

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 wiążą 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 FlhL, FlhD lub FlhM, 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 FlhD-HAC-V w zmutowanych bakteriach 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 jedyne go 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 ${}_{\text{PD-L1}}\text{Met115}$ i ${}_{104}\text{Phe3}$, 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.