PD-1/PD-L1. Dlatego nowe podejście do szybkiego, nieinwazyjnego obrazowania *in vivo* ekspresji biomarkera nowotworowego PD-L1 może okazać się nieocenione podczas kwalifikacji do terapii. Odpowiednio zoptymalizowane aptamery wykazują również niski próg detekcji, dlatego mogą być wykorzystane do wykrywania niewielkiej ilości materiału biologicznego w próbce [282], co dodatkowo może umożliwić wczesne wykrywanie np. nawrotu choroby. Osadzone na nośniku aptamery mogą z powodzeniem służyć do eksperymentów opartych na technice ELONA (ang. *Enzyme-linked oligonucleotide assay*) [520]. Taki preparat potencjalnie może posłużyć w celach diagnostycznych np. do wykrywania rozpuszczalnego PD-L1 znajdującego się w krwi [521], [522]. Ponadto, aptamery mogą zostać wykorzystane do obrazowania PD-L1 w badaniach *in vitro*, co zostało przedstawione przez Bauer i wsp., którzy zastosowali aptamery do barwienia preparatów histopatologicznych, a czas trwania procedury był znacznie krótszy w stosunku do barwienia przeciwciałami (~1 h vs ~24 h) [520].

Wybrane badania prowadzone w tym kierunku przez innych członków zespołu oraz wyniki autorki opisano w publikacji pt.: „Imaging of Clear Cell Renal Carcinoma with Immune Checkpoint Targeting Aptamer-Based Probe” [501].

Badania ostatnich lat skupiają się również na analizie środowiska immunologicznego nowotworów, w tym limfocytów T naciekających tkankę nowotworu [523]–[528]. Limfocyty T ekspozując PD-1 na swojej powierzchni często ulegają inaktywacji w tkance guza, co jest związane z nadekspresją PD-L1 (tak jak opisano w rozdziale 4.2) [59], [529]. Ren i wsp. donoszą, że analiza obecności PD-1 na powierzchni limfocytów infiltrujących

tkankę guza, a nie obecność PD-L1 na powierzchni komórek nowotworowych, jest istotna przy określeniu prognozy i przebiegu terapii podczas leczenia potrójnie ujemnego raka piersi [530]. Dlatego ocena jakościowo-ilościowa limfocytów T obecnych w próbkach histopatologicznych tkanek guzów nowotworowych może dostarczyć dodatkowych informacji pozwalających na przewidywanie odpowiedzi na zastosowaną terapię. W takim celu mógłby zostać użyty aptamer P2c2s lub p34 rozpoznający PD-1 na powierzchni komórek. Dla oszacowania możliwości zastosowania w diagnostyce, aptamery te w pierwszej kolejności powinny być poddane wstępnej ocenie profilu farmakokinetycznego i farmakodynamicznego w badaniach *in vivo*. Wstępna ocena właściwości P2c2s i p34 w żywym organizmie pozwoliłaby zaplanować dalszy przebieg modyfikacji aptamerów w celu poprawienia ich właściwości.

Obecnie obrazowanie ekspresji PD-1 na powierzchni limfocytów T nie ogranicza się do badań dotyczących chorób nowotworowych i jest wykorzystywane do analiz przebiegu chorób zakaźnych i autoimmunologicznych. W przewlekłych infekcjach trwała ekspozycja na antygen prowadzi do konstytutywnej produkcji PD-1. Białko kontroli odpowiedzi immunologicznej PD-1 obniża aktywność limfocytów T podczas przewlekłych stanów zapalnych, co zapobiega uszkodzeniu własnych tkanek poprzez zahamowanie odpowiedzi immunologicznej, ale z kolei może ograniczyć usuwanie patogenów [531]. W przełomowej pracy, Blackburn i wsp. stwierdzili, że u myszy z chroniczną infekcją wirusem LCMV (ang. *Lymphocytic choriomeningitis murrenavirus*), ekspresja PD-1 na powierzchni limfocytów T jest na wyższym poziomie i utrzymuje się dłużej niż u myszy z ostrym i krótkim przebiegiem zakażenia. Ponadto autorzy wykazali także, że równoczesne zablokowanie receptorów PD-1 i LAG-3 prowadzi do wzmożenia odpowiedzi immunologicznej skutkującej zmniejszeniem miana wirusa *in vivo* [532]. Szereg badań potwierdziło przywrócenie funkcji efektorowych limfocytów T w wyniku zablokowania PD-1 w wielu modelach infekcji wirusowych, bakteryjnych i pasożytniczych [531]. W przeciwieństwie do mechanizmów zwalczania infekcji, wyczerpanie limfocytów T w wyniku aktywacji powierzchniowego PD-1 daje korzystne prognozy w chorobach autoimmunologicznych, np. w stwardnieniu rozsianym [533]. W tym ujęciu śledzenie zmian ekspresji PD-1 jako markera zubożenia funkcji limfocytów T w tkankach może być ważne w monitorowaniu odpowiedzi na terapie

blokujące PD-1 w przewlekłych infekcjach i chorobach autoimmunologicznych. Dlatego, znaczenie nowych metod detekcji PD-L i PD-1 nie ogranicza się jedynie do zmian nowotworowych i w przyszłości, po odpowiedniej optymalizacji mogą one znaleźć bardzo szerokie zastosowanie w diagnostyce [534].

8.3 Charakterystyka biochemiczna i strukturalna makrocyklicznego peptydu p104 będącego antagonistą interakcji PD-1/PD-L1

Ostatnią zaproponowaną w rozprawie doktorskiej strategią hamowania interakcji PD-1/PD-L1 było wykorzystanie peptydu makrocyklicznego oddziałującego z PD-L1. Jak wspomniano w rozdziale 4.13 makrocykliczne peptydy znalazły do tej pory bardzo szerokie zastosowanie jako terapeutyki. Makrocykliczne peptydy łączą w sobie pewne cechy zarówno inhibitorów niskocząsteczkowych jak i przeciwciał, co również powoduje, że stają się coraz bardziej atrakcyjnym narzędziem terapeutycznym. Za najważniejsze zalety makrocyklicznych peptydów uważa się m.in.: ich wysokie powinowactwo niekiedy porównywalne do przeciwciał jak również wysoką selektywność wiązania. Z kolei w porównaniu do niskocząsteczkowych inhibitorów chemicznych, są one znacznie bardziej skuteczne w hamowaniu PPI (w rozumieniu interakcji typu powierzchnia-powierzchnia; rozdział 4.10). Ponadto są otrzymywane w wyniku syntezy, co ogranicza koszty produkcji oraz ułatwia ich modyfikacje.

Przedstawiony w pracy makrocykliczny peptyd p104 należy do klasy III makrocyklicznych peptydów BMS. Klasa III makrocyklicznych peptydów BMS jest słabo poznana, a przed podjęciem badań przedstawionych w pracy jedynym scharakteryzowanym reprezentantem był peptyd p101 [398]. Peptyd p101 wykazywał bifurkację sposobu wiązania do PD-L1 w jedynej dostępnej, w momencie rozpoczęcia tych prac, strukturze krystalograficznej. Ze względu na ograniczoną ilość informacji strukturalnych o peptydach klasy III, obserwacja ta była trudna do wyjaśnienia. Dlatego celem mojej pracy było scharakteryzowanie kolejnego peptydu klasy III BMS oraz zbadanie hipotezy czy bifurkacja oddziaływania tej klasy makrocyklicznych peptydów jest powszechna. Peptyd p104 został wytypowany do badań na podstawie analizy powinowactwa peptydów znajdujących się w bibliotece makrocyklicznych peptydów BMS oddziałujących z PD-L1. Peptydy p101 i p104 wykazują znaczące podobieństwo sekwencji, jednak różni je zdolność do hamowania tworzenia kompleksu PD-1/PD-L1.

Podczas pomiaru powinowactwa peptydów metodą HTRF przeprowadzonego przez firmę Bristol Meyers Squibb wykazano, że zmiana aminokwasów w pozycjach $_{101}\text{Ile3}$ na $_{104}\text{Phe3}$ oraz $_{101}\text{Phe2}$ na $_{104}\text{Leu2}$ powodowała znaczący spadek powinowactwa p104 ($K_d = 380 \text{ nM}$) w porównaniu do p101 ($K_d = 120 \text{ nM}$) [331]. Dlatego założono, że sekwencje p101 i p104 różnią się od siebie wystarczająco, aby tworzyć odmienny sposób wiązania PD-L1, a jednocześnie są do siebie na tyle podobne, aby umożliwić analizę porównawczą kompleksów jakie tworzą z PD-L1.

Interakcja peptydu p104 z białkiem PD-L1 została wstępnie potwierdzona przez miareczkowanie NMR. Otrzymane widma ^1H NMR oraz ^1H - ^{15}N SOFAST HSQC wykazywały zmiany przesunięć chemicznych sygnałów rezonansowych w porównaniu do próby kontrolnej białka PD-L1, co jednoznacznie wskazywało na tworzenie kompleksu PD-L1/p104. Podczas analiz dwuwymiarowego widma ^1H - ^{15}N SOFAST HSQC NMR badanego kompleksu nie zaobserwowano podwojenia sygnałów, które świadczyłyby o podwójnej konformacji kompleksu w roztworze. W swojej pracy Magiera-Mularz i wsp. wykazali, że bifurkacja kompleksu PD-L1/p101 nie była widoczna podczas analizy widm NMR, a ostatecznie została potwierdzona po rozwiązaniu struktury kompleksu PD-L1/p101 [398].

Wstępna analiza strukturalna kompleksu PD-L1/p104 wykazała, że p104 zajmuje to samo miejsce wiązania na powierzchni PD-L1, które jest okupowane przez PD-1, co tłumaczy zdolność peptydu do hamowania tworzenia kompleksu PD-1/PD-L1 (Rysunek 37).

Podczas rozwiązywania struktury nie zaobserwowano obecności gęstości elektronowej, która wskazywałaby na podwójny sposób wiązania p104 do PD-L1. Jedynie gęstość elektronowa reszty $_{\text{PD-L1}}\text{Tyr56}$ białka PD-L1, która nie bierze udziału w wiązaniu peptydu, wskazuje na występowanie dwóch konformacji łańcucha bocznego tego aminokwasu. Jednak jest to wyjątek w strukturze (skądinąd sytuacja nierzadka w strukturach krystalograficznych) i nie odnotowano innych reszt aminokwasowych białka PD-L1, które występują w dwóch konformacjach.

Analiza porównawcza obu kompleksów PD-1/PD-L1 i PD-L1/p104 wykazała, że trzy kieszenie wiążące na powierzchni PD-L1 obecne podczas tworzenia kompleksu

PD-1/PD-L1 są również obecne podczas interakcji p104 z PD-L1. Szczegółowa analiza ujawniła, że niektóre reszty aminokwasowe peptydu naśladują część oddziaływań obecnych w kompleksie PD-1/PD-L1 w obrębie każdej z kieszeni wiążących, wykazując jednocześnie pewne różnice strukturalne. Analiza struktur wykazała ponadto, że pomimo iż miejsce wiązania p104 jest analogiczne do miejsca wiązania PD-1 na powierzchni PD-L1, to tylko niektóre z oddziaływań w obrębie każdej z kieszeni wiążących są imitowane przez p104 podczas jego wiązania. Ostatecznie pokrywanie się powierzchni interakcji PD-1/PD-L1 i PD-L1/p104 oraz imitowanie niektórych interakcji wskazuje, że p104 jest kompetycyjnym inhibitorem kompleksu PD-1/PD-L1.

Główne pytanie tej części pracy brzmiało czy p104 wykazuje bifurkację wiązania do PD-L1, która była widoczna podczas tworzenia kompleksu PD-L1/p101. Nie zaobserwowano podwójnego sposobu wiązania p104 z PD-L1. Analiza kompleksów PD-L1/p104 i PD-L1/p101 pozwoliła określić podobieństwa natury interakcji zaangażowanych w wiązanie p104 i p101, będących bliskimi analogami. Co ciekawe, porównując struktury peptydów p104 oraz alternatywnych konformacji p101a i p101b w kompleksie z PD-L1 zaobserwowano, że łańcuch główny p104 znajduje się dokładnie pomiędzy orientacjami łańcucha głównego obu konformacji p101 [398].

Kluczową rolę w wiązaniu obu peptydów pełni ${}_{PD-L1}Met115$, która to reszta oddziałuje z pierścieniem aromatycznym pochodzącym od ${}_{104}Phe10$ lub ${}_{101}Phe10$ za pomocą wiązania π -alkil. Odnotowano znaczącą różnicę w postaci dodatkowego stabilizowania łańcucha bocznego ${}_{PD-L1}Met115$ wiązaniem π -siarka z ${}_{104}Phe3$ [398]. Wiązanie π -siarka zostało wcześniej zaobserwowane tylko w jednym przypadku makrocyklicznych peptydów BMS, a mianowicie podczas oddziaływania PD-L1 z makrocyklicznym peptydem p71 należącym do klasy II [418]. Analogiem tej interakcji może być oddziaływanie π -alkil reszt ${}_{101a}Ile3$ i ${}_{PD-L1}Met115$ podczas wiązania konformacji p101a do PD-L1. Podczas analizy struktur krystalicznych zaobserwowano więcej podobieństw w sposobie oddziaływania p104 i p101a. Największa ilość interakcji była tworzona przez p101b podczas oddziaływania z PD-L1, a część z nich nie jest obecna podczas wiązania p101a i p104. Strukturalna analiza porównawcza ujawniała, że mechanizm interakcji p104 z PD-L1 łączy w sobie niektóre mechanizmy wiązania obu konformacji p101 ze znacznym podobieństwem do interakcji PD-L1/p101a. Ponieważ

wcześniej wykazano niższą zdolność p104 do hamowania tworzenia kompleksu PD-1/PD-L1 metodą HTRF w porównaniu do p101, a analiza p104 i obu konformacji p101 wskazuje na większe podobieństwo do konformacji p101a, to najprawdopodobniej za wyższe powinowactwo p101 do PD-L1 odpowiada konformacja p101b[331], [398].

Analiza przedstawiona w niniejszej pracy wykazała, że bifurkacja nie jest cechą charakterystyczną dla wszystkich makrocyklicznych peptydów klasy III BMS. Jednak w dalszym ciągu pytanie czy cecha ta jest powszechna wśród peptydów BMS klasy III pozostaje bez odpowiedzi wobec jedynie dwóch dostępnych struktur krystalograficznych. W celu poznania odpowiedzi należałoby podjąć badania strukturalne kolejnych peptydów klasy III w kompleksie z PD-L1. Jednym z nich może być makrocykliczny peptyd p115. Analizując powinowactwo peptydów p101 ($K_d = 120$ nM), p104 ($K_d = 380$ nM) i p115 ($K_d = 360$ nM) oraz ich sekwencję można zauważyć, że p115 najprawdopodobniej stanowi pewną formę „pośrednią” pomiędzy p101 i p104 (Rysunek S 4). Z analizy sekwencji wynika, że zamiana tylko jednej reszty $_{101}\text{Ile}3$ peptydu na $_{115}\text{Leu}3$, może obniżyć powinowactwo inhibitora do PD-L1. Z kolei zastąpienie $_{115}\text{Leu}3$ resztą $_{101}\text{Ile}3$ generuje dwukrotny wzrost powinowactwa peptydu do PD-L1 [331], [398].

Rozwinięcie charakterystyki strukturalnej makrocyklicznych peptydów klasy III o kolejne przykłady z pewnością umożliwiłoby lepsze poznanie całej grupy inhibitorów. Wiedza ta jest o tyle istotna, że klasa III BMS, w odróżnieniu od klasy I i II, zawiera makrocykliczne peptydy zbudowane jedynie z aminokwasów białkowych. Dzięki temu ich potencjalne zastosowanie terapeutyczne ma jeszcze jedną zaletę, a mianowicie naturalne dla organizmu metabolity. Ponadto, jak pokazano w pracy, peptyd p104 wykazuje pewne podobieństwo w wiązaniu PD-L1 do p71 należącego do klasy II, który charakteryzował się silnym powinowactwem do PD-L1 (7 nM). Niewykluczone, że niektóre z kolejnych peptydów klasy III, podobnie jak p104, także mogą naśladować niektóre interakcje p71 czy peptydu klasy I, p57, z PD-L1. Wiedza na temat takich wiązań mogłaby zostać wykorzystana przy projektowaniu nowych makrocyklicznych peptydów klasy III o znacznie wyższym powinowactwie[331], [418].

Jako ostatnie zweryfikowano założenie, że peptyd p104 jest w stanie hamować utworzenie kompleksu PD-1/PD-L1 w układzie komórkowym w badaniach *in vitro*, co w konsekwencji może prowadzić do efektu biologicznego – reaktywacji limfocytów T.

W wyniku przeprowadzonych testów wykazano, że peptyd p104 posiada zależną od dawki aktywność inhibitora PD-1/PD-L1 oraz nie wykazuje cytotoksycznego wpływu na badane komórki. Powinowactwo peptydu p104 ($K_d = 380 \text{ nM}$) do PD-L1 jest wyższe w porównaniu do powinowactwa białka PD-1 ($K_d=8,2 \mu\text{M}$), co wskazuje, że p104 hamuje interakcję PD-1/PD-L1. Niemniej jednak skuteczność zahamowania tworzenia kompleksu PD-1/PD-L1 w układzie komórkowym jest dwa razy mniejsza w porównaniu do p101 ($K_d=120 \text{ nM}$) [331]. Zaobserwowano, że pomimo znacznie niższej aktywności biologicznej p104 w porównaniu do kontrolnego przeciwciała terapeutycznego Atezolizumabu, wyrażonej współczynnikiem EC_{50} ($15,2\pm 2,7 \mu\text{M}$ vs $3,4\pm 0,2 \text{ nM}$), otrzymane wyniki charakteryzujące p104 wskazują na potencjał makrocyklicznych peptydów BMS klasy III jako związków wykazujących efekt biologiczny. Jednak, przedstawione wyniki pokazują, że niezbędna jest dalsza charakterystyka peptydów klasy III BMS oraz ich dalsza optymalizacja prowadząca do zwiększenia ich aktywności biologicznej. Przykładem optymalizacji makrocyklicznych peptydów BMS jest peptyd JMPDP-027, będący analogiem p71. Peptyd JMPDP-027 został otrzymany z użyciem komputerowych metod wspomaganego projektowania leków CADD (ang. *Computer-aided Drug Design*) poprzez mutowanie pojedynczych reszt p71. Otrzymany peptyd wykazywał przeciwnowotworową aktywność w badaniach z użyciem mysiego nowotworu jelita grubego [535]. Zastosowanie CADD do optymalizacji makrocyklicznych peptydów klasy III BMS pozwoliłoby przetestować szereg modyfikacji, które mogłyby znacząco poprawić ich powinowactwo do PD-L1.

Podsumowując, charakterystyka makrocyklicznego peptydu BMS klasy III, p104, pozwoliła określić naturę jego interakcji z białkiem PD-L1 w utworzonym kompleksie, jak i wskazać kluczowe miejsca kontaktu na powierzchni białka. Analiza struktury ujawniła pewne podobieństwa do p101, co częściowo pozwoliło określić cechy wspólne dla peptydów klasy III. Poznanie struktury kompleksu PD-L1/p104 ujawniło, że bifurkacja wiązania nie jest cechą charakterystyczną dla wszystkich makrocyklicznych peptydów klasy III BMS. W dalszym ciągu niezbędne są badania nad kolejnymi peptydami tej klasy w celu jej całkowitej charakterystyki i określenia czy podwójny mechanizm wiązania PD-L1 jest cechą charakterystyczną dla peptydów BMS klasy III (z wyjątkiem p104), a jeśli tak to z czego wynika. Szczegółowe poznanie molekularnych podstaw oddziaływania

tych peptydów z PD-L1 może przynieść korzyści przy dalszym projektowaniu coraz to nowszych makrocyklicznych peptydów zbudowanych jedynie z aminokwasów białkowych, które z powodzeniem mogą pełnić funkcję inhibitorów osi PD-1/PD-L1. Dlatego poznanie struktury kompleksu p104 z PD-L1 wraz z analizą efektu biologicznego wzbogacone o analizę porównawczą kolejnych inhibitorów peptydowych BMS klasy III otworzy nowe możliwości projektowania terapeutycznych peptydów skierowanych przeciwko osi PD-1/PD-L1

9. Załączniki

Legenda:

NdeI **HindIII** **AfeI** **EcoRI** **Kodon START** **Kodon STOP** **Sekwencja sekrecyjna**

Linker+metka FLAG **HAC-V**

FlgL-HAC-V:

```
CATATGCGTATCAGTACCCAGATGATGTACGAACAAAATATGAGCGGCATCACTAATTCTCAGGCCGAAT
GGATGAAGCTGGGCGAGCAGATGTCTACCGTAAGCGGTTACCAACCCATCTGACGATCCGATCGCCGC
GTCGCAGGCGGTAGTACTCTCTCAGGCGCAGGCGCAGAATAGCCAGTACGCCCTGGCGCGTACGTTTGCC
ACCCAAAAAGTGTGCTGGAAGAAAGCGTACTCAGTACAGGTGACGACGGCGATTCAAACCGCGCAGGAAA
AAATCGTCTATGCCGAAACGGCAAGCTTAGCCCGGCATTAGCGGCGGCGGCGGCATTGATTACAA
GGATGACGACGATAAGAGCGCTGATAGCCCGGATCGCCCGTGGAACCCGCCGACCTTTAGCCCGGCGCTG
CTGGTGGTGACCGAAGGCGATAACGCGACCTTTACCTGCAGCTTTAGCAACACCAGCGAAAGCTTTCATG
TGGTGTGGCATCGCGAAAGCCCGAGCGGCCAGACCGATACCCTGGCGGCGTTTCCGGAAGATCGCAGCCA
GCCGGGCCAGGATGCGCGCTTTCGCGTGACCCAGCTGCCGAACGGCCGCGATTTTCATATGAGCGTGGTG
CGCGCGCGCCGAACGATAGCGGCACCTATGTGTGCGGCGTGATTAGCCTGGCGCCGAAAATTCAGATTA
AAGAAAGCCTGCGCGCGGAACTGCGCGTGACCGAACGCTAAGAATTC
```

FlgD-HAC-V:

```
CATATGTCTATTGCCGTAAATATGAATGACCCGACCAACACGGGCGTCAAACGACGACCGGCAGCGGAT
CGATGACCGGAAGCAACGCTGCCGATCTGCAAAGCAGTTTCTGACCTTACTGGTCGCGCAATTGAAGAA
CCAGGACCCGACTAACCATTACAAAAAATAGATTAACGACACAGTTGGCGCAAATCAGTACCGTGAGC
GGCATTGAAAAACTGAATACGACGCTGGGGGCTATTTCCGGGCAAATCGATAATAGTCAGTCCCTACAGG
CGACCACGCTGATTGGACATGGCAAGCTTAGCCCGGCATTAGCGGCGGCGGCGGCATTGATTACAA
GGATGACGACGATAAGAGCGCTGATAGCCCGGATCGCCCGTGGAACCCGCCGACCTTTAGCCCGGCGCTG
CTGGTGGTGACCGAAGGCGATAACGCGACCTTTACCTGCAGCTTTAGCAACACCAGCGAAAGCTTTCATG
TGGTGTGGCATCGCGAAAGCCCGAGCGGCCAGACCGATACCCTGGCGGCGTTTCCGGAAGATCGCAGCCA
GCCGGGCCAGGATGCGCGCTTTCGCGTGACCCAGCTGCCGAACGGCCGCGATTTTCATATGAGCGTGGTG
CGCGCGCGCCGAACGATAGCGGCACCTATGTGTGCGGCGTGATTAGCCTGGCGCCGAAAATTCAGATTA
AAGAAAGCCTGCGCGCGGAACTGCGCGTGACCGAACGCTAAGAATTC
```

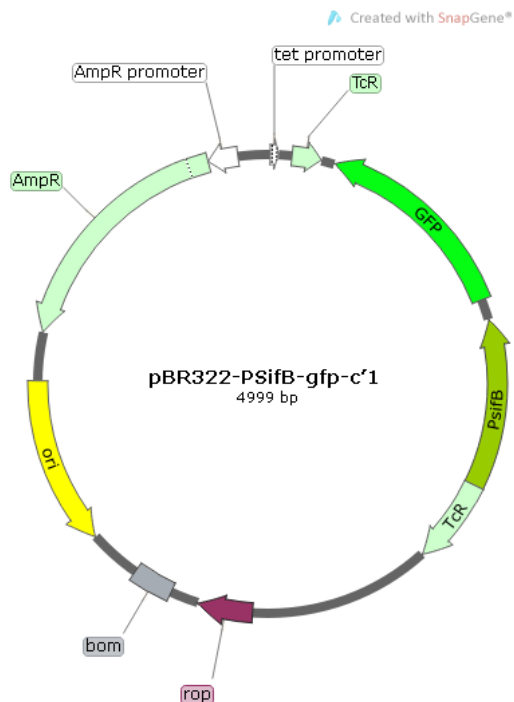
FlgM-HAC-V:

```
CATATGAGCATTGACCGTACCTCACCTTTGAAACCCGTTAGCACTGTCCAGACGCGGAAACAGCGACA
CGCCGGTACAAAAACGCGTCAGGAAAAACGTCGCCCGGACGAGCGCCAGCGTAACGTTAAGCGACGC
GCAAGCGAAGCTCATGCAGCCAGGCGTACGCGACATTAATATGGAACGCGTGAAGCATTAAAAACGGCT
ATCCGTAACGGTGAGTTAAAAATGGATACGGGAAAAATAGCAGACTCGTCATTCGCGAGGCGCAGAGCT
ACTTACAGAGTAAATATAAGCTTAGCCCGGCATTAGCGGCGGCGGCGGCATTGATTACAAGGATGA
CGACGATAAGAGCGCTGATAGCCCGGATCGCCCGTGGAACCCGCCGACCTTTAGCCCGGCGCTGCTGGTG
GTGACCGAAGGCGATAACGCGACCTTTACCTGCAGCTTTAGCAACACCAGCGAAAGCTTTCATGTGGTGT
GGCATCGCGAAAGCCCGAGCGGCCAGACCGATACCCTGGCGGCGTTTCCGGAAGATCGCAGCCAGCCGGG
CCAGGATGCGCGCTTTCGCGTGACCCAGCTGCCGAACGGCCGCGATTTTCATATGAGCGTGGTGCGCGCG
CGCCGAACGATAGCGGCACCTATGTGTGCGGCGTGATTAGCCTGGCGCCGAAAATTCAGATTAAGAAA
GCCTGCGCGCGGAACTGCGCGTGACCGAACGCTAAGAATTC
```

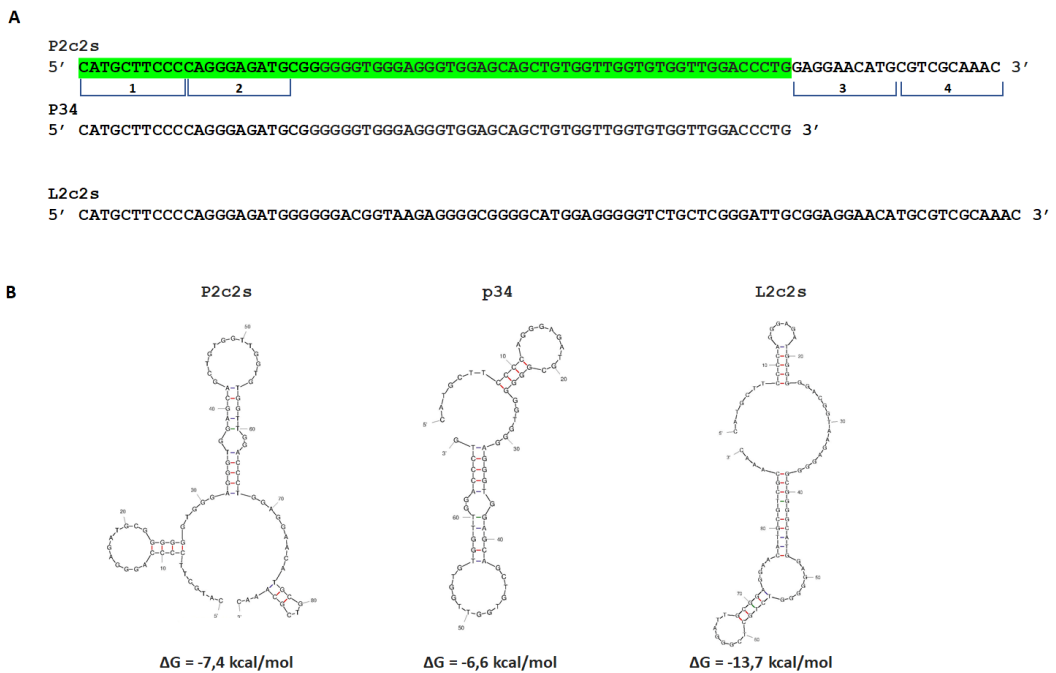
Rysunek S 1. Sekwencje nukleotydowe kaset sekrecyjnych FlgL-HAC-V, FlgD-HAC-V i FlgM-HAC-V.

HAC-V	1	-----DSPDRPWNPPTFSPALLVTEGDNA	25
PDCD1_HUMAN	1	MQIQAPWPVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVTEGDNA	50
HAC-V	26	TFTCSFSNTSESFHVVWHRESPSGQTDTLAAFPEDRSQPGQDARFRVTQL	75
PDCD1_HUMAN	51	TFTCSFSNTSESFVLNWRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQL	100
HAC-V	76	PNGRDFHMSVWRARRNDSGTIVCGVISLAPKIQIKESLRAELRVTER---	122
PDCD1_HUMAN	101	PNGRDFHMSVWRARRNDSGTLYCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAE	150
HAC-V	123	-----	122
PDCD1_HUMAN	151	VPTAHPSPSPRPAQQT LWGVVGGLLGS LVLVWVLAVIC SRAARGTI	200
HAC-V	123	-----	122
PDCD1_HUMAN	201	GARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGE LDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYAT	250
HAC-V	123	-----	122
PDCD1_HUMAN	251	IVFPSSGSGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL	288

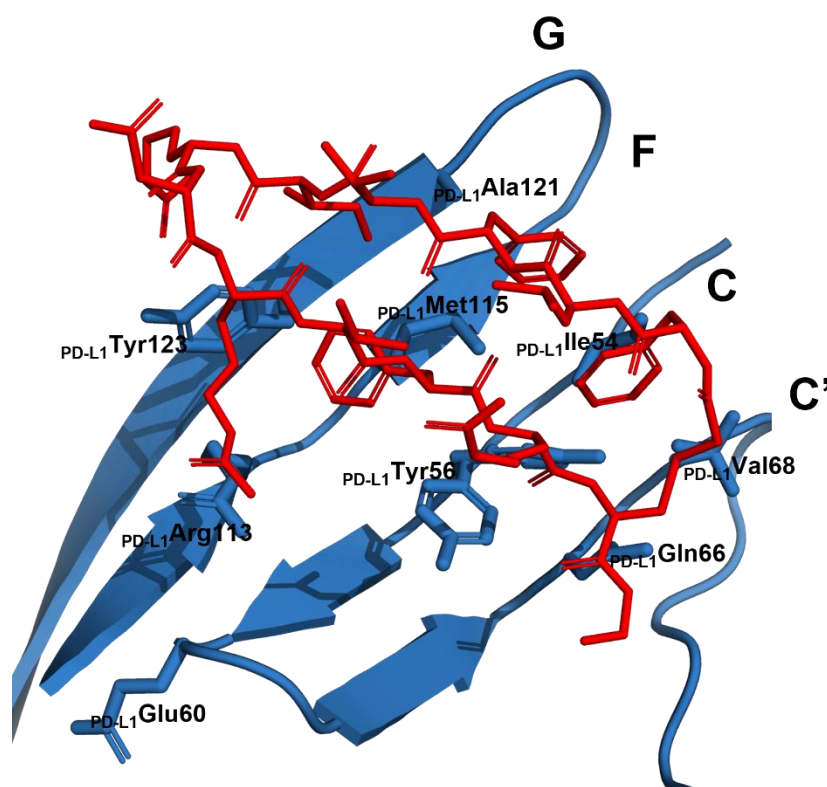
Rysunek S 2. Porównanie sekwencji zmodyfikowanego białka HAC-V i ludzkiego PD-1. Analiza porównawcza została wykonana za pomocą narzędzia Emboss nedlee. Sekwencję ludzkiego PD-1 pozyskano z bazy UniProt oznaczonej numerem Q15116.



Rysunek S 3. Mapa plazmidu pBR322-PSifB-gfp-c'1 użytego do badania poziomu zakażenia komórek eukariotycznych.



Rysunek S 4. Aptamery poddane charakterystyce w ramach przedstawionej pracy. Sekwencje nukleotydowe aptamerów anty PD-1 P2c2s i p34 oraz anty-PD-L1 L2c2s; kolorem zielonym zaznaczono nukleotydy występujące zarówno w sekwencji P2c2s i p34 (A). Struktury aptamerów wyznaczone za pomocą programu mFold; The UNSAFold Web Server z uwzględnieniem entalpii swobodnej Gibbsa [536], [537].



Rysunek S 5. Miejsce wiązania makrocyklicznego peptydu p104. Peptyd p104 (czerwony) wiąże PD-L1 w obrębie β -arkusza składającego się z łańcuchów G, F, C i C'. Na rysunku wskazano niektóre z reszt aminokwasowych znajdujących się w obrębie poszczególnych łańcuchów.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
p101	F	F	I	V	I	R	D	R	V	F	R	C	G	p101 Kd =120 nM
p104	F	L	F	V	I	R	D	R	V	F	R	C	G	p104 Kd =380 nM
p115	F	F	L	V	I	R	D	R	V	F	R	C	G	p115 Kd =360 nM

Rysunek S 6. Porównanie sekwencji wybranych makrocyklicznych peptydów klasy III wraz z powinowactwem (Kd). Peptyd p104 będący obiektem badań niniejszej pracy, p101 wykazujący nietypowy podwójny sposób wiązania PD-L1 oraz p115, który wykazuje wysoki stopień podobieństwa do p104 jak i p101.

Literatura

- [1] S. M. Burnet, "Cancer - A biological approach," *Br Med J*, vol. 1, 1957, doi: 10.1016/S0140-6736(57)91911-6.
- [2] G. P. Dunn, A. T. Bruce, H. Ikeda, L. J. Old, and R. D. Schreiber, "Cancer immunoediting: From immunosurveillance to tumor escape," *Nat Immunol*, vol. 3, no. 11, pp. 991–998, 2002, doi: 10.1038/NI1102-991.
- [3] V. Shankaran *et al.*, "IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity," *Nature*, vol. 410, no. 6832, pp. 1107–1111, Apr. 2001, doi: 10.1038/35074122.
- [4] G. P. Dunn, C. M. Koebel, and R. D. Schreiber, "Interferons, immunity and cancer immunoediting," *Nature Reviews Immunology*, vol. 6, no. 11, pp. 836–848, Nov. 13, 2006. doi: 10.1038/nri1961.
- [5] C. M. Koebel *et al.*, "Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state," *Nature*, vol. 450, no. 7171, 2007, doi: 10.1038/nature06309.
- [6] R. M. MacKie, R. Reid, and B. Junor, "Fatal Melanoma Transferred in a Donated Kidney 16 Years after Melanoma Surgery," *New England Journal of Medicine*, vol. 348, no. 6, pp. 567–568, Feb. 2003, doi: 10.1056/NEJM200302063480620.
- [7] B. J. Kubick, X. Fan, A. Crouch, R. McCarthy, and D. R. Roop, "Tracing the Equilibrium Phase of Cancer Immunoediting in Epidermal Neoplasms via Longitudinal, Intravital Imaging," *J Invest Dermatol*, vol. 140, no. 4, p. 891, Apr. 2020, doi: 10.1016/J.JID.2019.08.446.
- [8] E. A. Engels *et al.*, "Spectrum of Cancer Risk among U.S. Solid Organ Transplant Recipients: The Transplant Cancer Match Study," *JAMA*, vol. 306, no. 17, p. 1891, Nov. 2011, doi: 10.1001/JAMA.2011.1592.
- [9] M. J. Smyth, G. P. Dunn, and R. D. Schreiber, "Cancer Immunosurveillance and Immunoediting: The Roles of Immunity in Suppressing Tumor Development and Shaping Tumor Immunogenicity," *Adv Immunol*, vol. 90, pp. 1–50, Jan. 2006, doi: 10.1016/S0065-2776(06)90001-7.
- [10] X. Wu *et al.*, "Immune microenvironment profiles of tumor immune equilibrium and immune escape states of mouse sarcoma," *Cancer Lett*, vol. 340, no. 1, pp. 124–133, Oct. 2013, doi: 10.1016/j.canlet.2013.07.038.
- [11] M. W. L. Teng *et al.*, "Opposing roles for IL-23 and IL-12 in maintaining occult cancer in an equilibrium state," *Cancer Res*, vol. 72, no. 16, pp. 3987–3996, Aug. 2012, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1337.
- [12] S. Tugues *et al.*, "New insights into IL-12-mediated tumor suppression," *Cell Death Differ*, vol. 22, no. 2, p. 237, Feb. 2015, doi: 10.1038/CDD.2014.134.
- [13] J. Yan, M. J. Smyth, and M. W. L. Teng, "Interleukin (IL)-12 and IL-23 and Their Conflicting Roles in Cancer," *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 10, no. 7, Jul. 2018, doi: 10.1101/CSHPERSPECT.A028530.

- [14] S. Zhang, J. Yuan, W. Li, and Q. Ye, "Organ transplantation from donors (cadaveric or living) with a history of malignancy: Review of the literature," *Transplant Rev*, vol. 28, no. 4, pp. 169–175, Oct. 2014, doi: 10.1016/J.TRRE.2014.06.002.
- [15] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of cancer: The next generation," *Cell*, vol. 144, no. 5. Elsevier, pp. 646–674, Mar. 04, 2011. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [16] L. Buonaguro and M. Tagliamonte, "Selecting Target Antigens for Cancer Vaccine Development," *Vaccines (Basel)*, vol. 8, no. 4, pp. 1–14, Dec. 2020, doi: 10.3390/VACCINES8040615.
- [17] R. Rosenthal *et al.*, "Neoantigen-directed immune escape in lung cancer evolution," *Nature*, vol. 567, no. 7749, pp. 479–485, Mar. 2019, doi: 10.1038/s41586-019-1032-7.
- [18] M. Yi, S. Qin, W. Zhao, S. Yu, Q. Chu, and K. Wu, "The role of neoantigen in immune checkpoint blockade therapy," *Experimental Hematology and Oncology*, vol. 7, no. 1. BioMed Central Ltd., p. 28, Nov. 16, 2018. doi: 10.1186/s40164-018-0120-y.
- [19] H. T. Khong, Q. J. Wang, and S. A. Rosenberg, "Identification of multiple antigens recognized by tumor-infiltrating lymphocytes from a single patient: Tumor escape by antigen loss and loss of MHC expression," *Journal of Immunotherapy*, vol. 27, no. 3, pp. 184–190, 2004, doi: 10.1097/00002371-200405000-00002.
- [20] A. Favole *et al.*, "MHC class I-related antigen-processing machinery component defects in feline mammary carcinoma," *Transl Oncol*, vol. 5, no. 1, pp. 48–55, 2012, doi: 10.1593/tlo.11247.
- [21] E. Kikuchi *et al.*, "HLA class I antigen expression is associated with a favorable prognosis in early stage non-small cell lung cancer," *Cancer Sci*, vol. 98, no. 9, pp. 1424–1430, Sep. 2007, doi: 10.1111/j.1349-7006.2007.00558.x.
- [22] A. M. Henle, A. Nassar, D. Puglisi-Knutson, B. Youssef, and K. L. Knutson, "Downregulation of TAP1 and TAP2 in early stage breast cancer," *PLoS One*, vol. 12, no. 11, Nov. 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0187323.
- [23] M. Matsui, S. Machida, T. Itani-Yohda, and T. Akatsuka, "Downregulation of the proteasome subunits, transporter, and antigen presentation in hepatocellular carcinoma, and their restoration by interferon- γ ," *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, vol. 17, no. 8, pp. 897–907, 2002, doi: 10.1046/j.1440-1746.2002.02837.x.
- [24] M. S. Leibowitz, P. A. Andrade Filho, S. Ferrone, and R. L. Ferris, "Deficiency of activated STAT1 in head and neck cancer cells mediates TAP1-dependent escape from cytotoxic T lymphocytes," *Cancer Immunology, Immunotherapy*, vol. 60, no. 4, pp. 525–535, Apr. 2011, doi: 10.1007/s00262-010-0961-7.
- [25] B. A. Inman *et al.*, "PD-L1 (B7-H1) expression by urothelial carcinoma of the bladder and BCG-induced granulomata: Associations with localized stage progression," *Cancer*, vol. 109, no. 8, pp. 1499–1505, Apr. 2007, doi: 10.1002/cncr.22588.
- [26] R. H. Thompson and E. D. Kwon, "Significance of B7-H1 overexpression in kidney cancer," *Clinical Genitourinary Cancer*, vol. 5, no. 3. Cancer Information Group, LP, pp. 206–211, 2006. doi: 10.3816/CGC.2006.n.038.

- [27] W. Yang, P. W. Chen, H. Li, H. Alizadeh, and J. Y. Niederkorn, "PD-L1: PD-1 interaction contributes to the functional suppression of T-cell responses to human uveal melanoma cells in vitro," *Invest Ophthalmol Vis Sci*, vol. 49, no. 6, pp. 2518–2525, Jun. 2008, doi: 10.1167/iovs.07-1606.
- [28] H. Ghebeh *et al.*, "The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: Correlation with important high-risk prognostic factors," *Neoplasia*, vol. 8, no. 3, pp. 190–198, 2006, doi: 10.1593/neo.05733.
- [29] J. Hamanishi *et al.*, "Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, no. 9, pp. 3360–3365, Feb. 2007, doi: 10.1073/pnas.0611533104.
- [30] M. J. Butte, M. E. Keir, T. B. Phamduy, A. H. Sharpe, and G. J. Freeman, "Programmed Death-1 Ligand 1 Interacts Specifically with the B7-1 Costimulatory Molecule to Inhibit T Cell Responses," *Immunity*, vol. 27, no. 1, pp. 111–122, Jul. 2007, doi: 10.1016/j.immuni.2007.05.016.
- [31] L. M. Francisco, P. T. Sage, and A. H. Sharpe, "The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity," *Immunol Rev*, vol. 236, no. 1, pp. 219–242, Jul. 2010, doi: 10.1111/J.1600-065X.2010.00923.X.
- [32] L. V. Riella, A. M. Paterson, A. H. Sharpe, and A. Chandraker, "Role of the PD-1 Pathway in the Immune Response," *American Journal of Transplantation*, vol. 12, no. 10, pp. 2575–2587, Oct. 2012, doi: 10.1111/J.1600-6143.2012.04224.X.
- [33] M. Grzywnowicz and K. Giannopoulos, "The role of receptor programmed death-1 and its ligands in immune system and tumors," *Acta Haematol Pol*, vol. 43, no. 2 PARTA, pp. 132–145, 2012, doi: 10.1016/S0001-5814(12)32008-2.
- [34] E. J. Wherry, "T cell exhaustion," *Nature Immunology 2011 12:6*, vol. 12, no. 6, pp. 492–499, May 2011, doi: 10.1038/ni.2035.
- [35] J. S. Yi, M. A. Cox, and A. J. Zajac, "T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion," *Immunology*, vol. 129, no. 4, p. 474, Apr. 2010, doi: 10.1111/J.1365-2567.2010.03255.X.
- [36] Y. Jiang, Y. Li, and B. Zhu, "T-cell exhaustion in the tumor microenvironment," *Cell Death & Disease 2015 6:6*, vol. 6, no. 6, pp. e1792–e1792, Jun. 2015, doi: 10.1038/cddis.2015.162.
- [37] W. Qin *et al.*, "The Diverse Function of PD-1/PD-L Pathway Beyond Cancer," *Front Immunol*, vol. 10, Oct. 2019, doi: 10.3389/FIMMU.2019.02298.
- [38] F. Shi *et al.*, "PD-1 and PD-L1 upregulation promotes CD8+ T-cell apoptosis and postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma patients," *Int J Cancer*, vol. 128, no. 4, pp. 887–896, Feb. 2011, doi: 10.1002/IJC.25397.
- [39] W. Yang *et al.*, "PD-L1 Expression on Human Ocular Cells and Its Possible Role in Regulating Immune-Mediated Ocular Inflammation," *Invest Ophthalmol Vis Sci*, vol. 50, no. 1, pp. 273–280, Jan. 2009, doi: 10.1167/IOVS.08-2397.

- [40] H. Dong *et al.*, “Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion,” *Nat Med*, vol. 8, no. 8, pp. 793–800, 2002, doi: 10.1038/nm730.
- [41] S. Payne, “Immunity and Resistance to Viruses,” *Viruses*, pp. 61–71, 2017, doi: 10.1016/B978-0-12-803109-4.00006-4.
- [42] N. A. De Weerd and T. Nguyen, “The interferons and their receptors—distribution and regulation,” *Immunol Cell Biol*, vol. 90, no. 5, p. 483, May 2012, doi: 10.1038/ICB.2012.9.
- [43] S. E. Dorman and S. M. Holland, “Interferon- γ and interleukin-12 pathway defects and human disease,” *Cytokine Growth Factor Rev*, vol. 11, no. 4, pp. 321–333, 2000, doi: 10.1016/S1359-6101(00)00010-1.
- [44] N. Zanin, C. Viaris de Lesegno, C. Lamaze, and C. M. Blouin, “Interferon Receptor Trafficking and Signaling: Journey to the Cross Roads,” *Front Immunol*, vol. 11, p. 3512, Jan. 2021, doi: 10.3389/FIMMU.2020.615603/BIBTEX.
- [45] C. A. Biron, “Innate Immunity: Recognizing and Responding to Foreign Invaders-No Training Needed,” *Viral Pathogenesis: From Basics to Systems Biology: Third Edition*, pp. 41–55, 2016, doi: 10.1016/B978-0-12-800964-2.00004-5.
- [46] H. Ding, G. Wang, Z. Yu, H. Sun, and L. Wang, “Role of interferon-gamma (IFN- γ) and IFN- γ receptor 1/2 (IFN γ R1/2) in regulation of immunity, infection, and cancer development: IFN- γ -dependent or independent pathway,” *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 155, p. 113683, Nov. 2022, doi: 10.1016/J.BIOPHA.2022.113683.
- [47] M. F. Murray, “Susceptibility and Response to Infection,” *Emery and Rimoin’s Principles and Practice of Medical Genetics*, pp. 1–24, Jan. 2013, doi: 10.1016/B978-0-12-383834-6.00047-1.
- [48] A. Garcia-Diaz *et al.*, “Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression,” *Cell Rep*, vol. 19, no. 6, pp. 1189–1201, May 2017, doi: 10.1016/j.celrep.2017.04.031.
- [49] Y. Yan, L. Zheng, Q. Du, B. Yan, and D. A. Geller, “Interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2 regulate PD-L1 expression in hepatocellular carcinoma (HCC) cells,” *Cancer Immunology, Immunotherapy*, vol. 69, no. 9, pp. 1891–1903, Sep. 2020, doi: 10.1007/s00262-020-02586-9.
- [50] G. Lamberti *et al.*, “The Mechanisms of PD-L1 Regulation in Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC): Which Are the Involved Players?,” *Cancers 2020, Vol. 12, Page 3129*, vol. 12, no. 11, p. 3129, Oct. 2020, doi: 10.3390/CANCERS12113129.
- [51] M. Katz, I. Amit, and Y. Yarden, “Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases,” *Biochim Biophys Acta*, vol. 1773, no. 8, p. 1161, Aug. 2007, doi: 10.1016/J.BBAMCR.2007.01.002.
- [52] J. Wang *et al.*, “BIN1 reverses PD-L1-mediated immune escape by inactivating the c-MYC and EGFR/MAPK signaling pathways in non-small cell lung cancer,” *Oncogene*, vol. 36, no. 45, pp. 6235–6243, Nov. 2017, doi: 10.1038/ONC.2017.217.

- [53] A. Plotnikov, E. Zehorai, S. Procaccia, and R. Seger, "The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 1813, no. 9, pp. 1619–1633, Sep. 2011, doi: 10.1016/J.BBAMCR.2010.12.012.
- [54] J. Shan, W. Donelan, J. N. Hayner, F. Zhang, E. E. Dudenhausen, and M. S. Kilberg, "MAPK signaling triggers transcriptional induction of cFOS during amino acid limitation of HepG2 cells," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1854, no. 3, p. 539, Mar. 2015, doi: 10.1016/J.BBAMCR.2014.12.013.
- [55] X. Ju, H. Zhang, Z. Zhou, and Q. Wang, "Regulation of PD-L1 expression in cancer and clinical implications in immunotherapy," *Am J Cancer Res*, vol. 10, no. 1, p. 1, 2020, Accessed: Mar. 21, 2023. [Online]. Available: /pmc/articles/PMC7017746/
- [56] Y. Zhang, M. Xu, X. Zhang, F. Chu, and T. Zhou, "MAPK/c-Jun signaling pathway contributes to the upregulation of the anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-xL induced by Epstein-Barr virus-encoded BARTF1 in gastric carcinoma cells," *Oncol Lett*, vol. 15, no. 5, p. 7537, May 2018, doi: 10.3892/OL.2018.8293.
- [57] A. T. Parsa *et al.*, "Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma," *Nat Med*, vol. 13, no. 1, pp. 84–88, Jan. 2007, doi: 10.1038/nm1517.
- [58] K. J. Lastwika *et al.*, "Control of PD-L1 expression by oncogenic activation of the AKT-mTOR pathway in non-small cell lung cancer," *Cancer Res*, vol. 76, no. 2, pp. 227–238, Jan. 2016, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3362.
- [59] E. A. Akbay *et al.*, "Activation of the PD-1 pathway contributes to immune escape in EGFR-driven lung tumors," *Cancer Discov*, vol. 3, no. 12, pp. 1355–1363, Dec. 2013, doi: 10.1158/2159-8290.CD-13-0310.
- [60] A. Garcia-Diaz *et al.*, "Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression," *Cell Rep*, vol. 19, no. 6, pp. 1189–1201, May 2017, doi: 10.1016/J.CELREP.2017.04.031.
- [61] L. L. Bu *et al.*, "STAT3 Induces Immunosuppression by Upregulating PD-1/PD-L1 in HNSCC," *J Dent Res*, vol. 96, no. 9, p. 1027, Aug. 2017, doi: 10.1177/0022034517712435.
- [62] Z. Quan *et al.*, "Clinical implications of the interaction between PD-1/PD-L1 and PI3K/AKT/mTOR pathway in progression and treatment of non-small cell lung cancer," *J Cancer*, vol. 13, no. 13, p. 3434, 2022, doi: 10.7150/JCA.77619.
- [63] S. Mafi *et al.*, "mTOR-Mediated Regulation of Immune Responses in Cancer and Tumor Microenvironment," *Front Immunol*, vol. 12, p. 5724, Feb. 2022, doi: 10.3389/FIMMU.2021.774103/BIBTEX.
- [64] M. Gato-Cañas *et al.*, "PDL1 Signals through Conserved Sequence Motifs to Overcome Interferon-Mediated Cytotoxicity," *Cell Rep*, vol. 20, no. 8, pp. 1818–1829, Aug. 2017, doi: 10.1016/j.celrep.2017.07.075.

- [65] Y. Gao *et al.*, “Acetylation-dependent regulation of PD-L1 nuclear translocation dictates the efficacy of anti-PD-1 immunotherapy,” *Nature Cell Biology* 2020 22:9, vol. 22, no. 9, pp. 1064–1075, Aug. 2020, doi: 10.1038/s41556-020-0562-4.
- [66] J. Yu *et al.*, “Regulation of sister chromatid cohesion by nuclear PD-L1,” *Cell Research* 2020 30:7, vol. 30, no. 7, pp. 590–601, Apr. 2020, doi: 10.1038/s41422-020-0315-8.
- [67] H. Polioudaki *et al.*, “Nuclear localization of PD-L1: artifact or reality?,” *Cellular Oncology*, vol. 42, no. 2, pp. 237–242, Apr. 2019, doi: 10.1007/S13402-018-00419-7.
- [68] J. Yu *et al.*, “Regulation of sister chromatid cohesion by nuclear PD-L1,” *Cell Res*, vol. 30, no. 7, pp. 590–601, Jul. 2020, doi: 10.1038/s41422-020-0315-8.
- [69] E. R. Parra, P. Villalobos, and J. Rodriguez-Canales, “The Multiple Faces of Programmed Cell Death Ligand 1 Expression in Malignant and Nonmalignant Cells,” *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, vol. 27, no. 4, pp. 287–294, Apr. 2019, doi: 10.1097/PAI.0000000000000602.
- [70] P. Kourilsky *et al.*, “Cells and Inhibit the Function of Infiltrating T Human Metastatic Melanoma Lymph Nodes Regulatory T Cells Are Overrepresented in high CD25 + Foxp3 Expressing CD4,” *J Immunol*, vol. 173, pp. 1444–1453, 2021, doi: 10.4049/jimmunol.173.2.1444.
- [71] X. L. Yuan *et al.*, “Gastric cancer cells induce human CD4+Foxp3+ regulatory T cells through the production of TGF- β 1,” *World J Gastroenterol*, vol. 17, no. 15, pp. 2019–2027, Apr. 2011, doi: 10.3748/wjg.v17.i15.2019.
- [72] S. Amarnath *et al.*, “The PDL1-PD1 axis converts human T H1 cells into regulatory T cells,” *Sci Transl Med*, vol. 3, no. 111, p. 111ra120, Nov. 2011, doi: 10.1126/scitranslmed.3003130.
- [73] A. Davis, R. Gao, and N. Navin, “Tumor evolution: Linear, branching, neutral or punctuated?,” *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, vol. 1867, no. 2, pp. 151–161, Apr. 2017, doi: 10.1016/J.BBCAN.2017.01.003.
- [74] D. Mittal, M. M. Gubin, R. D. Schreiber, and M. J. Smyth, “New insights into cancer immunoediting and its three component phases — elimination, equilibrium and escape,” *Curr Opin Immunol*, vol. 27, no. 1, p. 16, Apr. 2014, doi: 10.1016/J.COI.2014.01.004.
- [75] C. E. McCoach and T. G. Bivona, “The evolving understanding of immunoediting and the clinical impact of immune escape,” *J Thorac Dis*, vol. 10, no. 3, p. 1248, Mar. 2018, doi: 10.21037/JTD.2018.03.60.
- [76] Y. Li, L. Zhao, and X. F. Li, “Hypoxia and the Tumor Microenvironment,” *Technol Cancer Res Treat*, vol. 20, 2021, doi: 10.1177/15330338211036304.
- [77] C. Liu, Y. Jin, and Z. Fan, “The Mechanism of Warburg Effect-Induced Chemoresistance in Cancer,” *Front Oncol*, vol. 11, p. 3408, Sep. 2021, doi: 10.3389/FONC.2021.698023/BIBTEX.
- [78] C. H. Chang *et al.*, “Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression,” *Cell*, vol. 162, no. 6, pp. 1229–1241, Sep. 2015, doi: 10.1016/j.cell.2015.08.016.

- [79] W. Graboń, D. Otto-Ślusarczyk, A. Barańczyk-Kuźma Katedra Zakład Biochemii, and I. Wydział Lekarski, "Wpływ tlenu na efekt Warburga: czy w komórkach nowotworowych mleczan powstaje tylko z glukozy? Influence of oxygen on the Warburg effect: do cancer cells produce lactate only from glucose?", doi: 10.5604/01.3001.0012.0684.
- [80] Y. J. Kwon *et al.*, "The acidic tumor microenvironment enhances PD-L1 expression via activation of STAT3 in MDA-MB-231 breast cancer cells," *BMC Cancer*, vol. 22, no. 1, Dec. 2022, doi: 10.1186/S12885-022-09956-9.
- [81] P. Ma *et al.*, "High PD-L1 expression drives glycolysis via an Akt/mTOR/HIF-1 α axis in acute myeloid leukemia," *Oncol Rep*, vol. 43, no. 3, pp. 999–1009, Jan. 2020, doi: 10.3892/or.2020.7477.
- [82] H. Gonzalez, C. Hagerling, and Z. Werb, "Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression," *Genes Dev*, vol. 32, no. 19–20, p. 1267, Oct. 2018, doi: 10.1101/GAD.314617.118.
- [83] D. Mittal, M. M. Gubin, R. D. Schreiber, and M. J. Smyth, "New insights into cancer immunoediting and its three component phases — elimination, equilibrium and escape," *Curr Opin Immunol*, vol. 27, no. 1, p. 16, Apr. 2014, doi: 10.1016/J.COI.2014.01.004.
- [84] V. Screpanti, R. P. A. Wallin, A. Grandien, and H. G. Ljunggren, "Impact of FASL-induced apoptosis in the elimination of tumor cells by NK cells," *Mol Immunol*, vol. 42, no. 4 SPEC. ISS., pp. 495–499, 2005, doi: 10.1016/J.MOLIMM.2004.07.033.
- [85] A. Mantovani, F. Marchesi, A. Malesci, L. Laghi, and P. Allavena, "Tumor-Associated Macrophages as Treatment Targets in Oncology," *Nat Rev Clin Oncol*, vol. 14, no. 7, p. 399, Jul. 2017, doi: 10.1038/NRCLINONC.2016.217.
- [86] A. Basu *et al.*, "Differentiation and Regulation of TH Cells: A Balancing Act for Cancer Immunotherapy," *Front Immunol*, vol. 12, p. 669474, May 2021, doi: 10.3389/FIMMU.2021.669474/BIBTEX.
- [87] A. K. Palucka and L. M. Coussens, "The Basis of Oncolimmunology," *Cell*, vol. 164, no. 6, p. 1233, Mar. 2016, doi: 10.1016/J.CELL.2016.01.049.
- [88] S. Zhu, Z. Luo, X. Li, X. Han, S. Shi, and T. Zhang, "Tumor-associated macrophages: role in tumorigenesis and immunotherapy implications," *J Cancer*, vol. 12, no. 1, p. 54, Jan. 2021, doi: 10.7150/JCA.49692.
- [89] J. W. Pollard, "Trophic macrophages in development and disease," *Nat Rev Immunol*, vol. 9, no. 4, p. 259, Apr. 2009, doi: 10.1038/NRI2528.
- [90] R. Weber *et al.*, "Myeloid-derived suppressor cells hinder the anti-cancer activity of immune checkpoint inhibitors," *Frontiers in Immunology*, vol. 9, no. JUN. Frontiers Media S.A., p. 1, Jun. 11, 2018. doi: 10.3389/fimmu.2018.01310.
- [91] C. Lu, P. S. Redd, J. R. Lee, N. Savage, and K. Liu, "The expression profiles and regulation of PD-L1 in tumor-induced myeloid-derived suppressor cells," *Oncoimmunology*, vol. 5, no. 12, Dec. 2016, doi: 10.1080/2162402X.2016.1247135.
- [92] M. Ballbach *et al.*, "Expression of checkpoint molecules on myeloid-derived suppressor cells," *Immunol Lett*, vol. 192, pp. 1–6, Dec. 2017, doi: 10.1016/J.IMLET.2017.10.001.

- [93] T. Lu *et al.*, "Tumor-infiltrating myeloid cells induce tumor cell resistance to cytotoxic T cells in mice," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 121, no. 10, pp. 4015–4029, Oct. 2011, doi: 10.1172/JCI45862.
- [94] S. Nagaraj *et al.*, "Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer," *Nat Med*, vol. 13, no. 7, pp. 828–835, Jul. 2007, doi: 10.1038/nm1609.
- [95] V. Fleming *et al.*, "Targeting myeloid-derived suppressor cells to bypass tumor-induced immunosuppression," *Front Immunol*, vol. 9, no. MAR, p. 398, Mar. 2018, doi: 10.3389/FIMMU.2018.00398/BIBTEX.
- [96] F. Castellano and V. Molinier-Frenkel, "Control of T-Cell Activation and Signaling by Amino-Acid Catabolizing Enzymes," *Front Cell Dev Biol*, vol. 8, p. 1635, Dec. 2020, doi: 10.3389/FCELL.2020.613416/BIBTEX.
- [97] Z. Ma, Y. Zhen, C. Hu, and H. Yi, "Myeloid-Derived Suppressor Cell-Derived Arginase-1 Oppositely Modulates IL-17A and IL-17F Through the ESR/STAT3 Pathway During Colitis in Mice," *Front Immunol*, vol. 11, p. 687, Apr. 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.00687.
- [98] P. C. Rodriguez *et al.*, "l-Arginine Consumption by Macrophages Modulates the Expression of CD3 ζ Chain in T Lymphocytes," *The Journal of Immunology*, vol. 171, no. 3, pp. 1232–1239, Aug. 2003, doi: 10.4049/jimmunol.171.3.1232.
- [99] M. K. Srivastava, P. Sinha, V. K. Clements, P. Rodriguez, and S. Ostrand-Rosenberg, "Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine," *Cancer Res*, vol. 70, no. 1, pp. 68–77, Jan. 2010, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2587.
- [100] S. Nagaraj *et al.*, "Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer," *Nat Med*, vol. 13, no. 7, pp. 828–835, Jul. 2007, doi: 10.1038/nm1609.
- [101] S. H. Kim, J. Roszik, E. A. Grimm, and S. Ekmekcioglu, "Impact of l-Arginine Metabolism on Immune Response and Anticancer Immunotherapy," *Front Oncol*, vol. 8, no. MAR, Mar. 2018, doi: 10.3389/FONC.2018.00067.
- [102] P. C. Rodriguez *et al.*, "l-Arginine Consumption by Macrophages Modulates the Expression of CD3 ζ Chain in T Lymphocytes," *The Journal of Immunology*, vol. 171, no. 3, pp. 1232–1239, Aug. 2003, doi: 10.4049/JIMMUNOL.171.3.1232.
- [103] O. Kourko, K. Seaver, N. Odoardi, S. Basta, and K. Gee, "IL-27, IL-30, and IL-35: A Cytokine Triumvirate in Cancer," *Front Oncol*, vol. 9, p. 969, Oct. 2019, doi: 10.3389/FONC.2019.00969.
- [104] H. Nishikawa and S. Koyama, "Mechanisms of regulatory T cell infiltration in tumors: implications for innovative immune precision therapies," *J Immunother Cancer*, vol. 9, no. 7, p. e002591, Jul. 2021, doi: 10.1136/JITC-2021-002591.
- [105] J. S. Lewis, R. J. Landers, J. C. E. Underwood, A. L. Harris, and C. E. Lewis, "Expression of vascular endothelial growth factor by macrophages is up-regulated in poorly vascularized areas of breast carcinomas," *Journal of Pathology*, vol. 192, no. 2, pp. 150–158, 2000, doi: 10.1002/1096-9896(2000)9999:9999<::AID-PATH687>3.0.CO;2-G.

- [106] E. M. De Francesco, R. Lappano, M. F. Santolla, S. Marsico, A. Caruso, and M. Maggiolini, "HIF-1 α /GPER signaling mediates the expression of VEGF induced by hypoxia in breast cancer associated fibroblasts (CAFs)," *Breast Cancer Research*, vol. 15, no. 4, pp. 1–18, Aug. 2013, doi: 10.1186/bcr3458.
- [107] A. K. Mattox *et al.*, "PD-1 expression in head and neck squamous cell carcinomas derives primarily from functionally anergic CD4⁺ TILs in the presence of PD-L1⁺ TAMs," *Cancer Res*, vol. 77, no. 22, pp. 6365–6374, Nov. 2017, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-3453.
- [108] Z. Li, J. Zhou, J. Zhang, S. Li, H. Wang, and J. Du, "Cancer-associated fibroblasts promote PD-L1 expression in mice cancer cells via secreting CXCL5," *Int J Cancer*, vol. 145, no. 7, p. 1946, 2019, doi: 10.1002/IJC.32278.
- [109] C. Inoue *et al.*, "PD-L1 Induction by Cancer-Associated Fibroblast-Derived Factors in Lung Adenocarcinoma Cells," *Cancers (Basel)*, vol. 11, no. 9, Sep. 2019, doi: 10.3390/CANCERS11091257.
- [110] F. Fallarino *et al.*, "Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells," *Nat Immunol*, vol. 4, no. 12, pp. 1206–1212, Dec. 2003, doi: 10.1038/ni1003.
- [111] E. Suzuki, V. Kapoor, A. S. Jassar, L. R. Kaiser, and S. M. Albelda, "Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1⁺/CD11b⁺ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity," *Clinical Cancer Research*, vol. 11, no. 18, pp. 6713–6721, Sep. 2005, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0883.
- [112] G. Carbotto *et al.*, "IL-27 induces the expression of IDO and PD-L1 in human cancer cells," *Oncotarget*, vol. 6, no. 41, p. 43267, 2015, doi: 10.18632/ONCOTARGET.6530.
- [113] H. Horlad *et al.*, "An IL-27/Stat3 axis induces expression of programmed cell death 1 ligands (PD-L1/2) on infiltrating macrophages in lymphoma," *Cancer Sci*, vol. 107, no. 11, p. 1696, Nov. 2016, doi: 10.1111/CAS.13065.
- [114] J. Cai, D. Wang, G. Zhang, and X. Guo, "The Role Of PD-1/PD-L1 Axis In Treg Development And Function: Implications For Cancer Immunotherapy," *Onco Targets Ther*, vol. 12, p. 8437, 2019, doi: 10.2147/OTT.S221340.
- [115] L. M. Francisco *et al.*, "PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells," *J Exp Med*, vol. 206, no. 13, p. 3015, Dec. 2009, doi: 10.1084/JEM.20090847.
- [116] J. F. M. Jacobs *et al.*, "Regulatory T cells and the PD-L1/PD-1 pathway mediate immune suppression in malignant human brain tumors," *Neuro Oncol*, vol. 11, no. 4, pp. 394–402, Aug. 2009, doi: 10.1215/15228517-2008-104.
- [117] K. Wing *et al.*, "CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function," *Science (1979)*, vol. 322, no. 5899, pp. 271–275, Oct. 2008, doi: 10.1126/science.1160062.
- [118] S. Wang *et al.*, "Interleukin-10 deficiency impairs regulatory T cell-derived neuropilin-1 functions and promotes Th1 and Th17 immunity," *Sci Rep*, vol. 6, no. 1, pp. 1–16, Apr. 2016, doi: 10.1038/srep24249.

- [119] X. Cao *et al.*, “Granzyme B and Perforin Are Important for Regulatory T Cell-Mediated Suppression of Tumor Clearance,” *Immunity*, vol. 27, no. 4, pp. 635–646, Oct. 2007, doi: 10.1016/j.immuni.2007.08.014.
- [120] D. M. Zhao, A. M. Thornton, R. J. DiPaolo, and E. M. Shevach, “Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes,” *Blood*, vol. 107, no. 10, pp. 3925–3932, May 2006, doi: 10.1182/blood-2005-11-4502.
- [121] S. Vigano *et al.*, “Targeting adenosine in cancer immunotherapy to enhance T-Cell function,” *Front Immunol*, vol. 10, no. JUN, p. 447851, Jun. 2019, doi: 10.3389/FIMMU.2019.00925/BIBTEX.
- [122] J. Gao, Y. Liang, and L. Wang, “Shaping Polarization Of Tumor-Associated Macrophages In Cancer Immunotherapy,” *Front Immunol*, vol. 13, p. 3364, Jun. 2022, doi: 10.3389/FIMMU.2022.888713/BIBTEX.
- [123] Y. Chen, Y. Song, W. Du, L. Gong, H. Chang, and Z. Zou, “Tumor-associated macrophages: An accomplice in solid tumor progression,” *Journal of Biomedical Science*, vol. 26, no. 1. BioMed Central Ltd., pp. 1–13, Oct. 20, 2019. doi: 10.1186/s12929-019-0568-z.
- [124] X. Li, L. Chen, X. Peng, and X. Zhan, “Progress of tumor-associated macrophages in the epithelial-mesenchymal transition of tumor,” *Front Oncol*, vol. 12, p. 3888, Jul. 2022, doi: 10.3389/FONC.2022.911410/BIBTEX.
- [125] J. Cai, L. Xia, J. Li, S. Ni, H. Song, and X. Wu, “Tumor-Associated Macrophages Derived TGF- β -Induced Epithelial to Mesenchymal Transition in Colorectal Cancer Cells through Smad2,3-4/Snail Signaling Pathway,” *Cancer Research and Treatment : Official Journal of Korean Cancer Association*, vol. 51, no. 1, p. 252, Jan. 2019, doi: 10.4143/CRT.2017.613.
- [126] C. Liu, W. Zhang, J. Wang, T. Si, and W. Xing, “Tumor-associated macrophage-derived transforming growth factor- β promotes colorectal cancer progression through HIF1-TRIB3 signaling,” *Cancer Sci*, vol. 112, no. 10, p. 4198, Oct. 2021, doi: 10.1111/CAS.15101.
- [127] S. Grivennikov *et al.*, “IL-6 and Stat3 Are Required for Survival of Intestinal Epithelial Cells and Development of Colitis-Associated Cancer,” *Cancer Cell*, vol. 15, no. 2, pp. 103–113, Feb. 2009, doi: 10.1016/j.ccr.2009.01.001.
- [128] V. Gocheva *et al.*, “IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion,” *Genes Dev*, vol. 24, no. 3, pp. 241–255, Feb. 2010, doi: 10.1101/gad.1874010.
- [129] A. Mantovani, S. Sozzani, M. Locati, P. Allavena, and A. Sica, “Macrophage polarization: Tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes,” *Trends in Immunology*, vol. 23, no. 11. pp. 549–555, Nov. 01, 2002. doi: 10.1016/S1471-4906(02)02302-5.
- [130] Y. Yu, C. H. Xiao, L. D. Tan, Q. S. Wang, X. Q. Li, and Y. M. Feng, “Cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells through paracrine TGF- β signalling,” *Br J Cancer*, vol. 110, no. 3, pp. 724–732, Feb. 2014, doi: 10.1038/bjc.2013.768.

- [131] H. Cho *et al.*, “Cancer-stimulated CAFs enhance monocyte differentiation and protumoral TAM activation via IL6 and GM-CSF secretion,” *Clinical Cancer Research*, vol. 24, no. 21, pp. 5407–5421, Nov. 2018, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-0125.
- [132] H. Liu *et al.*, “PD-L1 signal on liver dendritic cells is critical for Foxp3 +CD4+CD25+ treg and liver tolerance induction in mice,” in *Transplantation Proceedings*, Elsevier, Jun. 2013, pp. 1853–1855. doi: 10.1016/j.transproceed.2013.03.015.
- [133] W. Zhang *et al.*, “Blocking the PD-1/PD-L1 axis in dendritic cell-stimulated Cytokine-Induced killer cells with pembrolizumab enhances their therapeutic effects against hepatocellular carcinoma,” *J Cancer*, vol. 10, no. 11, pp. 2578–2587, 2019, doi: 10.7150/jca.26961.
- [134] L. M. Francisco *et al.*, “PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells,” *Journal of Experimental Medicine*, vol. 206, no. 13, pp. 3015–3029, Dec. 2009, doi: 10.1084/jem.20090847.
- [135] Y. M. Chiu *et al.*, “PD-1 and PD-L1 up-regulation promotes T-cell apoptosis in gastric adenocarcinoma,” *Anticancer Res*, vol. 38, no. 4, pp. 2069–2078, Apr. 2018, doi: 10.21873/anticancer.12446.
- [136] P. Loke and J. P. Allison, “PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 100, no. 9, pp. 5336–5341, Apr. 2003, doi: 10.1073/pnas.0931259100.
- [137] H. Xiong *et al.*, “Anti-PD-L1 treatment results in functional remodeling of the macrophage compartment,” *Cancer Res*, vol. 79, no. 7, pp. 1493–1506, Apr. 2019, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-3208.
- [138] Y. Zhang, W. Du, Z. Chen, and C. Xiang, “Upregulation of PD-L1 by SPP1 mediates macrophage polarization and facilitates immune escape in lung adenocarcinoma,” *Exp Cell Res*, vol. 359, no. 2, pp. 449–457, Oct. 2017, doi: 10.1016/j.yexcr.2017.08.028.
- [139] H. R. Kim *et al.*, “PD-L1 expression on immune cells, but not on tumor cells, is a favorable prognostic factor for head and neck cancer patients,” *Scientific Reports 2016 6:1*, vol. 6, no. 1, pp. 1–12, Nov. 2016, doi: 10.1038/srep36956.
- [140] T. Noguchi *et al.*, “Temporally Distinct PD-L1 Expression by Tumor and Host Cells Contributes to Immune Escape,” 2017, doi: 10.1158/2326-6066.CIR-16-0391.
- [141] Y. Zhu *et al.*, “Disruption of tumour-associated macrophage trafficking by the osteopontin-induced colony-stimulating factor-1 signalling sensitises hepatocellular carcinoma to anti-PD-L1 blockade,” *Gut*, vol. 68, no. 9, pp. 1653–1666, Sep. 2019, doi: 10.1136/gutjnl-2019-318419.
- [142] R. Winograd *et al.*, “Induction of T-cell immunity overcomes complete resistance to PD-1 and CTLA-4 blockade and improves survival in pancreatic carcinoma,” *Cancer Immunol Res*, vol. 3, no. 4, pp. 399–411, 2015, doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0215.
- [143] P. Metzger *et al.*, “Immunostimulatory RNA leads to functional reprogramming of myeloid-derived suppressor cells in pancreatic cancer”, doi: 10.1186/s40425-019-0778-7.

- [144] C. Lu, P. S. Redd, J. R. Lee, N. Savage, and K. Liu, "The expression profiles and regulation of PD-L1 in tumor-induced myeloid-derived suppressor cells," *Oncoimmunology*, vol. 5, no. 12, Dec. 2016, doi: 10.1080/2162402X.2016.1247135.
- [145] Y. Zhang *et al.*, "Myeloid cells are required for PD-1/PD-L1 checkpoint activation and the establishment of an immunosuppressive environment in pancreatic cancer," *Gut*, vol. 66, pp. 124–136, 2017, doi: 10.1136/gutjnl-2016-312078.
- [146] M. Z. Noman *et al.*, "PD-L1 is a novel direct target of HIF-1 α , and its blockade under hypoxia enhanced: MDSC-mediated T cell activation," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 211, no. 5, pp. 781–790, 2014, doi: 10.1084/jem.20131916.
- [147] "Cancer statistics Statistics Explained", Accessed: Jun. 09, 2023. [Online]. Available: <https://ec.europa.eu/eurostat/statisticsexplained/>
- [148] S. Farkona, E. P. Diamandis, and I. M. Blasutig, "Cancer immunotherapy: The beginning of the end of cancer?," *BMC Medicine*, vol. 14, no. 1. BioMed Central Ltd., p. 73, May 05, 2016. doi: 10.1186/s12916-016-0623-5.
- [149] P. L. Bedard, A. R. Hansen, M. J. Ratain, and L. L. Siu, "Tumour heterogeneity in the clinic," *Nature*, vol. 501, no. 7467. NIH Public Access, pp. 355–364, 2013. doi: 10.1038/nature12627.
- [150] S. Sleijfer, J. Bogaerts, and L. L. Siu, "Designing transformative clinical trials in the cancer genome era," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 31, no. 15. American Society of Clinical Oncology, pp. 1834–1841, May 20, 2013. doi: 10.1200/JCO.2012.45.3639.
- [151] M. D. Vesely, M. H. Kershaw, R. D. Schreiber, and M. J. Smyth, "Natural innate and adaptive immunity to cancer," *Annu Rev Immunol*, 2011, doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101324.
- [152] C. Friese *et al.*, "CTLA-4 blockade boosts the expansion of tumor-reactive CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian cancer," *Sci Rep*, vol. 10, no. 1, pp. 1–12, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-60738-4.
- [153] A. Snyder *et al.*, "Genetic Basis for Clinical Response to CTLA-4 Blockade in Melanoma," *New England Journal of Medicine*, vol. 371, no. 23, pp. 2189–2199, Dec. 2014, doi: 10.1056/NEJMoa1406498.
- [154] J. S. Weber *et al.*, "Phase I/II study of ipilimumab for patients with metastatic melanoma," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 26, no. 36, pp. 5950–5956, Dec. 2008, doi: 10.1200/JCO.2008.16.1927.
- [155] D. R. Leach, M. F. Krummel, and J. P. Allison, "Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade," *Science (1979)*, vol. 271, no. 5256, pp. 1734–1736, Mar. 1996, doi: 10.1126/science.271.5256.1734.
- [156] K. Vandenberghe, S. W. Van Gool, A. Kasran, J. L. Ceuppens, M. A. Boogaerts, and P. Vandenberghe, "Interaction of CTLA-4 (CD152) with CD80 or CD86 inhibits human T-cell activation," *Immunology*, vol. 98, no. 3, pp. 413–421, Nov. 1999, doi: 10.1046/j.1365-2567.1999.00888.x.
- [157] F. Bengsch, D. M. Knoblock, A. Liu, F. McAllister, and G. L. Beatty, "CTLA-4/CD80 pathway regulates T cell infiltration into pancreatic cancer," *Cancer Immunology*,

- Immunotherapy*, vol. 66, no. 12, pp. 1609–1617, Dec. 2017, doi: 10.1007/s00262-017-2053-4.
- [158] E. Khalife, A. Khodadadi, A. Talaeizadeh, L. Rahimian, M. Nemati, and A. Jafarzadeh, “Overexpression of regulatory T cell-related markers (FOXP3, CTLA-4 and GITR) by peripheral blood mononuclear cells from patients with breast cancer,” *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, vol. 19, no. 11, pp. 3019–3025, 2018, doi: 10.31557/APJCP.2018.19.11.3019.
- [159] T. Wróbel, “Przeciwciała monoklonalne anty-CD20 w terapii chłoniaków agresywnych,” *Hematologia*, vol. 1, no. 4, 2010.
- [160] C. L. Sawyers, “Herceptin: A First Assault on Oncogenes that Launched a Revolution,” *Cell*, vol. 179, no. 1, pp. 8–12, Sep. 2019, doi: 10.1016/J.CELL.2019.08.027.
- [161] J. C. Fuller, N. J. Burgoyne, and R. M. Jackson, “Predicting druggable binding sites at the protein-protein interface,” *Drug Discovery Today*, vol. 14, no. 3–4. Elsevier Current Trends, pp. 155–161, Feb. 01, 2009. doi: 10.1016/j.drudis.2008.10.009.
- [162] G. Q. Phan *et al.*, “Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 100, no. 14, pp. 8372–8377, Jul. 2003, doi: 10.1073/pnas.1533209100.
- [163] F. S. Hodi *et al.*, “Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma,” *New England Journal of Medicine*, vol. 363, no. 8, pp. 711–723, Aug. 2010, doi: 10.1056/nejmoa1003466.
- [164] J. N. Graff *et al.*, “Phase II Study of Ipilimumab in Men With Metastatic Prostate Cancer With an Incomplete Response to Androgen Deprivation Therapy,” *Front Oncol*, vol. 10, p. 1381, Aug. 2020, doi: 10.3389/fonc.2020.01381.
- [165] J. C. Yang *et al.*, “Ipilimumab (anti-CTLA4 antibody) causes regression of metastatic renal cell cancer associated with enteritis and hypophysitis,” *Journal of Immunotherapy*, vol. 30, no. 8, pp. 825–830, Nov. 2007, doi: 10.1097/CJI.0b013e318156e47e.
- [166] M. D. Hellmann *et al.*, “Nivolumab plus Ipilimumab in Lung Cancer with a High Tumor Mutational Burden,” *New England Journal of Medicine*, vol. 378, no. 22, pp. 2093–2104, May 2018, doi: 10.1056/NEJMoa1801946.
- [167] M. D. Hellmann *et al.*, “Tumor Mutational Burden and Efficacy of Nivolumab Monotherapy and in Combination with Ipilimumab in Small-Cell Lung Cancer,” *Cancer Cell*, vol. 33, no. 5, pp. 853–861.e4, May 2018, doi: 10.1016/j.ccell.2018.04.001.
- [168] R. Berger *et al.*, “Phase I safety and pharmacokinetic study of CT-011, a humanized antibody interacting with PD-1, in patients with advanced hematologic malignancies,” *Clinical Cancer Research*, vol. 14, no. 10, pp. 3044–3051, May 2008, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4079.
- [169] R. S. Herbst *et al.*, “Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients,” *Nature*, vol. 515, no. 7528, pp. 563–567, Nov. 2014, doi: 10.1038/nature14011.

- [170] H. C. Nauts and J. R. McLaren, "Coley toxins--the first century," *Adv Exp Med Biol*, vol. 267, pp. 483–500, 1990, doi: 10.1007/978-1-4684-5766-7_52.
- [171] P. Chorobik, D. Czaplicki, K. Ossysek, and J. Bereta, "Salmonella and cancer: from pathogens to therapeutics," *Acta Biochim Pol*, vol. 60, no. 3, pp. 285–297, 2013.
- [172] P. Gontero *et al.*, "The Role of Bacillus Calmette-Guérin in the Treatment of Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer," *European Urology*, vol. 57, no. 3, pp. 410–429, Mar. 2010. doi: 10.1016/j.eururo.2009.11.023.
- [173] E. F. McCarthy, "The Toxins of William B. Coley and the Treatment of Bone and Soft-Tissue Sarcomas," *Iowa Orthop J*, vol. 26, p. 154, 2006, Accessed: Nov. 05, 2022. [Online]. Available: /pmc/articles/PMC1888599/
- [174] "IMAJ | The Israel Medicine Association Journal | Volume , Number 6, June 2002 | Coley's toxin: Historical Perspective." <https://www.ima.org.il/Medicine/IMAJ/viewarticle.aspx?year=2002&month=06&page=471> (accessed Nov. 06, 2022).
- [175] K. Kawai, J. Miyazaki, A. Joraku, H. Nishiyama, and H. Akaza, "Bacillus Calmette–Guerin (BCG) immunotherapy for bladder cancer: Current understanding and perspectives on engineered BCG vaccine," *Cancer Sci*, vol. 104, no. 1, p. 22, Jan. 2013, doi: 10.1111/CAS.12075.
- [176] F. Rommasi, "Bacterial-Based Methods for Cancer Treatment: What We Know and Where We Are", doi: 10.1007/s40487-021-00177-x.
- [177] C. N. Okafor, A. Rewane, and I. I. Momodu, "Bacillus Calmette Guerin," *Clinical Tuberculosis: Diagnosis and Treatment*, pp. 390–390, Jul. 2022, doi: 10.5005/jp/books/12549_33.
- [178] K. H. Gupta *et al.*, "Bacterial-Based Cancer Therapy (BBCT): Recent Advances, Current Challenges, and Future Prospects for Cancer Immunotherapy," 2021, doi: 10.3390/vaccines9121497.
- [179] W. K. Huh *et al.*, "Phase II Study of Axalimogene Filolisbac (ADXS-HPV) for Platinum-Refractory Cervical Carcinoma: an NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group Study," *Gynecol Oncol*, vol. 158, no. 3, p. 562, Sep. 2020, doi: 10.1016/J.YGYNO.2020.06.493.
- [180] L. M. Wood, P. D. Guirnalda, M. M. Seavey, Y. Paterson, and M. M. Seavey: ;, "Cancer immunotherapy using *Listeria monocytogenes* and listerial virulence factors", doi: 10.1007/s12026-008-8087-0.
- [181] A. B. Alexandroff, A. M. Jackson, M. A. O'Donnell, and K. James, "BCG immunotherapy of bladder cancer: 20 years on," *Lancet*, vol. 353, no. 9165, pp. 1689–1694, May 1999, doi: 10.1016/S0140-6736(98)07422-4.
- [182] X. Huang *et al.*, "Bacteria-Based Cancer Immunotherapy," *Advanced Science*, vol. 8, no. 7, Apr. 2021, doi: 10.1002/ADVS.202003572.
- [183] S. Barbé *et al.*, "Secretory production of biologically active rat interleukin-2 by *Clostridium acetobutylicum* DSM792 as a tool for anti-tumor treatment," *FEMS Microbiol Lett*, vol. 246, no. 1, pp. 67–73, May 2005, doi: 10.1016/j.femsle.2005.03.037.

- [184] D. Wei, P. Heus, F. T. van de Wetering, G. van Tienhoven, L. Verleye, and R. J. P. M. Scholten, "Probiotics for the prevention or treatment of chemotherapy- or radiotherapy-related diarrhoea in people with cancer," *Cochrane Database of Systematic Reviews*, vol. 2018, no. 8. John Wiley and Sons Ltd, Aug. 31, 2018. doi: 10.1002/14651858.CD008831.pub3.
- [185] G. Xiong *et al.*, "Novel cancer vaccine based on genes of Salmonella pathogenicity island 2," *Int J Cancer*, vol. 126, no. 11, pp. 2622–2634, Jun. 2010, doi: 10.1002/ijc.24957.
- [186] B. Yu *et al.*, "Explicit hypoxia targeting with tumor suppression by creating an 'obligate' anaerobic Salmonella Typhimurium strain," *Sci Rep*, vol. 2, 2012, doi: 10.1038/srep00436.
- [187] W. Fu, L. Chu, X. Han, X. Liu, and D. Ren, "Synergistic antitumoral effects of human telomerase reverse transcriptase-mediated dual-apoptosis-related gene vector delivered by orally attenuated Salmonella enterica Serovar Typhimurium in murine tumor models," *J Gene Med*, vol. 10, no. 6, pp. 690–701, Jun. 2008, doi: 10.1002/jgm.1191.
- [188] M. Loeffler, G. Le'negrate, M. Krajewska, and J. C. Reed, "IL-18-producing Salmonella inhibit tumor growth," *Cancer Gene Ther*, vol. 15, pp. 787–794, 2008, doi: 10.1038/cgt.2008.48.
- [189] M. Bereta *et al.*, "Improving tumor targeting and therapeutic potential of Salmonella VNP20009 by displaying cell surface CEA-specific antibodies," *Vaccine*, vol. 25, no. 21, pp. 4183–4192, May 2007, doi: 10.1016/j.vaccine.2007.03.008.
- [190] C. N. Kotton and E. L. Hohmann, "Enteric pathogens as vaccine vectors for foreign antigen delivery," *Infection and Immunity*, vol. 72, no. 10. American Society for Microbiology (ASM), pp. 5535–5547, Oct. 2004. doi: 10.1128/IAI.72.10.5535-5547.2004.
- [191] P. Chorobik and J. Bereta, "Bacterial vaccines," *Cancer Therapeutic Targets*, vol. 1–2, pp. 77–94, Jan. 2017, doi: 10.1007/978-1-4419-0717-2_138.
- [192] T. Pradeu and E. L. Cooper, "The danger theory: 20 years later," *Front Immunol*, vol. 3, no. SEP, 2012, doi: 10.3389/FIMMU.2012.00287.
- [193] A. Murao, M. Aziz, H. Wang, M. Brenner, and P. Wang, "Release mechanisms of major DAMPs," *Apoptosis*, vol. 26, no. 3, p. 152, Apr. 2021, doi: 10.1007/S10495-021-01663-3.
- [194] C. Hernandez, P. Huebener, and R. F. Schwabe, "Damage-associated molecular patterns in cancer: A double-edged sword," *Oncogene*, vol. 35, no. 46, p. 5931, Nov. 2016, doi: 10.1038/ONC.2016.104.
- [195] S. J. Gaudino and P. Kumar, "Cross-Talk Between Antigen Presenting Cells and T Cells Impacts Intestinal Homeostasis, Bacterial Infections, and Tumorigenesis," *Front Immunol*, vol. 10, no. MAR, p. 360, 2019, doi: 10.3389/FIMMU.2019.00360.
- [196] L. A. Knodler *et al.*, "Dissemination of invasive Salmonella via bacterial-induced extrusion of mucosal epithelia," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 107, no. 41, pp. 17733–17738, Oct. 2010, doi: 10.1073/PNAS.1006098107/-/DCSUPPLEMENTAL.
- [197] P. Malik-Kale, S. Winfree, and O. Steele-Mortimer, "The Bimodal Lifestyle of Intracellular Salmonella in Epithelial Cells: Replication in the Cytosol Obscures Defects

- in Vacuolar Replication,” *PLoS One*, vol. 7, no. 6, p. 38732, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0038732.
- [198] J. H. Brumell, P. Tang, M. L. Zaharik, and B. B. Finlay, “Disruption of the Salmonella-Containing Vacuole Leads to Increased Replication of Salmonella enterica Serovar Typhimurium in the Cytosol of Epithelial Cells,” *Infect Immun*, vol. 70, no. 6, p. 3264, 2002, doi: 10.1128/IAI.70.6.3264-3270.2002.
- [199] V. Stévenin *et al.*, “Dynamic Growth and Shrinkage of the Salmonella-Containing Vacuole Determines the Intracellular Pathogen Niche,” *Cell Rep*, vol. 29, no. 12, p. 3958, Dec. 2019, doi: 10.1016/J.CELREP.2019.11.049.
- [200] E. V. Shashkova, L. V. Cherenova, D. B. Kazansky, and K. Doronin, “Avian adenovirus vector CELO-TK displays anticancer activity in human cancer cells and suppresses established murine melanoma tumors,” *Cancer Gene Ther*, vol. 12, no. 7, pp. 617–626, Jul. 2005, doi: 10.1038/sj.cgt.7700822.
- [201] I. King, M. Ittersson, and D. Bermudes, “Tumor-targeted salmonella typhimurium overexpressing cytosine deaminase: A novel, tumor-selective therapy,” *Methods in Molecular Biology*, vol. 542, pp. 649–659, 2009, doi: 10.1007/978-1-59745-561-9_33.
- [202] J. E. Kim *et al.*, “Salmonella typhimurium suppresses tumor growth via the pro-inflammatory cytokine interleukin-1 β ,” *Theranostics*, vol. 5, no. 12, pp. 1328–1342, 2015, doi: 10.7150/thno.11432.
- [203] M. C. Chen, C. R. Pangilinan, and C. H. Lee, “Salmonella breaks tumor immune tolerance by downregulating tumor programmed death-ligand 1 expression,” *Cancers (Basel)*, vol. 12, no. 1, Jan. 2020, doi: 10.3390/cancers12010057.
- [204] M. Yang, J. Xu, Q. Wang, A. Q. Zhang, and K. Wang, “An obligatory anaerobic Salmonella typhimurium strain redirects M2 macrophages to the M1 phenotype,” *Oncol Lett*, vol. 15, no. 3, pp. 3918–3922, Mar. 2018, doi: 10.3892/ol.2018.7742.
- [205] S. Kaimala, A. Al-Sbiei, O. Cabral-Marques, M. J. Fernandez-Cabezudo, and B. K. Al-Ramadi, “Attenuated bacteria as immunotherapeutic tools for cancer treatment,” *Front Oncol*, vol. 8, no. MAY, p. 1, May 2018, doi: 10.3389/fonc.2018.00136.
- [206] E. H. Hong *et al.*, “Intratumoral injection of attenuated Salmonella vaccine can induce tumor microenvironmental shift from immune suppressive to immunogenic,” *Vaccine*, vol. 31, no. 10, pp. 1377–1384, Feb. 2013, doi: 10.1016/j.vaccine.2013.01.006.
- [207] I. E. Brodsky, “JAK-ing into M1/M2 Polarization Steers Salmonella-Containing Macrophages Away from Immune Attack to Promote Bacterial Persistence,” *Cell Host Microbe*, vol. 27, no. 1, pp. 3–5, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.chom.2019.12.007.
- [208] Y. W. Yang *et al.*, “Tumor-targeted delivery of a C-terminally truncated FADD (N-FADD) significantly suppresses the B16F10 melanoma via enhancing apoptosis,” *Sci Rep*, vol. 6, no. 1, pp. 1–12, Oct. 2016, doi: 10.1038/srep34178.
- [209] M. Sedighi *et al.*, “Therapeutic bacteria to combat cancer; current advances, challenges, and opportunities,” *Cancer Med*, vol. 8, no. 6, pp. 3167–3181, Jun. 2019, doi: 10.1002/CAM4.2148.

- [210] K. B. Low *et al.*, "Construction of VNP20009: a novel, genetically stable antibiotic-sensitive strain of tumor-targeting Salmonella for parenteral administration in humans.," *Methods Mol Med*, vol. 90, pp. 47–60, 2004, doi: 10.1385/1-59259-429-8:47.
- [211] D. M. Hone *et al.*, "A galE via (Vi antigen-negative) mutant of Salmonella typhi Ty2 retains virulence in humans," *Infect Immun*, vol. 56, no. 5, pp. 1326–1333, 1988, doi: 10.1128/iai.56.5.1326-1333.1988.
- [212] X. Luo *et al.*, "Antitumor Effect of VNP20009, an Attenuated Salmonella, in Murine Tumor Models," *Oncol Res*, vol. 12, pp. 501–508, 2001, Accessed: Jan. 08, 2023. [Online]. Available: www.cognizlmrommunication.com
- [213] K. M. Broadway, T. Modise, R. V. Jensen, and B. E. Scharf, "Complete genome sequence of Salmonella enterica serovar Typhimurium VNP20009, a strain engineered for tumor targeting," *J Biotechnol*, vol. 192 Pt A, no. Part A, pp. 177–178, Dec. 2014, doi: 10.1016/J.JBIOTEC.2014.07.006.
- [214] K. B. Low *et al.*, "Lipid a mutant Salmonella with suppressed virulence and TNF α induction retain tumor-targeting in vivo," *Nat Biotechnol*, vol. 17, no. 1, pp. 37–41, Jan. 1999, doi: 10.1038/5205.
- [215] C. Clairmont *et al.*, "Biodistribution and genetic stability of the novel antitumor agent VNP20009, a genetically modified strain of Salmonella typhimurium," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 181, no. 6, pp. 1996–2002, 2000, doi: 10.1086/315497.
- [216] D. H. Thamm *et al.*, "Systemic administration of an attenuated, tumor-targeting Salmonella typhimurium to dogs with spontaneous neoplasia: Phase I evaluation," *Clinical Cancer Research*, vol. 11, no. 13, pp. 4827–4834, Jul. 2005, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-2510.
- [217] J. F. Toso *et al.*, "Phase I Study of the Intravenous Administration of Attenuated Salmonella typhimurium to Patients With Metastatic Melanoma," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 20, no. 1, pp. 142–152, Jan. 2002, doi: 10.1200/jco.2002.20.1.142.
- [218] "VNP20009 in Treating Patients With Advanced or Metastatic Solid Tumors That Have Not Responded to Previous Therapy - Full Text View - ClinicalTrials.gov." <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00004216> (accessed Nov. 26, 2021).
- [219] M. Bereta *et al.*, "Improving tumor targeting and therapeutic potential of Salmonella VNP20009 by displaying cell surface CEA-specific antibodies," *Vaccine*, vol. 25, no. 21, p. 4183, May 2007, doi: 10.1016/J.VACCINE.2007.03.008.
- [220] Chorobik and Paulina, "Opracowanie metody zwiększenia efektywności bakterii Salmonella typhimurium w terapii przeciwnowotworowej poprzez nadekspresję endogennego białka SipB," Dec. 2010, doi: 10.1000/182.
- [221] T. Ikeda, K. Oosawa, and H. Hotani, "Self-assembly of the Filament Capping Protein, FliD, of Bacterial Flagella into an Annular Structure," *J Mol Biol*, vol. 259, no. 4, pp. 679–686, Jun. 1996, doi: 10.1006/JMBI.1996.0349.
- [222] R. Simon *et al.*, "A scalable method for biochemical purification of Salmonella flagellin," *Protein Expr Purif*, vol. 102, p. 1, 2014, doi: 10.1016/J.PEP.2014.07.005.

- [223] F. Auvray, J. Thomas, G. M. Fraser, and C. Hughes, "Flagellin Polymerisation Control by a Cytosolic Export Chaperone," *J Mol Biol*, vol. 308, no. 2, p. 221, Apr. 2001, doi: 10.1006/JMBI.2001.4597.
- [224] J. R. McQuiston, R. Parrenas, M. Ortiz-Rivera, L. Gheesling, F. Brenner, and P. I. Fields, "Sequencing and Comparative Analysis of Flagellin Genes *fliC*, *fljB*, and *flpA* from *Salmonella*," *J Clin Microbiol*, vol. 42, no. 5, p. 1923, May 2004, doi: 10.1128/JCM.42.5.1923-1932.2004.
- [225] H. R. Bonifield and K. T. Hughes, "Flagellar Phase Variation in *Salmonella enterica* Is Mediated by a Posttranscriptional Control Mechanism," *J Bacteriol*, vol. 185, no. 12, p. 3567, Jun. 2003, doi: 10.1128/JB.185.12.3567-3574.2003.
- [226] V. Rosu and K. T. Hughes, " σ^{28} -dependent transcription in *Salmonella enterica* is independent of flagellar shearing," *J Bacteriol*, vol. 188, no. 14, pp. 5196–5203, Jul. 2006, doi: 10.1128/JB.00299-06/ASSET/8764614E-F274-41B6-A841-8B6AEDF4B79C/ASSETS/GRAPHIC/ZJB0140659110007.JPEG.
- [227] T. Minamino, Y. V. Morimoto, M. Kinoshita, and K. Namba, "Multiple Roles of Flagellar Export Chaperones for Efficient and Robust Flagellar Filament Formation in *Salmonella*," *Front Microbiol*, vol. 12, p. 2887, Oct. 2021, doi: 10.3389/FMICB.2021.756044/BIBTEX.
- [228] G. Paradis *et al.*, "Variability in bacterial flagella re-growth patterns after breakage," *Scientific Reports 2017 7:1*, vol. 7, no. 1, pp. 1–10, Apr. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-01302-5.
- [229] T. T. Renault *et al.*, "Bacterial flagella grow through an injection-diffusion mechanism," *Elife*, vol. 6, Mar. 2017, doi: 10.7554/ELIFE.23136.
- [230] D. M. Widmaier *et al.*, "Engineering the *Salmonella* type III secretion system to export spider silk monomers," *Mol Syst Biol*, vol. 5, p. 309, Jan. 2009, doi: 10.1038/msb.2009.62.
- [231] J. Dobó *et al.*, "Application of a short, disordered n-terminal flagellin segment, a fully functional flagellar type III export signal, to expression of secreted proteins," *Appl Environ Microbiol*, vol. 76, no. 3, pp. 891–899, Feb. 2010, doi: 10.1128/AEM.00858-09.
- [232] N. Kovács, H. Jankovics, and F. Vonderviszt, "Deletion analysis of the flagellum-specific secretion signal in *Salmonella* flagellin," *FEBS Lett*, vol. 592, no. 18, pp. 3074–3081, Sep. 2018, doi: 10.1002/1873-3468.13200.
- [233] L. D. B. Evans, S. Poulter, E. M. Terentjev, C. Hughes, and G. M. Fraser, "A chain mechanism for flagellum growth," *Nature*, vol. 504, no. 7479, pp. 287–290, 2013, doi: 10.1038/nature12682.
- [234] T. Minamino, "Protein export through the bacterial flagellar type III export pathway," *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, vol. 1843, no. 8. Elsevier, pp. 1642–1648, 2014. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.09.005.
- [235] F. Vonderviszt, R. Sajó, J. Dobó, and P. Závodszy, "The use of a flagellar export signal for the secretion of recombinant proteins in *Salmonella*," *Methods in Molecular Biology*, vol. 824, pp. 131–143, 2012, doi: 10.1007/978-1-61779-433-9_6.

- [236] M. Desvaux, M. Hébraud, I. R. Henderson, and M. J. Pallen, "Type III secretion: what's in a name?," *Trends Microbiol*, vol. 14, no. 4, pp. 157–160, Apr. 2006, doi: 10.1016/j.tim.2006.02.009.
- [237] G. R. Cornelis, "The type III secretion injectisome," *Nature Reviews Microbiology* 2006 4:11, vol. 4, no. 11, pp. 811–825, Nov. 2006, doi: 10.1038/nrmicro1526.
- [238] C. Tuerk and L. Gold, "Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase," *Science*, vol. 249, no. 4968, pp. 505–510, 1990, doi: 10.1126/SCIENCE.2200121.
- [239] A. D. Ellington and J. W. Szostak, "In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands," *Nature*, vol. 346, no. 6287, pp. 818–822, 1990, doi: 10.1038/346818A0.
- [240] L. Gold and C. Tuerk, "Methods for identifying nucleic acid ligands," vol. 131, no. 714, Aug. 1992.
- [241] L. Gold *et al.*, "Aptamers and the RNA World, Past and Present," *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 4, no. 3, 2012, doi: 10.1101/CSHPERSPECT.A003582.
- [242] K. D. Kovacevic, J. C. Gilbert, and B. Jilma, "Pharmacokinetics, pharmacodynamics and safety of aptamers," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 134. Elsevier B.V., pp. 36–50, Sep. 01, 2018. doi: 10.1016/j.addr.2018.10.008.
- [243] W.-Y. Lai, B.-T. Huang, J.-W. Wang, P.-Y. Lin, and P.-C. Yang, "A Novel PD-L1-targeting Antagonistic DNA Aptamer With Antitumor Effects," 2016, doi: 10.1038/mtna.2016.102.
- [244] T. Hermann and D. J. Patel, "Adaptive recognition by nucleic acid aptamers," *Science*, vol. 287, no. 5454. American Association for the Advancement of Science, pp. 820–825, Feb. 04, 2000. doi: 10.1126/science.287.5454.820.
- [245] B. Strehlitz, C. Reinemann, S. Linkorn, and R. Stoltenburg, "Aptamers for pharmaceuticals and their application in environmental analytics," *Bioanalytical Reviews*, vol. 4, no. 1. Springer, pp. 1–30, Mar. 2012. doi: 10.1007/s12566-011-0026-1.
- [246] D. R. Davies *et al.*, "Unique motifs and hydrophobic interactions shape the binding of modified DNA ligands to protein targets," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 109, no. 49, pp. 19971–19976, Dec. 2012, doi: 10.1073/pnas.1213933109.
- [247] L. Verdonck, D. Buyst, A. M. de Vries, V. Gheerardijn, A. Madder, and J. C. Martins, "Tethered imidazole mediated duplex stabilization and its potential for aptamer stabilization," *Nucleic Acids Res*, vol. 46, no. 22, pp. 11671–11686, Dec. 2018, doi: 10.1093/nar/gky1062.
- [248] M. R. Dunn, R. M. Jimenez, and J. C. Chaput, "Analysis of aptamer discovery and technology," *Nat Rev Chem*, vol. 1, no. 10, pp. 1–16, Oct. 2017, doi: 10.1038/s41570-017-0076.
- [249] C. Tuerk and L. Gold, "Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase," *Science (1979)*, vol. 249, no. 4968, pp. 505–510, 1990, doi: 10.1126/science.2200121.

- [250] R. Stoltenburg, C. Reinemann, and B. Strehlitz, "SELEX-A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands," *Biomolecular Engineering*, vol. 24, no. 4. *Biomol Eng*, pp. 381–403, Oct. 2007. doi: 10.1016/j.bioeng.2007.06.001.
- [251] S. M. Tsao, J. C. Lai, H. E. Horng, T. C. Liu, and C. Y. Hong, "Generation of Aptamers from A Primer-Free Randomized ssDNA Library Using Magnetic-Assisted Rapid Aptamer Selection," *Scientific Reports 2017 7:1*, vol. 7, no. 1, pp. 1–11, Apr. 2017, doi: 10.1038/srep45478.
- [252] N. Komarova, D. Barkova, and A. Kuznetsov, "Implementation of High-Throughput Sequencing (HTS) in Aptamer Selection Technology," *International Journal of Molecular Sciences 2020, Vol. 21, Page 8774*, vol. 21, no. 22, p. 8774, Nov. 2020, doi: 10.3390/IJMS21228774.
- [253] R. Chinnappan, R. AlZabn, A. K. Fataftah, A. Alhoshani, and M. Zourob, "Probing high-affinity aptamer binding region and development of aptasensor platform for the detection of cylindrospermopsin," *Anal Bioanal Chem*, vol. 412, no. 19, pp. 4691–4701, Jul. 2020, doi: 10.1007/s00216-020-02723-4.
- [254] H. Kaur and L.-Y. L. Yung, "Probing High Affinity Sequences of DNA Aptamer against VEGF165," *PLoS One*, vol. 7, no. 2, p. e31196, Feb. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0031196.
- [255] A. V. Lakhin, V. Z. Tarantul, and L. V. Gening, "Aptamers: Problems, solutions and prospects," *Acta Naturae*, vol. 5, no. 19. Russian Federation Agency for Science and Innovation, pp. 34–43, 2013. doi: 10.32607/20758251-2013-5-4-34-43.
- [256] I. A. Ferreira-Bravo, C. Cozens, P. Holliger, and J. J. DeStefano, "Selection of 2'-deoxy-2'-fluoroarabinonucleotide (FANA) aptamers that bind HIV-1 reverse transcriptase with picomolar affinity," *Nucleic Acids Res*, vol. 43, no. 20, pp. 9587–9599, Oct. 2015, doi: 10.1093/nar/gkv1057.
- [257] S. Gupta *et al.*, "Chemically modified DNA aptamers bind interleukin-6 with high affinity and inhibit signaling by blocking its interaction with interleukin-6 receptor," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 289, no. 12, pp. 8706–8719, Mar. 2014, doi: 10.1074/jbc.M113.532580.
- [258] K. M. Rose *et al.*, "Selection of 2'-Deoxy-2'-Fluoroarabino Nucleic Acid (FANA) Aptamers That Bind HIV-1 Integrase with Picomolar Affinity," *ACS Chem Biol*, vol. 14, no. 10, pp. 2166–2175, Oct. 2019, doi: 10.1021/acscchembio.9b00237.
- [259] E. W. M. Ng, D. T. Shima, P. Calias, E. T. Cunningham, D. R. Guyer, and A. P. Adamis, "Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 5, no. 2. Nature Publishing Group, pp. 123–132, Feb. 2006. doi: 10.1038/nrd1955.
- [260] J. Ruckman *et al.*, "2'-fluoropyrimidine RNA-based aptamers to the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF165): Inhibition of receptor binding and VEGF-induced vascular permeability through interactions requiring the exon 7-encoded domain," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no. 32, pp. 20556–20567, Aug. 1998, doi: 10.1074/jbc.273.32.20556.

- [261] T. Li, F. Yao, Y. An, X. Li, J. Duan, and X. Da Yang, "Novel Complex of PD-L1 Aptamer and Holliday Junction Enhances Antitumor Efficacy in Vivo," *Molecules*, vol. 26, no. 4, Feb. 2021, doi: 10.3390/molecules26041067.
- [262] R. Duangrat, A. Udomprasert, and T. Kangsamaksin, "Tetrahedral DNA nanostructures as drug delivery and bioimaging platforms in cancer therapy," *Cancer Sci*, vol. 111, no. 9, pp. 3164–3173, Sep. 2020, doi: 10.1111/cas.14548.
- [263] J. Kim, J. Hu, A. B. Bezerra, M. D. Holtan, J. C. Brooks, and C. J. Easley, "Protein Quantification Using Controlled DNA Melting Transitions in Bivalent Probe Assemblies," *Anal Chem*, vol. 87, no. 19, pp. 9576–9579, Oct. 2015, doi: 10.1021/acs.analchem.5b03432.
- [264] L. Tian and T. Heyduk, "Bivalent ligands with long nanometer-scale flexible linkers," *Biochemistry*, vol. 48, no. 2, pp. 264–275, Jan. 2009, doi: 10.1021/bi801630b.
- [265] Y. Kim, Z. Cao, and W. Tan, "Molecular assembly for high-performance bivalent nucleic acid inhibitor," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 105, no. 15, pp. 5664–5669, Apr. 2008, doi: 10.1073/pnas.0711803105.
- [266] W. Sheng, T. Chen, W. Tan, and Z. H. Fan, "Multivalent DNA nanospheres for enhanced capture of cancer cells in microfluidic devices," *ACS Nano*, vol. 7, no. 8, pp. 7067–7076, Aug. 2013, doi: 10.1021/nn4023747.
- [267] C. Bai *et al.*, "Aptamer selection and application in multivalent binding-based electrical impedance detection of inactivated H1N1 virus," *Biosens Bioelectron*, vol. 110, pp. 162–167, Jul. 2018, doi: 10.1016/j.bios.2018.03.047.
- [268] J. Zhou and J. Rossi, "Aptamers as targeted therapeutics: Current potential and challenges," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 16, no. 3. Nature Publishing Group, pp. 181–202, Mar. 01, 2017. doi: 10.1038/nrd.2016.199.
- [269] T. Gao and R. Pei, "Isolation of DNA Aptamer Targeting PD-1 with an Antitumor Immunotherapy Effect," *ACS Appl Bio Mater*, vol. 3, no. 10, pp. 7080–7086, Oct. 2020, doi: 10.1021/acsabm.0c00919.
- [270] A. RS, M. M, M. H, P. M, W. L, and A. AP, "Pegaptanib 1-Year Systemic Safety Results from a Safety-Pharmacokinetic Trial in Patients with Neovascular Age-Related Macular Degeneration," *Ophthalmology*, vol. 114, no. 9, 2007, doi: 10.1016/j.ophtha.2007.02.021.
- [271] B. Katz, "A phase II randomized double-masked trial of pegaptanib, an anti-vascular endothelial growth factor aptamer, for diabetic macular edema," *Ophthalmology*, vol. 112, no. 10, pp. 1747–1757, Oct. 2005, doi: 10.1016/j.ophtha.2005.06.007.
- [272] A. V. Lakhin, V. Z. Tarantul, and L. V. Gening, "Aptamers: Problems, Solutions and Prospects," *Acta Naturae*, vol. 5, no. 4, p. 34, 2013, doi: 10.32607/20758251-2013-5-4-34-43.
- [273] H. Sun and Y. Zu, "A Highlight of Recent Advances in Aptamer Technology and Its Application," *Molecules*, vol. 20, no. 7, p. 11959, Jul. 2015, doi: 10.3390/MOLECULES200711959.

- [274] S. Tang, M. Chen, and N. Zheng, "Sub-10-nm Pd nanosheets with renal clearance for efficient near-infrared photothermal cancer therapy," *Small*, vol. 10, no. 15, pp. 3139–3144, Aug. 2014, doi: 10.1002/sml.201303631.
- [275] P. Dhar, R. M. Samarasinghe, and S. Shigdar, "Antibodies, nanobodies, or aptamers— which is best for deciphering the proteomes of non-model species?," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, no. 7. MDPI AG, Apr. 01, 2020. doi: 10.3390/ijms21072485.
- [276] J. M. Healy *et al.*, "Pharmacokinetics and biodistribution of novel aptamer compositions," *Pharm Res*, vol. 21, no. 12, pp. 2234–2246, Dec. 2004, doi: 10.1007/s11095-004-7676-4.
- [277] K. Haruta *et al.*, "A Novel PEGylation Method for Improving the Pharmacokinetic Properties of Anti-Interleukin-17A RNA Aptamers," *Nucleic Acid Ther*, vol. 27, no. 1, pp. 36–44, Feb. 2017, doi: 10.1089/nat.2016.0627.
- [278] C. H. Lee, S. H. Lee, J. H. Kim, Y. H. Noh, G. J. Noh, and S. W. Lee, "Pharmacokinetics of a Cholesterol-conjugated Aptamer Against the Hepatitis C Virus (HCV) NS5B Protein," *Mol Ther Nucleic Acids*, vol. 4, no. 10, p. e254, Oct. 2015, doi: 10.1038/mtna.2015.30.
- [279] X. Hu, L. Mu, Q. Zhou, J. Wen, and J. Pawliszyn, "SsDNA aptamer-based column for simultaneous removal of nanogram per liter level of illicit and analgesic pharmaceuticals in drinking water," *Environ Sci Technol*, vol. 45, no. 11, pp. 4890–4895, Jun. 2011, doi: 10.1021/ES104241Z/SUPPL_FILE/ES104241Z_SI_001.PDF.
- [280] "Report on New Patented Drugs - Macugen." <http://www.pmprb-cepmb.gc.ca/view.asp?ccid=630> (accessed Apr. 06, 2021).
- [281] "Methods and compositions for treating ocular disorders," Jun. 2006.
- [282] P. K. Kulabhusan, B. Hussain, and M. Yüce, "Current perspectives on aptamers as diagnostic tools and therapeutic agents," *Pharmaceutics*, vol. 12, no. 7. MDPI AG, pp. 1–23, Jul. 01, 2020. doi: 10.3390/pharmaceutics12070646.
- [283] P. K. Kulabhusan, B. Hussain, and M. Yüce, "Current Perspectives on Aptamers as Diagnostic Tools and Therapeutic Agents," *Pharmaceutics*, vol. 12, no. 7, pp. 1–23, Jul. 2020, doi: 10.3390/PHARMACEUTICS12070646.
- [284] H. Kaur, J. G. Bruno, A. Kumar, and T. K. Sharma, "Aptamers in the therapeutics and diagnostics pipelines," *Theranostics*, vol. 8, no. 15. Ivyspring International Publisher, pp. 4016–4032, 2018. doi: 10.7150/thno.25958.
- [285] M. Roberto *et al.*, "The role of CXCL12 axis in pancreatic cancer: New biomarkers and potential targets," *Front Oncol*, vol. 13, 2023, doi: 10.3389/FONC.2023.1154581.
- [286] D. Zboralski, K. Hoehlig, D. Eulberg, A. Frömmling, and A. Vater, "Increasing tumor-infiltrating T cells through inhibition of CXCL12 with NOX-A12 synergizes with PD-1 blockade," *Cancer Immunol Res*, vol. 5, no. 11, pp. 950–956, Nov. 2017, doi: 10.1158/2326-6066.CIR-16-0303.
- [287] N. Halama *et al.*, "Phase I/II study with CXCL12 inhibitor NOX-A12 and pembrolizumab in patients with microsatellite-stable, metastatic colorectal or pancreatic cancer," *Annals of Oncology*, vol. 30, p. v231, Oct. 2019, doi: 10.1093/ANNONC/MDZ246.090.

- [288] J. Hoellenriegel *et al.*, "The Spiegelmer NOX-A12, a novel CXCL12 inhibitor, interferes with chronic lymphocytic leukemia cell motility and causes chemosensitization," *Blood*, vol. 123, no. 7, p. 1032, Feb. 2014, doi: 10.1182/BLOOD-2013-03-493924.
- [289] M. Steurer *et al.*, "Olaptosed pegol (NOX-A12) with bendamustine and rituximab: a phase IIa study in patients with relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia," *Haematologica*, vol. 104, no. 10, p. 2053, 2019, doi: 10.3324/HAEMATOL.2018.205930.
- [290] N. Zhao *et al.*, "Oligonucleotide aptamer-drug conjugates for targeted therapy of acute myeloid leukemia," *Biomaterials*, vol. 67, pp. 42–51, Oct. 2015, doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.07.025.
- [291] J. Guo *et al.*, "Aptamer-functionalized PEG-PLGA nanoparticles for enhanced anti-glioma drug delivery," *Biomaterials*, vol. 32, no. 31, pp. 8010–8020, Nov. 2011, doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.07.004.
- [292] A. Prodeus, A. Abdul-Wahid, N. W. Fischer, E. H. B. Huang, M. Cydzik, and J. Gariépy, "Targeting the PD-1/PD-L1 immune evasion axis with DNA aptamers as a novel therapeutic strategy for the treatment of disseminated cancers," *Mol Ther Nucleic Acids*, vol. 4, no. 4, p. e237, Apr. 2015, doi: 10.1038/mtna.2015.11.
- [293] Y. An, X. Li, F. Yao, J. Duan, and X. Da Yang, "Novel Complex of PD-L1 Aptamer and Albumin Enhances Antitumor Efficacy In Vivo," *Molecules*, vol. 27, no. 5, Mar. 2022, doi: 10.3390/MOLECULES27051482.
- [294] A. Zheng *et al.*, "CD16/PD-L1 bi-specific aptamer for cancer immunotherapy through recruiting NK cells and acting as immuncheckpoint blockade," *Mol Ther Nucleic Acids*, vol. 27, pp. 998–1009, Mar. 2022, doi: 10.1016/j.omtn.2022.01.010.
- [295] W. Y. Lai, B. T. Huang, J. W. Wang, P. Y. Lin, and P. C. Yang, "A Novel PD-L1-targeting Antagonistic DNA Aptamer With Antitumor Effects," *Mol Ther Nucleic Acids*, vol. 5, p. e397, Jan. 2016, doi: 10.1038/MTNA.2016.102/ATTACHMENT/7BDD8768-7212-4A1E-97A0-F816DA319B0D/MMC1.DOC.
- [296] T. Li, F. Yao, Y. An, X. Li, J. Duan, and X. da Yang, "Novel Complex of PD-L1 Aptamer and Holliday Junction Enhances Antitumor Efficacy in Vivo," *Molecules*, vol. 26, no. 4, Feb. 2021, doi: 10.3390/molecules26041067.
- [297] Y. Matsumura and H. Maeda, "A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs.," *Cancer Res*, 1986.
- [298] H. Maeda, K. Greish, and J. Fang, "The EPR effect and polymeric drugs: A paradigm shift for cancer chemotherapy in the 21st century," *Advances in Polymer Science*, vol. 193, no. 1, pp. 103–121, 2006, doi: 10.1007/12_026/COVER.
- [299] H. Maeda, G. Y. Bharate, and J. Daruwalla, "Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 71, no. 3, pp. 409–419, Mar. 2009, doi: 10.1016/J.EJPB.2008.11.010.
- [300] H. Wang, C. H. Lam, X. Li, D. L. West, and X. Yang, "Selection of PD1/PD-L1 X-Aptamers," *Biochimie*, vol. 145, p. 125, Feb. 2018, doi: 10.1016/J.BIOCHI.2017.09.006.

- [301] G. L. Lokesh *et al.*, “X-Aptamer selection and validation,” *Methods in Molecular Biology*, vol. 1632, pp. 151–174, 2017, doi: 10.1007/978-1-4939-7138-1_10/COVER.
- [302] C. H. Lam, N. E. Ward, and J. Englehardt, “140. Non-SELEX Bead-Based X-Aptamer Selection,” *Molecular Therapy*, vol. 23, p. S57, May 2015, doi: 10.1016/s1525-0016(16)33745-5.
- [303] R. Yazdian-Robati, M. Ramezani, M. Khedri, N. Ansari, K. Abnous, and S. M. Taghdisi, “An aptamer for recognizing the transmembrane protein PDL-1 (programmed death-ligand 1), and its application to fluorometric single cell detection of human ovarian carcinoma cells,” *Microchimica Acta*, vol. 184, no. 10, pp. 4029–4035, Oct. 2017, doi: 10.1007/s00604-017-2436-4.
- [304] H. Wang, C. H. Lam, X. Li, D. L. West, and X. Yang, “Selection of PD1/PD-L1 X-Aptamers,” *Biochimie*, vol. 145, pp. 125–130, Feb. 2018, doi: 10.1016/j.biochi.2017.09.006.
- [305] J. Li, X. Ren, J. Zhao, and X. Lou, “PD-L1 aptamer isolation via Modular-SELEX and its applications in cancer cell detection and tumor tissue section imaging,” *Analyst*, 2021, doi: 10.1039/d1an00182e.
- [306] X. Zhao *et al.*, “Aptamer-based fluorescent sensors for the detection of cancer biomarkers,” *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, vol. 247, p. 119038, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.saa.2020.119038.
- [307] “Aptamers Cell isolation Protein Precipitation Flow Cytometry.” <https://resources.amsbio.com/Handbook/Aptamer-Cell-and-Protein-Isolation.pdf> (accessed Apr. 22, 2023).
- [308] D. Ngo *et al.*, “Aptamer-Based Proteomic Profiling Reveals Novel Candidate Biomarkers and Pathways in Cardiovascular Disease,” *Circulation*, vol. 134, no. 4, pp. 270–285, Jul. 2016, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.021803.
- [309] M. Sattlecker *et al.*, “Alzheimer’s disease biomarker discovery using SOMAscan multiplexed protein technology,” *Alzheimer’s and Dementia*, vol. 10, no. 6, pp. 724–734, Nov. 2014, doi: 10.1016/j.jalz.2013.09.016.
- [310] R. M. Ostroff *et al.*, “Unlocking biomarker discovery: Large scale application of aptamer proteomic technology for early detection of lung cancer,” *PLoS One*, vol. 5, no. 12, 2010, doi: 10.1371/journal.pone.0015003.
- [311] A. F. Di Narzo *et al.*, “High-Throughput Characterization of Blood Serum Proteomics of IBD Patients with Respect to Aging and Genetic Factors,” *PLoS Genet*, vol. 13, no. 1, Jan. 2017, doi: 10.1371/journal.pgen.1006565.
- [312] J. Candia *et al.*, “Assessment of Variability in the SOMAscan Assay,” *Sci Rep*, vol. 7, no. 1, Dec. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-14755-5.
- [313] E. M. McConnell, J. Nguyen, and Y. Li, “Aptamer-Based Biosensors for Environmental Monitoring,” *Front Chem*, vol. 8, p. 434, May 2020, doi: 10.3389/FCHEM.2020.00434/BIBTEX.
- [314] W. Zheng, X. Liu, Q. Li, Z. Shu, Z. Li, and L. Zhang, “A simple electrochemical aptasensor for saxitoxin detection,” *RSC Adv*, vol. 12, no. 37, pp. 23801–23807, Aug. 2022, doi: 10.1039/D2RA03690H.

- [315] F. Li, Z. Yu, X. Han, and R. Y. Lai, "Electrochemical aptamer-based sensors for food and water analysis: A review," *Analytica Chimica Acta*, vol. 1051. Elsevier B.V., pp. 1–23, Mar. 21, 2019. doi: 10.1016/j.aca.2018.10.058.
- [316] X. Lyu *et al.*, "The global landscape of approved antibody therapies," *Antib Ther*, vol. 5, no. 4, p. 233, Oct. 2022, doi: 10.1093/ABT/TBAC021.
- [317] H. Beck, M. Härter, B. Haß, C. Schmeck, and L. Baerfacker, "Small molecules and their impact in drug discovery: A perspective on the occasion of the 125th anniversary of the Bayer Chemical Research Laboratory," *Drug Discov Today*, vol. 27, no. 6, pp. 1560–1574, Jun. 2022, doi: 10.1016/J.DRUDIS.2022.02.015.
- [318] G. Sun *et al.*, "Role of Small Molecule Targeted Compounds in Cancer: Progress, Opportunities, and Challenges," *Front Cell Dev Biol*, vol. 9, p. 2043, Sep. 2021, doi: 10.3389/FCELL.2021.694363/BIBTEX.
- [319] F. Y. Kreidieh, H. A. Moukadem, and N. S. El Saghir, "Overview, prevention and management of chemotherapy extravasation," *World J Clin Oncol*, vol. 7, no. 1, p. 87, Feb. 2016, doi: 10.5306/WJCO.V7.I1.87.
- [320] S. Stegemann, C. Moreton, S. Svanbäck, K. Box, G. Motte, and A. Paudel, "Trends in oral small-molecule drug discovery and product development based on product launches before and after the Rule of Five," *Drug Discov Today*, vol. 28, no. 2, p. 103344, Feb. 2023, doi: 10.1016/J.DRUDIS.2022.103344.
- [321] W. Lim, B. Mayer, and T. Pawson, "Cell signaling : principles and mechanisms", Accessed: May 13, 2023. [Online]. Available: https://books.google.com/books/about/Cell_Signaling.html?hl=pl&id=xhfhAwAAQBAJ
- [322] G. H. Liu, T. Chen, X. Zhang, X. L. Ma, and H. S. Shi, "Small molecule inhibitors targeting the cancers," *MedComm (Beijing)*, vol. 3, no. 4, p. e181, Dec. 2022, doi: 10.1002/MCO2.181.
- [323] P. Buchwald, "Small-molecule protein–protein interaction inhibitors: Therapeutic potential in light of molecular size, chemical space, and ligand binding efficiency considerations," *IUBMB Life*, vol. 62, no. 10, pp. 724–731, Oct. 2010, doi: 10.1002/IUB.383.
- [324] S. Shaabani *et al.*, "A patent review on PD-1/PD-L1 antagonists: small molecules, peptides, and macrocycles (2015-2018)," *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 2018. doi: 10.1080/13543776.2018.1512706.
- [325] P. G. Sasikumar and M. Ramachandra, "Small-Molecule Immune Checkpoint Inhibitors Targeting PD-1/PD-L1 and Other Emerging Checkpoint Pathways," *BioDrugs*, vol. 32, no. 5. Springer International Publishing, pp. 481–497, Oct. 01, 2018. doi: 10.1007/s40259-018-0303-4.
- [326] J. M. Serra López-Matencio, M. Nieto, M. Baladrón, and A. Castañeda, "Minireview Open Access Drug Interactions Of Monoclonal Antibodies-Clinical Perspective," *J Immunol Sci*, vol. 2, no. 2, pp. 4–7, 2018, doi: 10.4161/19420862.2015.989042.
- [327] B. J. Druker *et al.*, "Activity of a Specific Inhibitor of the BCR-ABL Tyrosine Kinase in the Blast Crisis of Chronic Myeloid Leukemia and Acute Lymphoblastic Leukemia with the

- Philadelphia Chromosome,” *New England Journal of Medicine*, vol. 344, no. 14, pp. 1038–1042, Apr. 2001, doi: 10.1056/NEJM200104053441402.
- [328] P. Chames, M. van Regenmortel, E. Weiss, and D. Baty, “Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future,” *Br J Pharmacol*, vol. 157, no. 2, p. 220, May 2009, doi: 10.1111/J.1476-5381.2009.00190.X.
- [329] K. Imai and A. Takaoka, “Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer,” *Nat Rev Cancer*, vol. 6, no. 9, pp. 714–727, Sep. 2006, doi: 10.1038/NRC1913.
- [330] R. Morgan, P. M. Pirard, L. Shears, J. Sohal, R. Pettengell, and H. S. Pandha, “Antagonism of HOX/PBX dimer formation blocks the in vivo proliferation of melanoma,” *Cancer Res*, vol. 67, no. 12, pp. 5806–5813, Jun. 2007, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4231.
- [331] “US 2016/0340391 A1 - Macrocyclic Inhibitors Of The Pd-1/pd-l1 And Cd80(b7-1)/pd-l1 Protein/protein Interactions - The Lens - Free & Open Patent and Scholarly Search.” <https://www.lens.org/lens/patent/010-995-316-332-767> (accessed Feb. 14, 2021).
- [332] N. S. Gandhi, P. Blancafort, and R. L. Mancera, “Atomistic molecular dynamics simulations of bioactive engrailed 1 interference peptides (EN1-iPeps),” 2018.
- [333] L. Wang *et al.*, “Therapeutic peptides: current applications and future directions,” *Signal Transduct Target Ther*, vol. 7, no. 1, Dec. 2022, doi: 10.1038/S41392-022-00904-4.
- [334] F. Milletti, “Cell-penetrating peptides: Classes, origin, and current landscape,” *Drug Discovery Today*, vol. 17, no. 15–16, pp. 850–860, Aug. 2012. doi: 10.1016/j.drudis.2012.03.002.
- [335] C. Tse *et al.*, “ABT-263: A potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor,” *Cancer Res*, vol. 68, no. 9, pp. 3421–3428, May 2008, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5836.
- [336] M. Chhabra, “Biological therapeutic modalities,” *Translational Biotechnology: A Journey from Laboratory to Clinics*, pp. 137–164, Jan. 2021, doi: 10.1016/B978-0-12-821972-0.00015-0.
- [337] S. Haddadzadegan, F. Dorkoosh, and A. Bernkop-Schnürch, “Oral delivery of therapeutic peptides and proteins: Technology landscape of lipid-based nanocarriers,” *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 182, p. 114097, Mar. 2022, doi: 10.1016/J.ADDR.2021.114097.
- [338] M. Garton, S. Nim, T. A. Stone, K. E. Wang, C. M. Deber, and P. M. Kim, “Method to generate highly stable D-amino acid analogs of bioactive helical peptides using a mirror image of the entire PDB,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 115, no. 7, pp. 1505–1510, Feb. 2018, doi: 10.1073/pnas.1711837115.
- [339] D. M. Veine, H. Yao, D. R. Stafford, K. S. Fay, and D. L. Livant, “A d-amino acid containing peptide as a potent, noncovalent inhibitor of $\alpha 5\beta 1$ integrin in human prostate cancer invasion and lung colonization,” *Clin Exp Metastasis*, vol. 31, no. 4, pp. 379–393, 2014, doi: 10.1007/s10585-013-9634-1.
- [340] L. K. Buckton and S. R. McAlpine, “Improving the Cell Permeability of Polar Cyclic Peptides by Replacing Residues with Alkylated Amino Acids, Asparagines, and d -Amino

- Acids," *Org Lett*, vol. 20, no. 3, pp. 506–509, Feb. 2018, doi: 10.1021/acs.orglett.7b03363.
- [341] H. Zhang and S. Chen, "Cyclic peptide drugs approved in the last two decades (2001–2021)," *RSC Chem Biol*, vol. 3, no. 1, pp. 18–31, Jan. 2022, doi: 10.1039/D1CB00154J.
- [342] L. J. Walport, R. Obexer, and H. Suga, "Strategies for transitioning macrocyclic peptides to cell-permeable drug leads," *Curr Opin Biotechnol*, vol. 48, pp. 242–250, Dec. 2017, doi: 10.1016/J.COPBIO.2017.07.007.
- [343] G. Bhardwaj *et al.*, "Accurate de novo design of membrane-traversing macrocycles," *Cell*, vol. 185, no. 19, pp. 3520–3532.e26, Sep. 2022, doi: 10.1016/J.CELL.2022.07.019.
- [344] E. C. L. de Oliveira, K. S. da Costa, P. S. Taube, A. H. Lima, and C. de S. de S. Junior, "Biological Membrane-Penetrating Peptides: Computational Prediction and Applications," *Front Cell Infect Microbiol*, vol. 12, p. 276, Mar. 2022, doi: 10.3389/FCIMB.2022.838259/BIBTEX.
- [345] C. Bechtler and C. Lamers, "Macrocyclization strategies for cyclic peptides and peptidomimetics," *RSC Med Chem*, vol. 12, no. 8, pp. 1325–1351, Aug. 2021, doi: 10.1039/D1MD00083G.
- [346] A. A. Vinogradov, Y. Yin, and H. Suga, "Macrocyclic Peptides as Drug Candidates: Recent Progress and Remaining Challenges," *J Am Chem Soc*, vol. 141, no. 10, pp. 4167–4181, Mar. 2019, doi: 10.1021/JACS.8B13178.
- [347] M. Gao, K. Cheng, and H. Yin, "Targeting Protein-Protein Interfaces Using Macrocyclic Peptides," *Biopolymers*, vol. 104, no. 4, p. 310, Jul. 2015, doi: 10.1002/BIP.22625.
- [348] D. I. Soumana, N. Kurt Yilmaz, K. L. Prachanronarong, C. Aydin, A. Ali, and C. A. Schiffer, "Structural and Thermodynamic Effects of Macrocyclization in HCV NS3/4A Inhibitor MK-5172," *ACS Chem Biol*, vol. 11, no. 4, p. 900, Apr. 2016, doi: 10.1021/ACSCHEMBIO.5B00647.
- [349] T. A. Hill, N. E. Shepherd, F. Diness, and D. P. Fairlie, "Constraining cyclic peptides to mimic protein structure motifs," *Angew Chem Int Ed Engl*, vol. 53, no. 48, pp. 13020–13041, Nov. 2014, doi: 10.1002/ANIE.201401058.
- [350] J. Yang *et al.*, "Utilization of macrocyclic peptides to target protein-protein interactions in cancer," *Front Oncol*, vol. 12, p. 6291, Nov. 2022, doi: 10.3389/FONC.2022.992171/BIBTEX.
- [351] A. S. Gokhale and S. Satyanarayanajois, "Peptides and peptidomimetics as immunomodulators," *Immunotherapy*, vol. 6, no. 6, p. 755, 2014, doi: 10.2217/IMT.14.37.
- [352] M. Bojko *et al.*, "Design, synthesis and biological evaluation of PD-1 derived peptides as inhibitors of PD-1/PD-L1 complex formation for cancer therapy," *Bioorg Chem*, vol. 128, p. 106047, Nov. 2022, doi: 10.1016/J.BIOORG.2022.106047.
- [353] A. Falanga *et al.*, "Cyclic Peptides as Novel Therapeutic Microbicides: Engineering of Human Defensin Mimetics," *Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry*, vol. 22, no. 7, p. 1217, Jul. 2017, doi: 10.3390/MOLECULES22071217.

- [354] M. A. Abdalla and L. J. McGaw, "Natural Cyclic Peptides as an Attractive Modality for Therapeutics: A Mini Review," *Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry*, vol. 23, no. 8, p. 2080, Aug. 2018, doi: 10.3390/MOLECULES23082080.
- [355] T. R. Oppewal, I. D. Jansen, J. Hekelaar, and C. Mayer, "A Strategy to Select Macrocyclic Peptides Featuring Asymmetric Molecular Scaffolds as Cyclization Units by Phage Display," *J Am Chem Soc*, vol. 144, no. 8, pp. 3644–3652, Mar. 2022, doi: 10.1021/JACS.1C12822/SUPPL_FILE/JA1C12822_SI_001.PDF.
- [356] G. F. Gause and M. G. Brazhnikova, "Gramicidin S and its use in the Treatment of Infected Wounds," *Nature 1944 154:3918*, vol. 154, no. 3918, pp. 703–703, 1944, doi: 10.1038/154703a0.
- [357] M. Góngora-Benítez, J. Tulla-Puche, and F. Albericio, "Multifaceted roles of disulfide bonds. peptides as therapeutics," *Chem Rev*, vol. 114, no. 2, pp. 901–926, Jan. 2014, doi: 10.1021/CR400031Z.
- [358] Y. H. Lau, P. De Andrade, Y. Wu, and D. R. Spring, "Peptide stapling techniques based on different macrocyclisation chemistries," *Chem Soc Rev*, vol. 44, no. 1, pp. 91–102, Jan. 2015, doi: 10.1039/C4CS00246F.
- [359] P. M. Cromm, J. Spiegel, and T. N. Grossmann, "Hydrocarbon stapled peptides as modulators of biological function," *ACS Chem Biol*, vol. 10, no. 6, pp. 1362–1375, Jun. 2015, doi: 10.1021/CB501020R.
- [360] T. A. F. Cardote and A. Ciulli, "Cyclic and Macrocyclic Peptides as Chemical Tools To Recognise Protein Surfaces and Probe Protein–Protein Interactions," *ChemMedChem*, vol. 11, no. 8, p. 787, Apr. 2016, doi: 10.1002/CMDC.201500450.
- [361] T. A. F. Cardote and A. Ciulli, "Cyclic and Macrocyclic Peptides as Chemical Tools To Recognise Protein Surfaces and Probe Protein–Protein Interactions," *ChemMedChem*, vol. 11, no. 8, pp. 787–794, Apr. 2016, doi: 10.1002/CMDC.201500450.
- [362] N. L. Mills, M. D. Daugherty, A. D. Frankel, and R. K. Guy, "An alpha-helical peptidomimetic inhibitor of the HIV-1 Rev-RRE interaction," *J Am Chem Soc*, vol. 128, no. 11, pp. 3496–3497, Mar. 2006, doi: 10.1021/JA0582051.
- [363] G. Gerona-Navarro *et al.*, "Rational design of cyclic peptide modulators of the transcriptional coactivator CBP: A new class of p53 inhibitors," *J Am Chem Soc*, vol. 133, no. 7, pp. 2040–2043, Feb. 2011, doi: 10.1021/JA107761H/SUPPL_FILE/JA107761H_SI_001.PDF.
- [364] Y. Zhang, Q. Zhang, C. T. T. Wong, and X. Li, "Chemoselective Peptide Cyclization and Bicyclization Directly on Un-protected Peptides".
- [365] C. J. White and A. K. Yudin, "Contemporary strategies for peptide macrocyclization," *Nature Chemistry 2011 3:7*, vol. 3, no. 7, pp. 509–524, Jun. 2011, doi: 10.1038/nchem.1062.
- [366] C. A. Rhodes and D. Pei, "Bicyclic Peptides as Next-Generation Therapeutics," *Chemistry*, vol. 23, no. 52, p. 12690, Sep. 2017, doi: 10.1002/CHEM.201702117.

- [367] C. N. Birts *et al.*, "A cyclic peptide inhibitor of C-terminal binding protein dimerization links metabolism with mitotic fidelity in breast cancer cells," *Chem Sci*, vol. 4, no. 8, p. 3046, Aug. 2013, doi: 10.1039/C3SC50481F.
- [368] X. Wu, P. Upadhyaya, M. A. Villalona-Calero, R. Briesewitz, and D. Pei, "Inhibition of Ras-Effector Interaction by Cyclic Peptides," *Medchemcomm*, vol. 4, no. 2, p. 378, Feb. 2013, doi: 10.1039/C2MD20329D.
- [369] V. Martí-Centelles, M. D. Pandey, M. I. Burguete, and S. v. Luis, "Macrocyclization reactions: The importance of conformational, configurational, and template-induced preorganization," *Chem Rev*, vol. 115, no. 16, pp. 8736–8834, Aug. 2015, doi: 10.1021/ACS.CHEMREV.5B00056/ASSET/IMAGES/MEDIUM/CR-2015-000569_0045.GIF.
- [370] A. Thakkar, T. B. Trinh, and D. Pei, "Global analysis of peptide cyclization efficiency," *ACS Comb Sci*, vol. 15, no. 2, pp. 120–129, Feb. 2013, doi: 10.1021/CO300136J/SUPPL_FILE/CO300136J_SI_001.PDF.
- [371] J. M. Smith, F. Vitali, S. A. Archer, and R. Fasan, "Modular assembly of macrocyclic organo-peptide hybrids using synthetic and genetically encoded precursors," *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 50, no. 22, pp. 5075–5080, May 2011, doi: 10.1002/ANIE.201101331.
- [372] A. E. Owens, J. A. Iannuzzelli, Y. Gu, and R. Fasan, "MOrPH-PhD: An Integrated Phage Display Platform for the Discovery of Functional Genetically Encoded Peptide Macrocycles," *ACS Cent Sci*, vol. 6, no. 3, pp. 368–381, Mar. 2020, doi: 10.1021/ACSCENTSCI.9B00927/SUPPL_FILE/OC9B00927_SI_001.PDF.
- [373] J. M. Smith, J. R. Frost, and R. Fasan, "Designer macrocyclic organo-peptide hybrids inhibit the interaction between p53 and HDM2/X by accommodating a functional α -helix," *Chemical Communications*, vol. 50, no. 39, pp. 5027–5030, Apr. 2014, doi: 10.1039/C4CC01199F.
- [374] L. Bendicksen, A. S. Kesselheim, and B. N. Rome, "The Vexing Voyage of Vasopressin: The Consequences of Granting Market Exclusivity to Unapproved Drugs," *Chest*, vol. 162, no. 2, p. 433, Aug. 2022, doi: 10.1016/J.CHEST.2022.02.048.
- [375] H. Zhang and S. Chen, "Cyclic peptide drugs approved in the last two decades (2001–2021)," *RSC Chem Biol*, vol. 3, no. 1, pp. 18–31, Jan. 2022, doi: 10.1039/D1CB00154J.
- [376] "FDA approves treatment to improve kidney function in adults with hepatorenal syndrome | FDA." <https://www.fda.gov/drugs/news-events-human-drugs/fda-approves-treatment-improve-kidney-function-adults-hepatorenal-syndrome> (accessed Jan. 07, 2023).
- [377] A. Delmas, M. Leone, S. Rousseau, J. Albanèse, and C. Martin, "Clinical review: Vasopressin and terlipressin in septic shock patients," *Crit Care*, vol. 9, no. 2, p. 212, Apr. 2005, doi: 10.1186/CC2945.
- [378] M. Matsuzaki, H. Matsushita, K. Tomizawa, and H. Matsui, "Oxytocin: A therapeutic target for mental disorders," *Journal of Physiological Sciences*, vol. 62, no. 6, pp. 441–444, Nov. 2012, doi: 10.1007/S12576-012-0232-9/FIGURES/1.

- [379] "EU/3/12/975 | European Medicines Agency."
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/orphan-designations/eu-3-12-975#overview-section> (accessed Jan. 16, 2023).
- [380] S. Rosales-Ortiz *et al.*, "Carbetocin versus oxytocin for prevention of postpartum haemorrhage: a randomised controlled trial," *The Lancet*, vol. 383, p. S51, Feb. 2014, doi: 10.1016/S0140-6736(14)60314-7.
- [381] M. Muttenthaler, A. Andersson, A. D. de Araujo, Z. Dekan, R. J. Lewis, and P. F. Alewood, "Modulating oxytocin activity and plasma stability by disulfide bond engineering," *J Med Chem*, vol. 53, no. 24, pp. 8585–8596, Dec. 2010, doi: 10.1021/JM100989W.
- [382] E. M. Dykens *et al.*, "Intranasal carbetocin reduces hyperphagia in individuals with Prader-Willi syndrome," *JCI Insight*, vol. 3, no. 12, Jun. 2018, doi: 10.1172/JCI.INSIGHT.98333.
- [383] E. Roof *et al.*, "Intranasal Carbetocin Reduces Hyperphagia, Anxiousness and Distress in Prader-Willi Syndrome: CARE-PWS Phase 3 Trial," *J Clin Endocrinol Metab*, Jan. 2023, doi: 10.1210/CLINEM/DGAD015.
- [384] "Drug Approval Package".
- [385] E. Anglade, "A new agent for the treatment of noninfectious uveitis: rationale and design of three LUMINATE (Lux Uveitis Multicenter Investigation of a New Approach to Treatment) trials of steroid-sparing voclosporin," *Clinical Ophthalmology*, p. 693, Dec. 2008, doi: 10.2147/OPHTH.S2452.
- [386] M. Sanford, "Intrathecal ziconotide: A review of its use in patients with chronic pain refractory to other systemic or intrathecal analgesics," *CNS Drugs*, vol. 27, no. 11, pp. 989–1002, Nov. 2013, doi: 10.1007/S40263-013-0107-5/METRICS.
- [387] S. P. Iyer and F. F. Foss, "Romidepsin for the Treatment of Peripheral T-Cell Lymphoma," *J Adv Pract Oncol*, vol. 6, no. 1, p. 22, Sep. 2015, doi: 10.1634/theoncologist.2015-0043.
- [388] A. K. Singh, A. Bishayee, and A. K. Pandey, "Targeting Histone Deacetylases with Natural and Synthetic Agents: An Emerging Anticancer Strategy," *Nutrients*, vol. 10, no. 6, Jun. 2018, doi: 10.3390/NU10060731.
- [389] H. A. Schmid, "Pasireotide (SOM230): Development, mechanism of action and potential applications," *Mol Cell Endocrinol*, vol. 286, no. 1–2, pp. 69–74, May 2008, doi: 10.1016/J.MCE.2007.09.006.
- [390] J. S. Lim *et al.*, "Effects of Oxytocin on Cell Proliferation in a Corticotroph Adenoma Cell Line," *Endocrinology and Metabolism*, vol. 34, no. 3, p. 302, 2019, doi: 10.3803/ENM.2019.34.3.302.
- [391] T. Morioka, N. D. Loik, C. J. Hipolito, Y. Goto, and H. Suga, "Selection-based discovery of macrocyclic peptides for the next generation therapeutics," *Curr Opin Chem Biol*, vol. 26, pp. 34–41, Jun. 2015, doi: 10.1016/J.CBPA.2015.01.023.
- [392] E. M. Driggers, S. P. Hale, J. Lee, and N. K. Terrett, "The exploration of macrocycles for drug discovery — an underexploited structural class," *Nature Reviews Drug Discovery* 2008 7:7, vol. 7, no. 7, pp. 608–624, Jul. 2008, doi: 10.1038/nrd2590.

- [393] M. R. Arkin, Y. Tang, and J. A. Wells, "Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: Progressing toward the reality," *Chemistry and Biology*, vol. 21, no. 9. Elsevier Ltd, pp. 1102–1114, Sep. 18, 2014. doi: 10.1016/j.chembiol.2014.09.001.
- [394] L. Lo Conte, C. Chothia, and J. Janin, "The atomic structure of protein-protein recognition sites," *J Mol Biol*, vol. 285, no. 5, pp. 2177–2198, Feb. 1999, doi: 10.1006/jmbi.1998.2439.
- [395] K. M. Zak *et al.*, "Structure of the Complex of Human Programmed Death 1, PD-1, and Its Ligand PD-L1," *Structure*, vol. 23, no. 12, pp. 2341–2348, Dec. 2015, doi: 10.1016/j.str.2015.09.010.
- [396] I. S. Moreira, P. A. Fernandes, and M. J. Ramos, "Hot spots--a review of the protein-protein interface determinant amino-acid residues," *Proteins*, vol. 68, no. 4, pp. 803–812, Sep. 2007, doi: 10.1002/PROT.21396.
- [397] J. A. Wells and C. L. McClendon, "Reaching for high-hanging fruit in drug discovery at protein-protein interfaces," *Nature*, vol. 450, no. 7172. Nature Publishing Group, pp. 1001–1009, Dec. 13, 2007. doi: 10.1038/nature06526.
- [398] K. Magiera-Mularz *et al.*, "Macrocyclic Peptide Inhibitor of PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint," *Adv Ther (Weinh)*, p. 2000195, Nov. 2020, doi: 10.1002/adtp.202000195.
- [399] L. Skalniak *et al.*, "Small-molecule inhibitors of PD-1/PD-L1 immune checkpoint alleviate the PD-L1-induced exhaustion of T-cells," *Oncotarget*, vol. 8, no. 42, pp. 72167–72181, Sep. 2017, doi: 10.18632/oncotarget.20050.
- [400] B. S. Zerbe, D. R. Hall, S. Vajda, A. Whitty, and D. Kozakov, "Relationship between hot spot residues and ligand binding hot spots in protein-protein interfaces," *J Chem Inf Model*, vol. 52, no. 8, pp. 2236–2244, Aug. 2012, doi: 10.1021/ci300175u.
- [401] T. Clackson and J. A. Wells, "A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface," *Science (1979)*, vol. 267, no. 5196, pp. 383–386, 1995, doi: 10.1126/science.7529940.
- [402] M. R. Landon, D. R. Lancia, J. Yu, S. C. Thiel, and S. Vajda, "Identification of hot spots within druggable binding regions by computational solvent mapping of proteins," *J Med Chem*, vol. 50, no. 6, pp. 1231–1240, Mar. 2007, doi: 10.1021/jm061134b.
- [403] A. A. Bogan and K. S. Thorn, "Anatomy of hot spots in protein interfaces," *J Mol Biol*, vol. 280, no. 1, pp. 1–9, Jul. 1998, doi: 10.1006/JMBI.1998.1843.
- [404] C. Lamers, "Overcoming the shortcomings of peptide-based therapeutics," <https://doi.org/10.4155/fdd-2022-0005>, vol. 4, no. 2, Jul. 2022, doi: 10.4155/FDD-2022-0005.
- [405] P. G. Dougherty, A. Sahni, and D. Pei, "Understanding Cell Penetration of Cyclic Peptides," *Chemical Reviews*, vol. 119, no. 17. American Chemical Society, pp. 10241–10287, Sep. 11, 2019. doi: 10.1021/acs.chemrev.9b00008.
- [406] H. Lu *et al.*, "Recent advances in the development of protein–protein interactions modulators: mechanisms and clinical trials," *Signal Transduct Target Ther*, vol. 5, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1038/S41392-020-00315-3.

- [407] D. J. Craik, D. P. Fairlie, S. Liras, and D. Price, "The Future of Peptide-based Drugs," *Chem Biol Drug Des*, vol. 81, no. 1, pp. 136–147, Jan. 2013, doi: 10.1111/CBDD.12055.
- [408] M. C. Smith and J. E. Gestwicki, "Features of protein-protein interactions that translate into potent inhibitors: topology, surface area and affinity," *Expert Rev Mol Med*, vol. 14, 2012, doi: 10.1017/ERM.2012.10.
- [409] S. Marqus, E. Pirogova, and T. J. Piva, "Evaluation of the use of therapeutic peptides for cancer treatment," *J Biomed Sci*, vol. 24, no. 1, Mar. 2017, doi: 10.1186/s12929-017-0328-x.
- [410] B. M. Klebl and G. Müller, "Second-generation kinase inhibitors," *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, vol. 9, no. 5, pp. 975–993, Oct. 2005. doi: 10.1517/14728222.9.5.975.
- [411] H. Wang, R. S. Dawber, P. Zhang, M. Walko, A. J. Wilson, and X. Wang, "Peptide-based inhibitors of protein–protein interactions: biophysical, structural and cellular consequences of introducing a constraint," *Chem Sci*, vol. 12, no. 17, p. 5977, May 2021, doi: 10.1039/D1SC00165E.
- [412] F. M. Paulussen and T. N. Grossmann, "Peptide-based covalent inhibitors of protein–protein interactions," *Journal of Peptide Science*, p. e3457, Nov. 2022, doi: 10.1002/PSC.3457.
- [413] M. Wang *et al.*, "Identification of a monoclonal antibody that targets PD-1 in a manner requiring PD-1 Asn58 glycosylation," *Commun Biol*, vol. 2, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/S42003-019-0642-9.
- [414] Edmond, "AUNP-12-A NOVEL PEPTIDE THERAPEUTIC TARGETING PD-1 IMMUNE CHECKPOINT PATHWAY FOR CANCER IMMUNOTHERAPY-STRUCTURE ACTIVITY RELATIONSHIPS & PEPTIDE / PEPTIDOMIMETIC ANALOGS."
- [415] "WO2015044900A1 - Therapeutic immunomodulating compounds - Google Patents." <https://patents.google.com/patent/WO2015044900A1/en?q=WO2015%2F044900+A1> (accessed Feb. 14, 2021).
- [416] "US20150125491A1 - Immunomodulating Cyclic Compounds - Google Patents." <https://patents.google.com/patent/US20150125491A1/en?q=US2015%2F0125491+A1.+2015> (accessed Feb. 14, 2021).
- [417] K. Guzik *et al.*, "Development of the Inhibitors That Target the PD-1/PD-L1 Interaction—A Brief Look at Progress on Small Molecules, Peptides and Macrocycles," *Molecules*, vol. 24, no. 11, p. 2071, May 2019, doi: 10.3390/molecules24112071.
- [418] K. Magiera-Mularz *et al.*, "Bioactive Macrocyclic Inhibitors of the PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 56, no. 44, pp. 13732–13735, Oct. 2017, doi: 10.1002/anie.201707707.
- [419] X. Cheng *et al.*, "Structure and Interactions of the Human Programmed Cell Death 1 Receptor," *J Biol Chem*, vol. 288, no. 17, p. 11771, Apr. 2013, doi: 10.1074/JBC.M112.448126.

- [420] A. Ganesan *et al.*, “Comprehensive in vitro characterization of PD-L1 small molecule inhibitors,” *Scientific Reports 2019 9:1*, vol. 9, no. 1, pp. 1–19, Aug. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-48826-6.
- [421] K. Magiera-Mularz *et al.*, “Human and mouse PD-L1: similar molecular structure, but different druggability profiles,” *iScience*, vol. 24, no. 1, p. 101960, Jan. 2021, doi: 10.1016/J.ISCI.2020.101960.
- [422] W. Barham *et al.*, “A novel humanized PD-1/PD-L1 mouse model permits direct comparison of antitumor immunity generated by FDA-approved PD-1 and PD-L1 inhibitors,” *Immunohorizons*, vol. 7, no. 1, p. 125, Jan. 2023, doi: 10.4049/IMMUNOHORIZONS.2200054.
- [423] N. Jouini, J. Cardinale, and T. L. Mindt, “Evaluation of a Radiolabeled Macrocyclic Peptide as Potential PET Imaging Probe for PD-L1,” *ChemMedChem*, vol. 17, no. 12, p. e202200091, Jun. 2022, doi: 10.1002/CMDC.202200091.
- [424] “Pharmacokinetics, Safety, Tolerability and Pharmacodynamics of BMS-986189 in Healthy Subjects - Full Text View - ClinicalTrials.gov.” <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02739373> (accessed Dec. 08, 2022).
- [425] C. Pan *et al.*, “Recent advance of peptide-based molecules and nonpeptidic small-molecules modulating PD-1/PD-L1 protein-protein interaction or targeting PD-L1 protein degradation,” *Eur J Med Chem*, vol. 213, p. 113170, Mar. 2021, doi: 10.1016/J.EJMECH.2021.113170.
- [426] J. Yang *et al.*, “Utilization of macrocyclic peptides to target protein-protein interactions in cancer,” *Front Oncol*, vol. 12, p. 6291, Nov. 2022, doi: 10.3389/FONC.2022.992171.
- [427] B. Niu *et al.*, “Protein Footprinting and X-ray Crystallography Reveal the Interaction of PD-L1 and a Macrocyclic Peptide,” *Biochemistry*, vol. 59, no. 4, pp. 541–551, Feb. 2020, doi: 10.1021/ACS.BIOCHEM.9B00822.
- [428] “Transformation of Escherichia coli Made Competent by Calcium Chloride Protocol.” Accessed: Mar. 24, 2021. [Online]. Available: <http://www.dnai.org/text/mediashowcase/index2.html?id=1009>
- [429] A. Charbit, “High efficiency transformation of Salmonella typhimurium and Salmonella typhi by electroporation,” 1990.
- [430] A. Y. Chang, V. W. Chau, J. A. Landas, and Yvonne, “Preparation of calcium competent Escherichia coli and heat-shock transformation,” 2017.
- [431] K. A. Datsenko and B. L. Wanner, “One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 97, no. 12, pp. 6640–6645, Jun. 2000, doi: 10.1073/pnas.120163297.
- [432] B. Doublet, G. Douard, H. Targant, D. Meunier, J. Y. Madec, and A. Cloeckert, “Antibiotic marker modifications of λ Red and FLP helper plasmids, pKD46 and pCP20, for inactivation of chromosomal genes using PCR products in multidrug-resistant strains,” *J Microbiol Methods*, vol. 75, no. 2, pp. 359–361, Oct. 2008, doi: 10.1016/J.MIMET.2008.06.010.

- [433] H. Packeiser, C. Lim, B. Balagurunathan, J. Wu, and H. Zhao, "An extremely simple and effective colony PCR procedure for bacteria, yeasts, and microalgae," *Appl Biochem Biotechnol*, vol. 169, no. 2, pp. 695–700, Jan. 2013, doi: 10.1007/s12010-012-0043-8.
- [434] A. A. Miles, S. S. Misra, and J. O. Irwin, "The estimation of the bactericidal power of the blood," *Journal of Hygiene*, vol. 38, no. 6, pp. 732–749, 1938, doi: 10.1017/S002217240001158X.
- [435] F. W.-D. dalam G. Mikrobiologie and undefined 2007, "Theory and measurement of bacterial growth," *researchgate.net*, 2007, Accessed: May 03, 2023. [Online]. Available: https://www.researchgate.net/profile/Yuan-Yeu-Yau/post/How_does_one_determine_OD_of_culture_stock/attachment/59d62d47c49f478072e9e6d9/AS%3A273559224553476%401442233010044/download/Theory+and+Measurement+of+Bacterial+Growth.pdf
- [436] A. M. Edwards and R. C. Massey, "Invasion of human cells by a bacterial pathogen," *Journal of Visualized Experiments*, vol. 49, no. 49, p. 2693, 2011, doi: 10.3791/2693.
- [437] P. Kumar, A. Nagarajan, and P. D. Uchil, "Analysis of cell viability by the lactate dehydrogenase assay," *Cold Spring Harb Protoc*, vol. 2018, no. 6, pp. 465–468, Jun. 2018, doi: 10.1101/pdb.prot095497.
- [438] R. J. Bauer *et al.*, "Comparative analysis of the end-joining activity of several DNA ligases," *PLoS One*, vol. 12, no. 12, p. e0190062, Dec. 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0190062.
- [439] R. L. Maute *et al.*, "Engineering high-affinity PD-1 variants for optimized immunotherapy and immuno-PET imaging," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 112, no. 47, pp. E6506–E6514, Nov. 2015, doi: 10.1073/PNAS.1519623112/-/DCSUPPLEMENTAL.
- [440] F. Vonderviszt, R. Sajó, J. Dobó, and P. Závodszy, "The use of a flagellar export signal for the secretion of recombinant proteins in Salmonella," *Methods in Molecular Biology*, vol. 824, pp. 131–143, 2012, doi: 10.1007/978-1-61779-433-9_6/COVER.
- [441] "Western Blotting Protocol Cell Signaling Technology." <https://www.cellsignal.com/learn-and-support/protocols/protocol-western> (accessed Apr. 21, 2023).
- [442] "MTT Cell Proliferation Assay." Accessed: Mar. 18, 2021. [Online]. Available: www.atcc.org
- [443] S. Hendel *et al.*, "The EMIL project at BESSY II: Beamline design and performance," in *AIP Conference Proceedings*, American Institute of Physics Inc., Jul. 2016. doi: 10.1063/1.4952861.
- [444] U. Mueller *et al.*, "The macromolecular crystallography beamlines at BESSY II of the Helmholtz-Zentrum Berlin: Current status and perspectives," *Eur Phys J Plus*, vol. 130, no. 7, Jul. 2015, doi: 10.1140/epjp/i2015-15141-2.
- [445] T. G. G. Battye, L. Kontogiannis, O. Johnson, H. R. Powell, and A. G. W. Leslie, "iMOSFLM: A new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM," *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, vol. 67, no. 4, pp. 271–281, Apr. 2011, doi: 10.1107/S0907444910048675.

- [446] P. R. Evans, "An introduction to data reduction: Space-group determination, scaling and intensity statistics," *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, vol. 67, no. 4, pp. 282–292, Apr. 2011, doi: 10.1107/S090744491003982X.
- [447] A. J. McCoy, R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams, M. D. Winn, L. C. Storoni, and R. J. Read, "Phaser crystallographic software," *J Appl Crystallogr*, vol. 40, no. 4, pp. 658–674, Jul. 2007, doi: 10.1107/S0021889807021206.
- [448] M. D. Winn *et al.*, "Overview of the CCP4 suite and current developments," *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, vol. 67, no. 4. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, pp. 235–242, Apr. 2011. doi: 10.1107/S0907444910045749.
- [449] G. N. Murshudov *et al.*, "REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures," *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, vol. 67, no. 4, pp. 355–367, Apr. 2011, doi: 10.1107/S0907444911001314.
- [450] E. Bramucci, A. Paiardini, F. Bossa, and S. Pascarella, "PyMod: Sequence similarity searches, multiple sequence-structure alignments, and homology modeling within PyMOL," *BMC Bioinformatics*, vol. 13, no. SUPPL.4, pp. 1–6, Mar. 2012, doi: 10.1186/1471-2105-13-S4-S2.
- [451] "BIOVIA, Dassault Systèmes, Discovery Studio Visualizer Software, Version 4.0. San Diego: Dassault Systèmes,(2012) <http://www.accelrys.com>." 2020.
- [452] S. P. Fling and D. S. Gregerson, "Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea," *Anal Biochem*, vol. 155, no. 1, pp. 83–88, May 1986, doi: 10.1016/0003-2697(86)90228-9.
- [453] J. M. Walker, Ed., "The Protein Protocols Handbook," 2009, doi: 10.1007/978-1-59745-198-7.
- [454] W. H. Dong, T. Y. Wang, F. Wang, and J. H. Zhang, "Simple, time-saving dye staining of proteins for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis using coomassie blue," *PLoS One*, vol. 6, no. 8, p. 22394, 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0022394.
- [455] J. E. Segall, M. D. Manson, and H. C. Berg, "Signal processing times in bacterial chemotaxis," *Nature*, vol. 296, no. 5860, pp. 855–857, 1982, doi: 10.1038/296855A0.
- [456] S. Walker, M. Sojka, M. Dibb-Fuller, and M. Woodward, "Effect of pH, temperature and surface contact on the elaboration of fimbriae and flagella by *Salmonella* serotype Enteritidis," *J Med Microbiol*, vol. 48, no. 3, pp. 253–261, 1999.
- [457] K. T. Hughes, K. L. Gillen, M. J. Semon, and J. E. Karlinsey, "Sensing structural intermediates in bacterial flagellar assembly by export of a negative regulator," *Science*, vol. 262, no. 5137, pp. 1277–1280, 1993, doi: 10.1126/SCIENCE.8235660.
- [458] H. M. Singer, M. Erhardt, and K. T. Hughes, "Comparative analysis of the secretion capability of early and late flagellar type III secretion substrates," *Mol Microbiol*, vol. 93, no. 3, pp. 505–520, 2014, doi: 10.1111/MMI.12675.
- [459] S. Guo, I. Alshamy, K. T. Hughes, and F. F. V. Chevance, "Analysis of Factors That Affect FlgM-Dependent Type III Secretion for Protein Purification with *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium," *J Bacteriol*, vol. 196, no. 13, p. 2333, Jul. 2014, doi: 10.1128/JB.01572-14.

- [460] C. A. Green *et al.*, “Engineering the flagellar type III secretion system: Improving capacity for secretion of recombinant protein,” *Microb Cell Fact*, vol. 18, no. 1, pp. 1–17, Jan. 2019, doi: 10.1186/S12934-019-1058-4/FIGURES/6.
- [461] G. J. Phillips, “New cloning vectors with temperature-sensitive replication,” *Plasmid*, vol. 41, no. 1, pp. 78–81, 1999, doi: 10.1006/plas.1998.1380.
- [462] V. Liss, A. L. Swart, A. Kehl, N. Bö, J. Rg Deiwick, and M. H. Correspondence, “Salmonella enterica Remodels the Host Cell Endosomal System for Efficient Intravacuolar Nutrition,” *Cell Host Microbe*, vol. 21, pp. 390–402, 2017, doi: 10.1016/j.chom.2017.02.005.
- [463] S. S. Agnihothram *et al.*, “Infection of Murine Macrophages by Salmonella enterica Serovar Heidelberg Blocks Murine Norovirus Infectivity and Virus-induced Apoptosis,” *PLoS One*, vol. 10, no. 12, p. 144911, Dec. 2015, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0144911.
- [464] J. A. Freeman, M. E. Ohl, and S. I. Miller, “The Salmonella enterica serovar typhimurium translocated effectors SseJ and SifB are targeted to the Salmonella-containing vacuole,” *Infect Immun*, vol. 71, no. 1, pp. 418–427, Jan. 2003, doi: 10.1128/IAI.71.1.418-427.2003.
- [465] Żyła and Edyta, “Badanie cytotoksycznego wpływu nadekspresji białka SipB w bakteriach Salmonella Typhimurium na zakażone komórki linii monocytarno-makrofagowej RAW264.7,” Jun. 2016, doi: 10.1000/182.
- [466] K. M. Broadway, E. A. P. Denson, R. V. Jensen, and B. E. Scharf, “Rescuing chemotaxis of the anticancer agent Salmonella enterica serovar Typhimurium VNP20009,” *J Biotechnol*, vol. 211, pp. 117–120, Oct. 2015, doi: 10.1016/J.JBIOTEC.2015.07.010.
- [467] K. M. Broadway, S. Suh, B. Behkam, and B. E. Scharf, “Optimizing the restored chemotactic behavior of anticancer agent Salmonella enterica serovar Typhimurium VNP20009,” *J Biotechnol*, vol. 251, pp. 76–83, Jun. 2017, doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.04.006.
- [468] R. R. Lovewell, R. M. Collins, J. L. Acker, G. A. O’Toole, M. J. Wargo, and B. Berwin, “Step-Wise Loss of Bacterial Flagellar Torsion Confers Progressive Phagocytic Evasion,” *PLoS Pathog*, vol. 7, no. 9, p. 1002253, Sep. 2011, doi: 10.1371/JOURNAL.PPAT.1002253.
- [469] S. L. Fink and B. T. Cookson, “Pyroptosis and host cell death responses during Salmonella infection,” *Cell Microbiol*, vol. 9, no. 11, pp. 2562–2570, Nov. 2007, doi: 10.1111/J.1462-5822.2007.01036.X.
- [470] Z. Li *et al.*, “Pyroptosis of Salmonella Typhimurium-infected macrophages was suppressed and elimination of intracellular bacteria from macrophages was promoted by blocking QseC,” *Sci Rep*, vol. 6, no. 1, pp. 1–12, Nov. 2016, doi: 10.1038/srep37447.
- [471] P. Malik-Kale, S. Winfree, and O. Steele-Mortimer, “The Bimodal Lifestyle of Intracellular Salmonella in Epithelial Cells: Replication in the Cytosol Obscures Defects in Vacuolar Replication,” *PLoS One*, vol. 7, no. 6, p. 38732, Jun. 2012, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0038732.

- [472] S. M. Eswarappa, G. Karnam, A. G. Nagarajan, S. Chakraborty, and D. Chakravorty, "Iac Repressor Is an Antivirulence Factor of *Salmonella enterica*: Its Role in the Evolution of Virulence in *Salmonella*," *PLoS One*, vol. 4, no. 6, p. 5789, Jun. 2009, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0005789.
- [473] J. Jin, O. D. Okagu, A. E. G. A. Yagoub, and C. C. Udenigwe, "Effects of sonication on the in vitro digestibility and structural properties of buckwheat protein isolates," *Ultrason Sonochem*, vol. 70, Jan. 2021, doi: 10.1016/J.ULTSONCH.2020.105348.
- [474] L. Tang *et al.*, "Differential degeneration of the ACTAGT sequence among *Salmonella*: a reflection of distinct nucleotide amelioration patterns during bacterial divergence," *Sci Rep*, vol. 7, no. 1, Dec. 2017, doi: 10.1038/S41598-017-11226-9.
- [475] J. R. Gog *et al.*, "Dynamics of *Salmonella* infection of macrophages at the single cell level," *J R Soc Interface*, vol. 9, no. 75, pp. 2696–2707, Oct. 2012, doi: 10.1098/RSIF.2012.0163.
- [476] P. Aldridge, J. Karlinsey, and K. T. Hughes, "The type III secretion chaperone FlgN regulates flagellar assembly via a negative feedback loop containing its chaperone substrates FlgK and FlgL," *Mol Microbiol*, vol. 49, no. 5, pp. 1333–1345, Sep. 2003, doi: 10.1046/J.1365-2958.2003.03637.X.
- [477] E. Zyla, B. Musielak, T. A. Holak, and G. Dubin, "Structural Characterization of a Macrocyclic Peptide Modulator of the PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint Axis," *Molecules*, vol. 26, no. 16, Aug. 2021, doi: 10.3390/MOLECULES26164848.
- [478] V. R. A. P. Reddy, W. Mwangi, Y. Sadigh, and V. Nair, "In vitro Interactions of Chicken Programmed Cell Death 1 (PD-1) and PD-1 Ligand-1 (PD-L1)," *Front Cell Infect Microbiol*, vol. 9, p. 436, Dec. 2019, doi: 10.3389/FCIMB.2019.00436/BIBTEX.
- [479] L. Jia, Q. Zhang, and R. Zhang, "PD-1/PD-L1 pathway blockade works as an effective and practical therapy for cancer immunotherapy," *Cancer Biol Med*, vol. 15, no. 2, p. 116, May 2018, doi: 10.20892/J.ISSN.2095-3941.2017.0086.
- [480] X. Zang, "2018 Nobel Prize in medicine awarded to cancer immunotherapy: Immune checkpoint blockade – A personal account," *Genes Dis*, vol. 5, no. 4, p. 302, Dec. 2018, doi: 10.1016/J.GENDIS.2018.10.003.
- [481] A. B. Ilangala, A. Lechanteur, M. Fillet, and G. Piel, "Therapeutic peptides for chemotherapy: Trends and challenges for advanced delivery systems," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 167, pp. 140–158, Oct. 2021, doi: 10.1016/J.EJPB.2021.07.010.
- [482] A. D. Keefe, S. Pai, and A. Ellington, "Aptamers as therapeutics," *Nat Rev Drug Discov*, vol. 9, no. 7, p. 537, Jul. 2010, doi: 10.1038/NRD3141.
- [483] H. Bao, S. Wang, J. H. Zhao, and S. L. Liu, "Salmonella secretion systems: Differential roles in pathogen-host interactions," *Microbiol Res*, vol. 241, p. 126591, Dec. 2020, doi: 10.1016/J.MICRES.2020.126591.
- [484] H. Wang, Z. Tang, B. Xue, Q. Lu, X. Liu, and Q. Zou, "Salmonella Regulator STM0347 Mediates Flagellar Phase Variation via Hin Invertase," *Int J Mol Sci*, vol. 23, no. 15, Aug. 2022, doi: 10.3390/IJMS23158481.

- [485] D. Elhadad, P. Desai, G. Rahav, M. McClelland, and O. Gal-Mor, "Flagellin is required for host cell invasion and normal Salmonella pathogenicity island 1 expression by Salmonella enterica serovar Paratyphi A," *Infect Immun*, vol. 83, no. 9, pp. 3355–3368, 2015, doi: 10.1128/IAI.00468-15/FORMAT/E PUB.
- [486] J. E. Olsen, K. H. Hoegh-Andersen, J. Casadesús, J. Rosenkranzt, M. S. Chadfield, and L. E. Thomsen, "The role of flagella and chemotaxis genes in host pathogen interaction of the host adapted Salmonella enterica serovar Dublin compared to the broad host range serovar S. Typhimurium," *BMC Microbiol*, vol. 13, no. 1, p. 67, 2013, doi: 10.1186/1471-2180-13-67.
- [487] M. K. Stewart, L. A. Cummings, M. L. Johnson, A. B. Berezow, and B. T. Cookson, "Regulation of phenotypic heterogeneity permits Salmonella evasion of the host caspase-1 inflammatory response," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 108, no. 51, pp. 20742–20747, Dec. 2011, doi: 10.1073/PNAS.1108963108/-/DCSUPPLEMENTAL.
- [488] E. A. Miao *et al.*, "Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 107, no. 7, p. 3076, Feb. 2010, doi: 10.1073/PNAS.0913087107.
- [489] T. Frankenberg, S. Kirschnek, H. Häcker, and G. Häcker, "Phagocytosis-induced apoptosis of macrophages is linked to uptake, killing and degradation of bacteria," *Eur J Immunol*, vol. 38, no. 1, pp. 204–215, Jan. 2008, doi: 10.1002/EJI.200737379.
- [490] L. M. Rocha-Ramírez *et al.*, "Evaluation of Immunomodulatory Activities of the Heat-Killed Probiotic Strain Lactobacillus casei IMAU60214 on Macrophages In Vitro," *Microorganisms*, vol. 8, no. 1, p. 79, Jan. 2020, doi: 10.3390/MICROORGANISMS8010079.
- [491] H. Häcker, C. Fürmann, H. Wagner, and G. Häcker, "Caspase-9/-3 Activation and Apoptosis Are Induced in Mouse Macrophages upon Ingestion and Digestion of Escherichia coli Bacteria," *The Journal of Immunology*, vol. 169, no. 6, pp. 3172–3179, Sep. 2002, doi: 10.4049/JIMMUNOL.169.6.3172.
- [492] T. Minamino, "Hierarchical protein export mechanism of the bacterial flagellar type III protein export apparatus," *FEMS Microbiol Lett*, vol. 365, no. 12, p. 117, Jun. 2018, doi: 10.1093/FEMSLE/FNY117.
- [493] R. M. Macnab, "Type III flagellar protein export and flagellar assembly," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 1694, no. 1–3, pp. 207–217, Nov. 2004, doi: 10.1016/J.BBAMCR.2004.04.005.
- [494] S. Guo, I. Alshamy, K. T. Hughes, and F. F. V. Chevance, "Analysis of factors that affect FlgM-dependent type III secretion for protein purification with Salmonella enterica serovar typhimurium," *J Bacteriol*, vol. 196, no. 13, pp. 2333–2347, 2014, doi: 10.1128/JB.01572-14.
- [495] K. B. Low *et al.*, "Construction of VNP20009: a novel, genetically stable antibiotic-sensitive strain of tumor-targeting Salmonella for parenteral administration in humans.," *Methods Mol Med*, vol. 90, pp. 47–60, 2004, doi: 10.1385/1-59259-429-8:47.
- [496] P. Aldridge, J. Karlinsey, and K. T. Hughes, "The type III secretion chaperone FlgN regulates flagellar assembly via a negative feedback loop containing its chaperone

- substrates FlgK and FlgL," *Mol Microbiol*, vol. 49, no. 5, pp. 1333–1345, Sep. 2003, doi: 10.1046/J.1365-2958.2003.03637.X.
- [497] S. M. Brewer *et al.*, "A Salmonella Typhi RNA thermosensor regulates virulence factors and innate immune evasion in response to host temperature," *PLoS Pathog*, vol. 17, no. 3, p. e1009345, Mar. 2021, doi: 10.1371/JOURNAL.PPAT.1009345.
- [498] C. Hoffmann *et al.*, "In Macrophages, Caspase-1 Activation by SopE and the Type III Secretion System-1 of *S. Typhimurium* Can Proceed in the Absence of Flagellin," *PLoS One*, vol. 5, no. 8, p. 12477, 2010, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0012477.
- [499] E. A. Miao *et al.*, "Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1 β via Ipaf," *Nat Immunol*, vol. 7, no. 6, pp. 569–575, Jun. 2006, doi: 10.1038/NI1344.
- [500] S. Y. Park, M. H. Pontes, and E. A. Groisman, "Flagella-independent surface motility in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 112, no. 6, pp. 1850–1855, Feb. 2015, doi: 10.1073/PNAS.1422938112/SUPPL_FILE/PNAS.201422938SI.PDF.
- [501] S. Malicki *et al.*, "Imaging of Clear Cell Renal Carcinoma with Immune Checkpoint Targeting Aptamer-Based Probe," *Pharmaceuticals*, vol. 15, no. 6, Jun. 2022, doi: 10.3390/PH15060697/S1.
- [502] X. Wang, F. Teng, L. Kong, and J. Yu, "PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes," *Onco Targets Ther*, vol. 9, pp. 5023–5039, Aug. 2016, doi: 10.2147/OTT.S105862.
- [503] B. Szekely *et al.*, "Immunological differences between primary and metastatic breast cancer," *Ann Oncol*, vol. 29, no. 11, pp. 2232–2239, Nov. 2018, doi: 10.1093/ANNONC/MDY399.
- [504] X. Zhang *et al.*, "Differential expressions of PD-1, PD-L1 and PD-L2 between primary and metastatic sites in renal cell carcinoma," *BMC Cancer*, vol. 19, no. 1, Apr. 2019, doi: 10.1186/S12885-019-5578-4.
- [505] S. Batur *et al.*, "Concordance of PD-L1 expression and CD8+ TIL intensity between NSCLC and synchronous brain metastases," *Bosn J Basic Med Sci*, vol. 20, no. 3, pp. 329–335, 2020, doi: 10.17305/BJBMS.2019.4474.
- [506] M. Ruglioni *et al.*, "Nanoscale engagement of immune checkpoint inhibitor PD-L1 in membrane lipid rafts," *bioRxiv*, p. 2022.08.09.503318, Aug. 2022, doi: 10.1101/2022.08.09.503318.
- [507] B. R. Caré and H. A. Soula, "Impact of receptor clustering on ligand binding," *BMC Syst Biol*, vol. 5, p. 48, Mar. 2011, doi: 10.1186/1752-0509-5-48.
- [508] M. P. Humphries *et al.*, "Improving the Diagnostic Accuracy of the PD-L1 Test with Image Analysis and Multiplex Hybridization," *Cancers (Basel)*, vol. 12, no. 5, May 2020, doi: 10.3390/CANCERS12051114.
- [509] F. A. Sidi *et al.*, "PD-L1 Multiplex and Quantitative Image Analysis for Molecular Diagnostics," *Cancers (Basel)*, vol. 13, no. 1, pp. 1–12, Jan. 2021, doi: 10.3390/CANCERS13010029.

- [510] C. Mitteldorf, A. Berisha, M. Tronnier, M. C. Pfaltz, and W. Kempf, "PD-1 and PD-L1 in neoplastic cells and the tumor microenvironment of Merkel cell carcinoma," *J Cutan Pathol*, vol. 44, no. 9, pp. 740–746, Sep. 2017, doi: 10.1111/CUP.12973.
- [511] V. Thivyanathan and D. G. Gorenstein, "Aptamers and the Next Generation of Diagnostic Reagents," *Proteomics Clin Appl*, vol. 6, no. 0, p. 563, Dec. 2012, doi: 10.1002/PRCA.201200042.
- [512] S. Yoon and J. J. Rossi, "Targeted Molecular Imaging Using Aptamers in Cancer," *Pharmaceuticals (Basel)*, vol. 11, no. 3, Sep. 2018, doi: 10.3390/PH11030071.
- [513] Y. J. Choi, J. Y. Park, Y. L. Cho, J. R. Chae, H. Cho, and W. J. Kang, "In vivo positron emission tomography imaging for PD-L1 expression in cancer using aptamer," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 620, pp. 105–112, Sep. 2022, doi: 10.1016/J.BBRC.2022.06.059.
- [514] U. Khalid *et al.*, "Radiolabelled Aptamers for Theranostic Treatment of Cancer," *Pharmaceuticals*, vol. 12, no. 1, Mar. 2019, doi: 10.3390/PH12010002.
- [515] Y. Liu, G. Liu, and D. J. Hnatowich, "A Brief Review of Chelators for Radiolabeling Oligomers," *Materials 2010, Vol. 3, Pages 3204-3217*, vol. 3, no. 5, pp. 3204–3217, May 2010, doi: 10.3390/MA3053204.
- [516] L. Hassanzadeh, S. Chen, and R. N. Veedu, "Radiolabeling of Nucleic Acid Aptamers for Highly Sensitive Disease-Specific Molecular Imaging," *Pharmaceuticals 2018, Vol. 11, Page 106*, vol. 11, no. 4, p. 106, Oct. 2018, doi: 10.3390/PH11040106.
- [517] B. J. Hicke *et al.*, "Tumor Targeting by an Aptamer".
- [518] X. Wu *et al.*, "Cell-SELEX Aptamer for Highly Specific Radionuclide Molecular Imaging of Glioblastoma In Vivo," *PLoS One*, vol. 9, no. 3, Mar. 2014, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0090752.
- [519] K. Wang *et al.*, "Fluorescence image-guided tumour surgery," *Nature Reviews Bioengineering 2023 1:3*, vol. 1, no. 3, pp. 161–179, Feb. 2023, doi: 10.1038/s44222-022-00017-1.
- [520] M. Bauer, M. Strom, D. S. Hammond, and S. Shigdar, "Anything You Can Do, I Can Do Better: Can Aptamers Replace Antibodies in Clinical Diagnostic Applications?," *Molecules*, vol. 24, no. 23, Nov. 2019, doi: 10.3390/MOLECULES24234377.
- [521] Y. S. Borghei, M. Hosseini, M. Dadmehr, S. Hosseinkhani, M. R. Ganjali, and R. Sheikhnejad, "Visual detection of cancer cells by colorimetric aptasensor based on aggregation of gold nanoparticles induced by DNA hybridization," *Anal Chim Acta*, vol. 904, pp. 92–97, Jan. 2016, doi: 10.1016/J.ACA.2015.11.026.
- [522] H. Xing, K. Hwang, J. Li, S. F. Torabi, and Y. Lu, "DNA Aptamer Technology for Personalized Medicine," *Curr Opin Chem Eng*, vol. 4, p. 79, 2014, doi: 10.1016/J.COACHE.2014.01.007.
- [523] A. Natarajan, A. T. Mayer, L. Xu, R. E. Reeves, J. Gano, and S. S. Gambhir, "Novel Radiotracer for ImmunoPET Imaging of PD-1 Checkpoint Expression on Tumor Infiltrating Lymphocytes," *Bioconjug Chem*, vol. 26, no. 10, pp. 2062–2069, Oct. 2015, doi: 10.1021/ACS.BIOCONJCHEM.5B00318.

- [524] X. Guo *et al.*, “Development of ^{99m}Tc-conjugated JS001 antibody for in vivo mapping of PD-1 distribution in murine,” *Bioorg Med Chem Lett*, vol. 29, no. 16, pp. 2178–2181, Aug. 2019, doi: 10.1016/J.BMCL.2019.06.019.
- [525] M. Hettich, F. Braun, M. D. Bartholomä, R. Schirmbeck, and G. Niedermann, “High-Resolution PET Imaging with Therapeutic Antibody-based PD-1/PD-L1 Checkpoint Tracers,” *Theranostics*, vol. 6, no. 10, pp. 1629–1640, 2016, doi: 10.7150/THNO.15253.
- [526] C. G. England *et al.*, “Preclinical Pharmacokinetics and Biodistribution Studies of ⁸⁹Zr-Labeled Pembrolizumab,” *J Nucl Med*, vol. 58, no. 1, pp. 162–168, Jan. 2017, doi: 10.2967/JNUMED.116.177857.
- [527] H. Huang *et al.*, “Evaluation of ¹²⁴I-JS001 for hPD1 immuno-PET imaging using sarcoma cell homografts in humanized mice,” *Acta Pharm Sin B*, vol. 10, no. 7, pp. 1321–1330, Jul. 2020, doi: 10.1016/J.APSB.2020.02.004.
- [528] K. Broos, Q. Lecocq, G. Raes, N. Devoogdt, M. Keyaerts, and K. Breckpot, “Noninvasive imaging of the PD-1:PD-L1 immune checkpoint: Embracing nuclear medicine for the benefit of personalized immunotherapy,” *Theranostics*, vol. 8, no. 13, pp. 3559–3570, 2018, doi: 10.7150/THNO.24762.
- [529] M. M. Yaseen, N. M. Abuharfeil, H. Darmani, and A. Daoud, “Mechanisms of immune suppression by myeloid-derived suppressor cells: The role of interleukin-10 as a key immunoregulatory cytokine,” *Open Biology*, vol. 10, no. 9. Royal Society Publishing, Sep. 01, 2020. doi: 10.1098/rsob.200111.
- [530] X. Ren *et al.*, “PD1 protein expression in tumor infiltrated lymphocytes rather than PDL1 in tumor cells predicts survival in triple-negative breast cancer,” *Cancer Biol Ther*, vol. 19, 2018, doi: 10.1080/15384047.2018.1423919.
- [531] J. M. Jubel, Z. R. Barbati, C. Burger, D. C. Wirtz, and F. A. Schildberg, “The Role of PD-1 in Acute and Chronic Infection,” *Front Immunol*, vol. 11, Mar. 2020, doi: 10.3389/FIMMU.2020.00487.
- [532] S. D. Blackburn *et al.*, “Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection,” *Nat Immunol*, vol. 10, no. 1, pp. 29–37, 2009, doi: 10.1038/NI.1679.
- [533] E. F. Carney, “T-cell exhaustion limits immune reactivity and is associated with good prognosis in autoimmune disease,” *Nature Reviews Nephrology 2015 11:9*, vol. 11, no. 9, pp. 503–503, Jul. 2015, doi: 10.1038/nrneph.2015.115.
- [534] D. R. Ciancio, M. R. Vargas, W. H. Thiel, M. A. Bruno, P. H. Giangrande, and M. B. Mestre, “Aptamers as Diagnostic Tools in Cancer,” *Pharmaceuticals*, vol. 11, no. 3, Sep. 2018, doi: 10.3390/PH11030086.
- [535] Q. Miao, W. Zhang, K. Zhang, H. Li, J. Zhu, and S. Jiang, “Rational design of a potent macrocyclic peptide inhibitor targeting the PD-1/PD-L1 protein-protein interaction,” *RSC Adv*, vol. 11, no. 38, pp. 23270–23279, Jul. 2021, doi: 10.1039/D1RA03118J.
- [536] M. Zuker, “Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction,” *Nucleic Acids Res*, vol. 31, no. 13, p. 3406, Jul. 2003, doi: 10.1093/NAR/GKG595.

- [537] I. Jeddi and L. Saiz, "Three-dimensional modeling of single stranded DNA hairpins for aptamer-based biosensors," *Scientific Reports* 2017 7:1, vol. 7, no. 1, pp. 1–13, Apr. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-01348-5.