
2. Załącznik do wniosku

AUTOREFERAT

Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).

dr Marta Spodzieja
Pracownia Chemii Medycznej
Katedra Chemii Biomedycznej
Wydział Chemii
Uniwersytet Gdański
Gdańsk, 10.09.2024.

SPIS TREŚCI

I.	Imię i nazwisko	3
II.	Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej	3
III.	Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych	3
IV.	Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r.	3
A)	PRZEDMOWA	4
B)	WYKAZ PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE ORAZ MÓJ WKŁAD W ICH POWSTANIE.....	5
C)	PUBLIKACJE UZUPEŁNIAJĄCE ZWIĄZANE Z TEMATYKĄ PREZENTOWANEGO OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO.....	10
D)	FINASOWANIE BADAŃ	11
E)	OPIS OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO ZAPREZENTOWANEGO W SERII POWIĄZANYCH ZE SOBĄ PUBLIKACJI (H1 – H12)	13
1.	WPROWADZENIE LITERATUROWE.....	13
1.1.	UKŁAD IMMUNOLOGICZNY	13
1.2.	PUNKTY KONTROLNE UKŁADU IMMUNOLOGICZNEGO I ICH ROLA W CHOROBYCH NOWOTWOROWYCH ORAZ IMMUNOTERAPII.....	16
1.3.	BUDOWA I FUNKCJA BIAŁEK BTLA I HVEM.....	17
1.4.	KOMPLEKS BTLA/HVEM.....	20
1.5.	BUDOWA I FUNKCJA BIAŁEK PD-1 I PD-L1	22
1.6.	KOMPLEKS PD-1/PD-L1	23
2.	CEL NAUKOWY PROWADZONYCH BADAŃ	24
3.	OMÓWIENIE OTRZYMANÝCH WYNIKÓW	25
3.1.	PEPTYDOWE INHIBITORY WIĄZANIA SIĘ BIAŁEK BTLA/HVEM.....	25
3.1.1.	PEPTYDY ZAPROJEKTOWANE NA PODSTAWIE SEKWENCJI AMINOKWASOWEJ BIAŁKA HVEM, KTÓRYCH CELEM MOLEKULARNYM JEST BIAŁKO BTLA.....	26
3.1.2.	PEPTYDY ZAPROJEKTOWANE NA PODSTAWIE SEKWENCJI AMINOKWASOWEJ BIAŁKA BTLA, KTÓRYCH CELEM MOLEKULARNYM JEST BIAŁKO HVEM.....	30
3.1.3.	PEPTYDY ZAPROJEKTOWANE NA PODSTAWIE SEKWENCJI AMINOKWASOWEJ GLIKOPROTEIN D, KTÓRYCH CELEM MOLEKULARNYM JEST BIAŁKO HVEM.....	34
3.1.4.	WPLYW WYBRANYCH PEPTYDÓW NA FUNKCJĘ LIMFOCYTÓW T POCHODZĄCYCH OD OSÓB ZDROWYCH ORAZ CHORYCH NA CZERNIAKA.	
	38	
3.2.	PEPTYDOWE INHIBITORY WIĄZANIA SIĘ BIAŁEK PD-1/PD-L1	41

3.2.1. PEPTYDY ZAPROJEKTOWANE NA PODSTAWIE SEKWENCJI AMINOKWASOWEJ BIAŁKA PD-1, KTÓRYCH CELEM MOLEKULARNYM JEST BIAŁKO PD-L1	42
3.2.2. PEPTYDY ZAPROJEKTOWANE NA PODSTAWIE SEKWENCJI AMINOKWASOWEJ BIAŁKA PD-L1, KTÓRYCH CELEM MOLEKULARNYM JEST BIAŁKO PD-1.....	44
4. WSPÓLPRACA NAUKOWA.....	46
5. PODSUMOWANIE	47
F) OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO – BADAWCZYCH ..	49
G) DANE NAUKOMETRYCZNE WSZYSTKICH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH	54
H) DALSZE PLANY NAUKOWO – BADAWCZE	55
V. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.....	56
VI. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.....	60
A) OSIĄGNIĘCIA DYDAKTYCZNE.....	60
B) OSIĄGNIĘCIA ORGANIZACYJNE.....	60
C) OSIĄGNIĘCIA POPULARYZUJĄCE NAUKĘ.....	61

I. Imię i nazwisko

Marta Spodzieja

II. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

1. Dyplom magistra chemii, Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii, 2007. Tytuł pracy magisterskiej: „*Badania wpływu mostków solnych na stabilność fragmentu helikalnego ludzkiej cystatyny C*”; promotor: dr hab. Aneta Szymańska.
2. Dyplom doktora nauk chemicznych w dyscyplinie chemia, Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii, 2012. Tytuł rozprawy doktorskiej: „*Charakterystyka kompleksu ludzkiej cystatyny C (hCC) z surowiczym białkiem amyloidu A (SAA)*”; promotor: prof. dr hab. Zbigniew Grzonka.

III. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych

Starszy referent techniczny – 20.02.2012–25.12.2012, Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii;
Specjalista – 01.03.2013–30.09.2015, Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii, zatrudnienie z projektów;

Asystent – 01.10.2015–30.09.2016, Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii, zatrudnienie z projektów;

Adiunkt – 01.10.2016–obecnie, Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii.

IV. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r.

Na przedstawione osiągnięcie naukowe z zakresu chemii pt. „*Projektowanie, synteza i badanie aktywności peptydowych inhibitorów punktów kontrolnych układu immunologicznego BTLA/HVEM oraz PD-1/PD-L1*” składa się cykl 12 publikacji naukowych o spójnej tematyce [H1 – H12]. Dziesięć z tych prac opisuje wyniki prowadzonych przez mnie badania, natomiast dwie z nich są to prace przeglądowe, które związane są z tematyką prezentowanego osiągnięcia. Wyniki badań, stanowiących przedstawione osiągnięcie naukowe, zostały opublikowane w recenzowanych artykułach zamieszczonych w czasopiśmie znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR), ich sumaryczny

współczynnik wpływu (IF) wynosi 64,2 a punkty Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW) wynoszą 1340. Wykaz publikacji przedstawiony jest w porządku chronologicznym natomiast pełne teksty publikacji oraz oświadczenia współautorów znajdują się w załączniku 4: „*Kopie publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe oraz oświadczenia o wkładzie współautorów w powstanie publikacji*”. Pozostałe osiągnięcia naukowe przedstawione zostały w punkcie IV F przedstawionego autoreferatu, a ich wykaz oraz wkład jaki wniosłam w ich powstanie znajduje się w załączniku 3: „*Wykaz osiągnięć naukowych lub artystycznych, stanowiący znaczny wkład w rozwój określonej dyscypliny*”.

A) PRZEDMOWA

Punkty kontrolne układu immunologicznego są to białka, które znajdują się na powierzchni komórek układu odpornościowego. Należą do nich między innymi takie receptory jak BTLA i PD-1 oraz ich ligandy HVEM i PD-L1. W wyniku oddziaływania receptorów z ich ligandami, układ odpornościowy reguluje odpowiedź immunologiczną, zapewniając homeostazę organizmu. W pewnych warunkach oddziaływania takie mogą się jednak przyczyniać do rozwoju chorób nowotworowych, autoimmunologicznych lub odrzucania przeszczepów, dlatego też prowadzone są liczne badania, mające na celu znalezienie inhibitorów wiązania się tych molekuł.

W prowadzonych przez mnie badaniach zajmowałam się projektowaniem, syntezą, oczyszczaniem oraz charakterystyką peptydów – potencjalnych inhibitorów wiązania się białek BTLA/HVEM oraz PD-1/PD-L1. Do zaprojektowania związków wykorzystałam struktury krystaliczne kompleksów tych białek. W ramach prowadzonych prac otrzymałam 87 peptydów, z których znaczna część posiada w swojej strukturze jeden lub dwa mostki disulfidowe. Mostki te naturalnie występują w strukturze białek, na podstawie których, projektowałam inhibitory lub też wprowadziłam je do peptydów, poprzez wymianę wybranych reszt aminokwasowych. Wszystkie peptydy zsyntezowałam na fazie stałej, z wykorzystaniem automatycznych syntezyatorów peptydów oraz oczyściłam przy wykorzystaniu wysokosprawnej chromatografii ciekowej na fazach odwróconych. Następnie, część z nich poddałam utlenianiu, w celu utworzenia mostków disulfidowych i ponownie oczyściłam. Czystość otrzymanych związków sprawdziłam przy wykorzystaniu wysokosprawnej chromatografii ciekowej a ich tożsamość potwierdziłam przy wykorzystaniu spektrometrii mas. Dla części związków konieczne były wielokrotne syntezy i oczyszczania, w celu otrzymania ich odpowiedniej ilości do dalszych badań. Wiązanie się peptydów z celem molekularnym badałam przy wykorzystaniu

plazmonowego rezonansu powierzchniowego, chromatografii powinowactwa lub testów immunoenzymatycznych. Ich zdolność do hamowania tworzenia kompleksów receptor – ligand określiłam natomiast przy wykorzystaniu testów immunoenzymatycznych oraz testów komórkowych. Przed wykonaniem badań komórkowych sprawdziłam cytotoksyczność peptydów względem wykorzystywanych w testach komórek oraz ich stabilność. Określiłam również strukturę trzeciorzędową i zbadalam bezpieczeństwo biologiczne tych związków, które wykazywały najlepszy potencjał hamujący względem badanych punktów kontrolnych. Dla wybranych peptydów wykonałam również badania na limfocytach T, otrzymanych od osób zdrowych oraz chorych na czerniaka. Sprawdziłam ich wpływ na funkcje komórek T, takie jak ekspresja markerów aktywacji, proliferacja, apoptoza, powstawanie komórek pamięci i profil wydzielniczy. Przeprowadzone badania pozwoliły mi uzyskać dwa związki, inhibitory wiązania się białek BTLA/HVEM, które są w stanie wpływać na funkcję limfocytów T zarówno osób zdrowych jak i chorych na czerniaka. Są to pierwsze opisane w literaturze peptydy, hamujące wiązanie się białek BTLA i HVEM, które posiadają również potencjał immunomodulacyjny.

Cześć badań, opisanych w publikacjach stanowiących osiągnięcie naukowe, wykonałam samodzielnie, inne wykonane zostały przez poszczególnych członków zespołu badawczego. We wszystkich przedstawionych pracach zajmowałam się jednak koncepcją i planowaniem badań, koordynowaniem prowadzonych prac i eksperymentów, analizą otrzymanych wyników oraz pisaniami i redagowaniem manuskryptów. Siedem z dziesięciu prac, opisujących wyniki prowadzonych przez mnie badań, zostało finansowanych (całkowicie – 5 lub częściowo – 2) z projektu SONATA 13, który uzyskałam z Narodowego Centrum Nauki (NCN).

B) WYKAZ PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE ORAZ MÓJ WKŁAD W ICH POWSTANIE

H1. Spodzieja M, Lach S, Iwaszkiewicz J, Cesson V, Kalejta K, Olive D, Michielin O, Speiser DE, Zoete V, Derré L[✉], Rodziewicz-Motowidło S[✉]. *Design of short peptides to block BTLA/HVEM interactions for promoting anticancer T-cell responses*. PLoS One. 2017; 12(6):e0179201. doi: 10.1371/journal.pone.0179201; [IF – 2,8; punkty MNiSW – 40]

Liczba cytowań: Web of Science – 28; Scopus – 28; Google Scholar – 37

Liczba cytowań bez autocytowań: Web of Science – 22; Scopus – 18; Google Scholar – 29

Mój udział w tej pracy polegał na: syntezie, oczyszczaniu i charakterystyce peptydów wykorzystywanych do badań (prace wykonywane wspólnie z dr Sławomirem Lachem); wykonaniu testów powinowactwa i testów Ellmana (prace wykonywane wspólnie z dr Katarzyną Kuncewicz (nazwisko panieńskie: Kalejta)); przygotowaniu peptydów do pomiarów dichroizmu kołowego; opracowaniu otrzymanych wyników. Zajmowałam się również planowaniem eksperymentów; przygotowałam wstępną wersję manuskryptu (wspólnie z dr Laurent Derré); brałam udział w redagowaniu wersji końcowej i przygotowywaniu odpowiedzi na recenzje.

H2. Spodzieja M, Kuncewicz K, Sieradzan A, Karczyńska A, Iwaszkiewicz J, Cesson V, Węgrzyn K, Zhukov I, Maszota-Zieleniak M, Michielin O, Speiser DE, Zoete V, Derré L[✉], Rodziewicz-Motowidło S[✉]. *Disulfide-Linked Peptides for Blocking BTLA/HVEM Binding*. Int J Mol Sci. 2020; 21(2):636. doi: 10.3390/ijms21020636; [IF – 6,0; punkty MNiSW – 140]

Liczba cytowań: Web of Science – 15; Scopus – 16; Google Scholar – 19

Liczba cytowań bez autocytowań: Web of Science – 8; Scopus – 6; Google Scholar – 11

Mój udział w tej pracy polegał na: planowaniu badań i eksperymentów; zaprojektowaniu, zsyntezowaniu, oczyszczeniu i scharakteryzowaniu peptydów wykorzystywanych w badaniach; wykonaniu testów powinowactwa i przygotowaniu związków do pomiarów SPR (prace wykonywane wspólnie z dr Katarzyną Kuncewicz); opracowaniu otrzymanych wyników. Przygotowałam również wstępną wersję manuskryptu, brałam udział w redagowaniu wersji końcowej manuskryptu i przygotowywaniu odpowiedzi na recenzje. Opisane badania sfinansowane zostały częściowo przez NCN, w ramach projektu, którego byłam kierownikiem.

H3. Kuncewicz K, Battin C, Sieradzan A, Karczyńska A, Orlikowska M, Wardowska A, Pikuła M, Steinberger P, Rodziewicz-Motowidło S, **Spodzieja M**[✉]. *Fragments of gD Protein as Inhibitors of BTLA/HVEM Complex Formation-Design, Synthesis, and Cellular Studies*. Int J Mol Sci. 2020; 21(22):8876. doi: 10.3390/ijms21228876; [IF – 6,0; punkty MNiSW – 140]

Liczba cytowań: Web of Science – 10; Scopus – 11; Google Scholar – 12

Liczba cytowań bez autocytowań: Web of Science – 2; Scopus – 2; Google Scholar – 3

Mój udział w tej pracy polegał na: zaprojektowaniu związków (wspólnie z dr Martą Orlikowską); stworzeniu koncepcji badań; planowaniu i nadzorowaniu wszystkich prowadzonych eksperymentów oraz analizie otrzymanych wyników. Uczestniczyłam również w syntezie, oczyszczaniu i charakterystyce peptydów wykorzystywanych do

badania oraz wykonaniu testów powinowactwa oraz stabilności (prace wykonywane wspólnie z dr Katarzyną Kuncewicz). Przygotowałam wstępną wersję manuskryptu, brałam udział w redagowaniu wersji końcowej i przygotowałam odpowiedzi na recenzje. Opisane badania sfinansowane zostały przez NCN, w ramach projektu, którego byłam kierownikiem.

H4. Kuncewicz K, Battin C, Węgrzyn K, Sieradzan A, Wardowska A, Sikorska E, Giedrojc I, Smardz P, Pikula M, Steinberger P, Rodziewicz-Motowidlo S, **Spodzieja M**[✉]. *Targeting the HVEM protein using a fragment of glycoprotein D to inhibit formation of the BTLA/HVEM complex*. *Bioorg Chem.* 2022; 122:105748. doi: 10.1016/j.bioorg.2022.105748; [IF – 5,1; punkty MNiSW – 100]

Liczba cytowań: Web of Science – 9; Scopus – 9; Google Scholar – 11

Liczba cytowań bez autocytoowań: Web of Science – 4; Scopus – 4; Google Scholar – 5

Mój udział w tej pracy polegał na: zaprojektowaniu związków; stworzeniu koncepcji badań; planowaniu i nadzorowaniu wszystkich prowadzonych eksperymentów oraz analizie otrzymanych wyników. Uczestniczyłam również w syntezie, oczyszczaniu i charakterystyce peptydów wykorzystywanych do badań (prace wykonywane wspólnie z dr Katarzyną Kuncewicz oraz mgr Irmą Giedrojc); badaniach stabilności i pomiarach SPR (prace wykonywane wspólnie z dr Katarzyną Kuncewicz). Przygotowałam wstępną wersję manuskryptu, brałam udział w redagowaniu wersji końcowej i przygotowałam odpowiedzi na recenzje. Opisane badania sfinansowane zostały przez NCN, w ramach projektu, którego byłam kierownikiem.

H5. Wojciechowicz K, **Spodzieja M**, Lisowska KA, Wardowska A[✉]. *The role of the BTLA-HVEM complex in the pathogenesis of autoimmune diseases*. *Cell Immunol.* 2022; 376:104532. doi: 10.1016/j.cellimm.2022.104532; [IF – 4,3; punkty MNiSW – 100]; praca przeglądowa

Liczba cytowań: Web of Science – 19; Scopus – 19; Google Scholar – 24

Liczba cytowań bez autocytoowań: Web of Science – 15; Scopus – 14; Google Scholar – 20

Mój udział w tej pracy polegał na zebraniu i analizie literatury oraz napisaniu części publikacji. Uczestniczyłam również w redagowaniu końcowej wersji manuskryptu i pisaniu odpowiedzi na recenzje.

H6. Bojko M, Węgrzyn K, Sikorska E, Kocikowski M, Parys M, Battin C, Steinberger P, Kogut MM, Winnicki M, Sieradzan AK, **Spodzieja M**[✉], Rodziewicz-Motowidlo S[✉]. *Design,*

synthesis and biological evaluation of PD-1 derived peptides as inhibitors of PD-1/PD-L1 complex formation for cancer therapy. Bioorg Chem. 2022; 128:106047. doi: 10.1016/j.bioorg.2022.106047; [IF – 5,1; punkty MNiSW – 100]

Liczba cytowań: Web of Science – 8; Scopus – 12; Google Scholar – 14

Liczba cytowań bez autocytowań: Web of Science – 7; Scopus – 10; Google Scholar – 13

Mój udział w tej pracy polegał na: zaprojektowaniu związków, stworzeniu koncepcji i planu badań; planowaniu i koordynowaniu eksperymentów oraz analizie otrzymanych wyników. Zajmowałam się również resynteza części związków; uczestniczyłam w badaniach komórkowych; przygotowywałam część związków do pomiarów SPR. Przygotowałam wstępną wersję manuskryptu (wspólnie z dr Magdaleną Bojko), brałam udział w redagowaniu wersji końcowej i przygotowywaniu odpowiedzi na recenzje.

H7. Kuncewicz K, Bojko M, Battin C, Karczyńska A, Sieradzan A, Sikorska E, Węgrzyn K, Wojciechowicz K, Wardowska A, Steinberger P, Rodziewicz-Motowidło S, **Spodzieja M**✉. *BTLA-derived peptides as inhibitors of BTLA/HVEM complex formation - design, synthesis and biological evaluation*. Biomed Pharmacother. 2023; 165:115161. doi: 10.1016/j.biopha.2023.115161; [IF – 7,5; punkty MNiSW – 140]

Liczba cytowań: Web of Science – 5; Scopus – 5; Google Scholar – 7

Liczba cytowań bez autocytowań: Web of Science – 1; Scopus – 1; Google Scholar – 2

Mój udział w tej pracy polegał na: zaprojektowaniu związków; stworzeniu koncepcji badań; planowaniu i nadzorowaniu wszystkich prowadzonych eksperymentów oraz analizie otrzymanych wyników. Uczestniczyłam również w syntezie, oczyszczaniu i charakterystyce peptydów wykorzystywanych do badań, pomiarach SPR oraz badaniach cytotoksyczności i stabilności peptydów (prace wykonywane wspólnie z dr Katarzyną Kuncewicz). Przygotowałam wstępną wersję manuskryptu, brałam udział w redagowaniu wersji końcowej i przygotowałam odpowiedzi na recenzje. Opisane badania sfinansowane zostały przez NCN, w ramach projektu, którego byłam kierownikiem.

H8. Wojciechowicz K, Kuncewicz K, Lisowska KA, Wardowska A✉, **Spodzieja M**✉. *Peptides targeting the BTLA-HVEM complex can modulate T cell immune response*. Eur J Pharm Sci. 2024; 1:193:106677. doi: 10.1016/j.ejps.2023.106677; [IF – 4,3; punkty MNiSW – 100]

Liczba cytowań: Web of Science – 3; Scopus – 3; Google Scholar – 3

Liczba cytowań bez autocytowań: Web of Science – 0; Scopus – 0; Google Scholar – 0

Mój udział w tej pracy polegał na: stworzeniu planu i koncepcji badań (wspólnie z dr hab. Anna Wardowską); syntezie, oczyszczaniu i charakterystyce peptydów wykorzystywanych do badań (prace wykonywane wspólnie z dr Katarzyną Kuncewicz); analizie wyników otrzymanych z przeprowadzonych eksperymentów. Brałam również udział w przygotowaniu manuskryptu, jego edycji oraz pisaniu odpowiedzi na recenzje. Opisane badania zostały sfinansowane przez NCN, w ramach dwóch projektów: SONATA 13 – którego byłam kierownikiem oraz OPUS 22 – którego jestem kierownikiem ze strony UG.

H9. Bojko M, Węgrzyn K, Sikorska E, Ciura P, Battin C, Steinberger P, Magiera-Mularz K, Dubin G, Kulesza A, Sieradzan AK, **Spodzieja M**[✉], Rodziewicz-Motowidło S[✉]. *Peptide-based inhibitors targeting the PD-1/PD-L1 axis: potential immunotherapeutics for cancer*. *Transl Oncol.* 2024; 42:101892. doi: 10.1016/j.tranon.2024.101892; [IF – 4,5; punkty MNiSW – 100]

Liczba cytowań: Web of Science – 2; Scopus – 2; Google Scholar – 2

Liczba cytowań bez autocytowań: Web of Science – 2; Scopus – 2; Google Scholar – 2

Mój udział w tej pracy polegał na: zaprojektowaniu związków, stworzeniu koncepcji i planu badań; planowaniu i koordynowaniu eksperymentów oraz analizie otrzymanych wyników. Zajmowałam się również resyntezą części związków i przygotowywałam część związków do pomiarów SPR. Przygotowałam wstępną wersję manuskryptu (wspólnie z dr Magdaleną Bojko), brałam udział w redagowaniu wersji końcowej i przygotowywaniu odpowiedzi na recenzje.

H10. Wojciechowicz K[✉], **Spodzieja M**, Wardowska A[✉]. *The BTLA-HVEM complex - The future of cancer immunotherapy*. *Eur J Med Chem.* 2024; 268:116231. doi: 10.1016/j.ejmech.2024.116231; [IF – 6,0; punkty MNiSW – 140]; praca przeglądowa

Liczba cytowań: Web of Science – 4; Scopus – 4; Google Scholar – 4

Liczba cytowań bez autocytowań: Web of Science – 2; Scopus – 2; Google Scholar – 2

Mój udział w tej pracy polegał na zebraniu i analizie literatury, napisaniu części publikacji, przygotowaniu rysunków. Uczestniczyłam również w redagowaniu końcowej wersji manuskryptu i pisaniu odpowiedzi na recenzje.

H11. Wojciechowicz K, Kuncewicz K, Rutkowski J, Jassem J, Rodziewicz-Motowidło S, Wardowska A[✉], **Spodzieja M**[✉]. *Targeting BTLA with the peptide inhibitor HVEM(14-39) - A*

new way to restore the activity of T cells in melanoma. Biomed Pharmacother. 2024; 175:116675. doi: 10.1016/j.biopha.2024.116675; [IF – 6,9; punkty MNiSW – 100]

Liczba cytowań: Web of Science – 0; Scopus – 0; Google Scholar – 0

Liczba cytowań bez autocytowań: Web of Science – 0; Scopus – 0; Google Scholar – 0

Mój udział w tej pracy polegał na stworzeniu planu i koncepcji badań (wspólnie z dr hab. Anna Wardowską); syntezie, oczyszczaniu i charakterystyce peptydów wykorzystywanych do badań (prace wykonywane wspólnie z dr Katarzyną Kuncewicz); analizie wyników otrzymanych z przeprowadzonych eksperymentów. Brałam również udział w przygotowaniu manuskryptu, jego edycji oraz pisaniu odpowiedzi na recenzje. Opisane badania sfinansowane zostały przez NCN, w ramach projektu, którego byłam kierownikiem.

H12. Wojciechowicz K, Kuncewicz K, Rutkowski J, Jassem J, Wardowska A[✉], **Spodzieja M[✉]**. *The effect of gD-derived peptides on T cell immune response mediated by BTLA-HVEM protein complex in melanoma patients*. Front Immunol. 2024; 15:1362152. doi: 10.3389/fimmu.2024.1362152; [IF – 5,7; punkty MNiSW – 140]

Liczba cytowań: Web of Science – 0; Scopus – 0; Google Scholar – 0

Liczba cytowań bez autocytowań: Web of Science – 0; Scopus – 0; Google Scholar – 0

Mój udział w tej pracy polegał na stworzeniu planu i koncepcji badań (wspólnie z dr hab. Anna Wardowską); syntezie, oczyszczaniu i charakterystyce peptydów wykorzystywanych do badań (prace wykonywane wspólnie z dr Katarzyną Kuncewicz); analizie wyników otrzymanych z przeprowadzonych eksperymentów. Brałam również udział w przygotowaniu manuskryptu, jego edycji oraz pisaniu odpowiedzi na recenzje. Opisane badania sfinansowane zostały przez NCN, w ramach projektu, którego byłam kierownikiem.

Współczynniki wpływu podane zostały z roku ukazania się publikacji, na podstawie bazy Web of Science. W przypadku, gdy IF z danego roku nie jest dostępny, podany został ten, który obowiązywał w roku poprzednim.

Symbolem [✉] oznaczony został autor/autorzy korespondencyjni.

Liczba cytowań podana została z dnia 04.09.2024.

C) PUBLIKACJE UZUPEŁNIAJĄCE ZWIĄZANE Z TEMATYKĄ PREZENTOWANEGO OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

Jestem również współautorką innych publikacji naukowych, których tematyka jest związana z prezentowanym osiągnięciem naukowym. Jednakże, z uwagi na mój znacznie

mniejszy udział w ich powstaniu, stanowią one jedynie uzupełnienie prezentowanego osiągnięcia naukowego. Ich wykaz znajduje się w załączniku 3: „Wykaz osiągnięć naukowych lub artystycznych, stanowiący znaczny wkład w rozwój określonej dyscypliny” (punkt II. 4.) i są to publikacje oznaczone jako: A1– A5.

D) FINASOWANIE BADAŃ

Badania, które stanowią prezentowane osiągnięcie naukowe, zostały sfinansowane z grantów wymienionych poniżej (w porządku chronologicznym), uzyskanych na drodze otwartych konkursów:

1. „Projektowanie inhibitorów białka BTLA jako nowych leków przeciwko czerniakowi”, Polsko-Szwajcarski Program Badawczy, PSPB-070/2010. Projekt realizowany w konsorcjum pomiędzy Uniwersytetem Gdańskim (kierownik: prof. Sylwia Rodziewicz-Motowidło), Swiss Institute of Bioinformatics (kierownik: prof. Olivier Michielin) oraz Ludwig Institute for Cancer Research (kierownik: prof. Daniel E. Speiser). Moja rola w projekcie: **główny wykonawca (umowa o pracę na ½ etatu)**; projekt zakończony i rozliczony;
2. „Inhibitory tworzenia kompleksu BTLA-HVEM jako potencjalne cele w immunoterapii nowotworów”, Narodowe Centrum Nauki, SONATA 13, 2017/26/D/ST5/00919. Moja rola w projekcie: **kierownik**; projekt zakończony i rozliczony;
3. „Immunomodulatory peptydowe jako inhibitory punktów kontrolnych PD-1/PD-L1 następnej generacji”, Naukowa Fundacja Polpharmy, No. 1/XVIII/19, kierownik: prof. Sylwia Rodziewicz-Motowidło (Uniwersytet Gdański). Moja rola w projekcie: **wykonawca**; projekt zakończony i rozliczony;
4. „Nowe immunomodulatory kompleksu BTLA-HVEM jako potencjalna terapia w toczeniu rumieniowatym układowym”, Narodowe Centrum Nauki, OPUS 22, 2021/43/B/NZ7/01022. Projekt realizowany w konsorcjum pomiędzy Gdańskim Uniwersytetem Medycznym i Uniwersytetem Gdańskim. Kierownik projektu: dr hab. Anna Wardowska (Gdański Uniwersytet Medyczny). Moja rola w projekcie: **kierownik ze strony UG**, projekt w trakcie realizacji.

Dodatkowo uzyskałam również fundusze przeznaczone na badania dla młodych naukowców (BMN) finansowane przez Uniwersytet Gdański:

5. „Synteza fragmentów białek TNRSF1A i TNRSF1B oraz badanie ich zdolności do hamowania tworzenia kompleksu BTLA-HVEM”, Uniwersytet Gdański, Badania Młodych

Naukowców (538-8725-B089-15, 538-8725-B089-16). Moja rola w projekcie: **kierownik**; projekt zakończony i rozliczony;

6. „*Synteza fragmentów białka gD oraz badanie ich zdolności do hamowania tworzenia kompleksu BTLA-HVEM*”, Uniwersytet Gdański, Badania Młodych Naukowców (538-8725-B423-16, 538-8725-B423-17). Moja rola w projekcie: **kierownik**; projekt zakończony i rozliczony;
7. „*Synteza fragmentów białka UL144 oraz sprawdzenie ich zdolności do oddziaływania z białkiem BTLA*”, Uniwersytet Gdański, Badania Młodych Naukowców (538-8720-B792-17, 538-8720-B792-18). Moja rola w projekcie: **kierownik**; projekt zakończony i rozliczony.

Pozostałe granty, dzięki którym mogłam realizować swoje badania, niezwiązane z prezentowanym osiągnięciem, wymienione zostały poniżej:

8. „*Poszukiwanie miejsca oddziaływania ludzkiej cystatyny C z biologicznie aktywnymi ligandami*”, Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, 1264/B/H03/2009/37. Kierownik: dr hab. Paulina Czaplewska (Uniwersytet Gdański). Moja rola w projekcie: **wykonawca**; projekt zakończony i rozliczony;
9. „*Charakterystyka molekularna kompleksu ludzkiej cystatyny C z naturalnymi autoprzeciwciałami*”, Narodowe Centrum Nauki, SONATA BIS 1, 2012/05/E/ST5/03796. Kierownik: dr hab. Paulina Czaplewska (Uniwersytet Gdański). Moja rola w projekcie: **wykonawca (umowa o pracę na ½ etatu)**; projekt zakończony i rozliczony;
10. „*Mechanizm wprowadzania mostków disiarczkowych do białek Campylobacter jejuni*”, Narodowe Centrum Nauki, OPUS 9, 2015/17/B/NZ1/00230. Kierownik: prof. Elżbieta Jagusztyn-Krynicka (Uniwersytet Warszawski). Moja rola w projekcie: **wykonawca**; projekt zakończony i rozliczony;
11. „*Tiolowe oxydoreduktazy bakterii rodzaju Helicobacter - biochemiczna i strukturalna charakterystyka systemu Dsb Helicobacter hepaticus oraz zaplanowanie i testowanie inhibitorów procesu oksydacyjnego zwijania białek Helicobacter pylori*”, Narodowe Centrum Nauki, OPUS 15, 2018/29/B/NZ1/00140. Kierownik: prof. Elżbieta Jagusztyn-Krynicka oraz prof. Dariusz Bartosik (Uniwersytet Warszawski). Moja rola w projekcie: **wykonawca**; projekt zakończony;
12. „*Blokowanie oddziaływań TNF-TNFR2 jako nowa metoda leczenia raka jajnika*”, Narodowe Centrum Nauki, Opus 21, 2021/41/B/NZ7/03312. Kierownik: prof. Sylwia Rodziewicz-Motowidło (Uniwersytet Gdański). Moja rola w projekcie: **wykonawca**; projekt w trakcie realizacji;

13. „Projektowanie inhibitorów procesu agregacji amyloidu β o strukturze opartej na C-końcowym fragmencie ludzkiej cystatyny C”, Uniwersytet Gdański, Badania Młodych Naukowców (538-8720-B340-13, 538-8720-B340-14). Moja rola w projekcie: **kierownik**; projekt zakończony i rozliczony;
14. „Charakterystyka kompleksu surowiczego białka amyloidu A (SAA) z amyloidem β ($A\beta$)”, Uniwersytet Gdański, Badania Młodych Naukowców (538-8725-B717-14, 538-8725-B717-15). Moja rola w projekcie: **kierownik**; projekt zakończony i rozliczony.

E) OPIS OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO ZAPREZENTOWANEGO W SERII POWIĄZANYCH ZE SOBĄ PUBLIKACJI (H1 – H12)

1. WPROWADZENIE LITERATUROWE

1.1. UKŁAD IMMUNOLOGICZNY

Układ odpornościowy człowieka jest to złożony system tworzony przez narządy, tkanki i komórki, których zadaniem jest ochrona organizmu przed różnego rodzaju zagrożeniami zewnętrznymi i wewnętrznymi. Znajduje się on pod nadzorem licznych mechanizmów kontrolnych, a zaburzenia na jakimkolwiek etapie powodują odpowiedź immunologiczną.

Jednymi z najważniejszych komórek odpowiedzialnych za odpowiedź immunologiczną są limfocyty B oraz limfocyty T. Limfocyty B rozpoznają antygeny i produkują przeciwciała, natomiast limfocyty T mogą pełnić różne funkcje, w zależności od tego, do jakiej subpopulacji należą. Wśród limfocytów T można wyróżnić: limfocyty T cytotoksyczne (ang. *cytotoxic T lymphocyte*, Tc), regulatorowe (ang. *regulatory T lymphocyte*, Treg), pomocnicze (ang. *helper T lymphocyte*, Th), naiwne (dziewicze, ang. *naïve T lymphocyte*, T_N) oraz komórki pamięci (ang. *memory cell*). Posiadają one na swojej powierzchni receptory limfocytu T (ang. *T cell receptor*, TCR) oraz białka różnicowania komórkowego (ang. *cluster of differentiation*, CD). Białka różnicowania komórkowego różnią się w zależności od subpopulacji komórek T i mogą one służyć do identyfikacji określonego typu komórek lub też oceny stanu ich aktywacji. Cechą charakterystyczną limfocytów cytotoksycznych jest obecność białka powierzchniowego CD8 (określane są one również jako CD8+), natomiast limfocyty pomocnicze posiadają na swojej powierzchni białko CD4 (określane są one również jako CD4+). Funkcje poszczególnych subpopulacji limfocytów T przedstawione zostały w Tabeli 1 [1].

Tabela 1. Subpopulacje limfocytów T.

Subpopulacja limfocytów	Funkcja
cytotoksyczne	Zabijają komórki obce oraz własne zakażone wirusami lub nowotworowe
regulatorowe	Hamują odpowiedź immunologiczną, wydzielają cytokiny
pomocnicze	Wspomagają odpowiedź immunologiczną, wydzielają cytokiny
pamięci	Odpowiadają za tzw. pamięć immunologiczną
inne np. naiwne (dziewicze)	Różnicują się do pozostałych subpopulacji komórek T

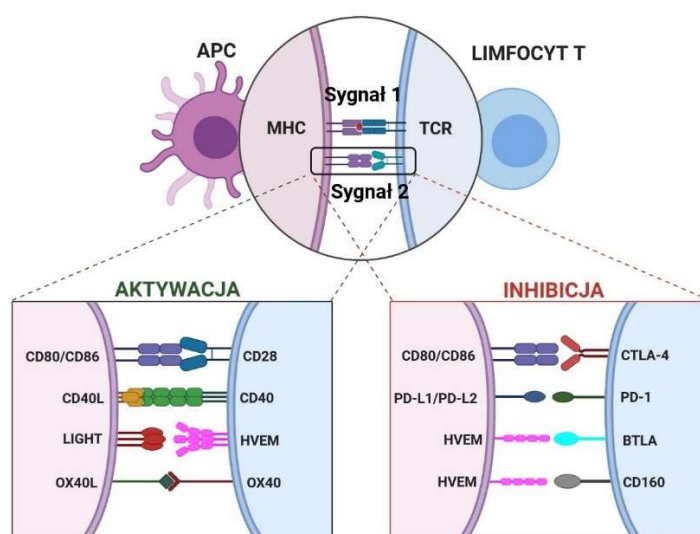
Można wyróżnić trzy fazy odpowiedzi immunologicznej związanej z limfocytami T:

- 1) powstawanie odpowiedzi, na którą składa się aktywacja, proliferacja i różnicowanie się komórek T oraz eliminacja patogenu;
- 2) wygaszanie odpowiedzi przez śmierć limfocytów;
- 3) powstawanie komórek pamięci immunologicznej.

Faza 1 – Aby T_N mógł spełniać swoje funkcje, musi nastąpić jego aktywacja. Aktywacja limfocyta T zachodzi, gdy wejdzie on w kontakt z komórką prezentującą antygen (ang. *antigen-presenting cell*, APC), którą może być limfocyt B, komórka dendrytyczna czy makrofag. Do aktywacji T_N konieczne jest wystąpienie przynajmniej dwóch sygnałów [2]. Pierwszy z nich powstaje w wyniku prezentacji antygeny receptorowi limfocyta T. Prezentacja ta odbywa się dzięki cząsteczkom głównego układu zgodności tkankowej (ang. *major histocompatibility complex*, MHC), które znajdują się na powierzchni komórki prezentującej antygen. MHC można podzielić na dwie klasy MHC I i MHC II. MHC I prezentują antygeny peptydowe limfocytom $CD8^+$ (cytotoksycznym), natomiast MHC II limfocytom $CD4^+$ (pomocniczym) [3] (Rysunek 1). Za przesłanie drugiego sygnału warunkującego aktywację limfocytów T odpowiedzialne są natomiast białka, określane jako punkty kontrolne układu immunologicznego (ang. *immune checkpoint*, ICP). Punkty kontrolne są to receptory, znajdujące się na powierzchni limfocytów T i ich ligandy, obecne na powierzchni komórek prezentujących antygen [4]. Następnym etapem aktywacji komórek T jest ich proliferacja oraz różnicowanie, dzięki czemu powstaje duża pula komórek efektorowych.

Punkty kontrolne układu immunologicznego można podzielić na stymulujące oraz hamujące aktywację limfocytów T (Rysunek 1). Do najlepiej poznanych stymulujących ICP należy m.in. receptor CD28 i jego ligandy CD80/CD86 [5], natomiast do hamujących zaliczyć możemy między innymi receptor – atenuator limfocytów T i B (ang. *B and T lymphocyte*

attenuator, BTLA) i jego ligand – mediator wejścia wirusa opryszczki (ang. *herpesvirus entry mediator*, HVEM) [6] oraz receptor programowanej śmierci komórki 1 (ang. *programmed cell death 1*, PD-1) i ligand receptora programowanej śmierci komórki 1 (ang. *programmed cell death ligand 1*, PD-L1) [7]. ICP regulują rodzaj, wielkość oraz czas trwania odpowiedzi immunologicznej, dlatego też współdziałanie stymulujących i hamujących ICP zapewnia homeostazę immunologiczną. Sygnał pochodzący od ICP jest konieczny do aktywacji naiwnych komórek T a jego brak skutkuje obniżoną odpowiedzią na dany antygen lub anergią limfocytów [8].



Rysunek 1. Dwusygnałowy model aktywacji limfocytów T. Pierwszy sygnał powstaje w wyniku oddziaływania TCR z peptydem prezentowanym mu przez MHC. Drugi sygnał jest zależny od oddziaływania punktów kontrolnych układu immunologicznego.

Faza 2 – Po fazie wykonawczej i eliminacji patogenu pozostaje znaczna liczba limfocytów T. W kolejnym etapie ok 90–95% komórek T ulega apoptozie, czyli programowanej śmierci komórki, która jest procesem fizjologicznym, warunkującym prawidłowe funkcjonowanie organizmu i przywrócenie homeostazy. Uważa się, że śmierć komórek indukowana aktywacją jest głównym mechanizmem zapobiegającym odpowiedziom autoreaktywnym [9,10]. Jednak niewielka część limfocytów T może przetrwać, w wyniku czego powstają komórki pamięci immunologicznej.

Faza 3 – Komórki pamięci mogą przetrwać długi czas, są one aktywowane dużo szybciej niż komórki naiwne i są w stanie zareagować na niższy poziom antygeny. Limfocyty T pamięci są niejednorodne pod względem fenotypu, rozmieszczenia oraz właściwości. Komórki pamięci można podzielić na komórki pamięci centralnej (ang. *central memory T cells*, TCM), komórki

pamięci efektorowej (ang. *effector memory T cells*, TEM) oraz komórki końcowozróżnicowane (ang. *effector memory cells re-expressing CD45RA*, TEMRA). Posiadają one na swojej powierzchni specyficzne markery, które mogą być wykorzystywane do ich rozróżniania [11].

1.2. PUNKTY KONTROLNE UKŁADU IMMUNOLOGICZNEGO I ICH ROLA W CHOROBYCH NOWOTWOROWYCH ORAZ IMMUNOTERAPII

Liczne badania naukowe pokazują, że komórki nowotworowe mogą naśladować komórki prezentujące antygen, a na ich powierzchni często występuje zwiększona ekspresja białek takich jak PD-L1 [12] czy HVEM [13]. W wyniku oddziaływania tych ligandów z ich receptorami, takimi jak PD-1 oraz BTLA, które należą do hamujących ICP (znajdującymi się na limfocytach T), dochodzi do zahamowania aktywacji komórek T, ich proliferacji i różnicowania. W wyniku tego procesu komórki nowotworowe nie są eliminowane, mogą się namnażać i powodować rozwój choroby. Jest to jeden z najważniejszych mechanizmów ucieczki komórek nowotworowych spod nadzoru układu immunologicznego. Udowodniono, że blokowanie wiązania się białek, należących do tzw. hamujących punktów kontrolnych, może zostać wykorzystane w immunoterapii chorób nowotworowych [14]. Za odkrycie terapii przeciwnowotworowej polegającej na hamowaniu negatywnej regulacji immunologicznej została w 2018 roku przyznana Nobla w dziedzinie fizjologii lub medycyny, którą otrzymali James P. Allison z USA i Tasuku Honjo z Japonii.

Jak dotąd w immunoterapii opierającej się na blokowaniu hamujących ICP wykorzystywane są przede wszystkim przeciwciała monoklonalne (ang. *monoclonal antibody*, mAb). Pierwsze z nich – *Ipilimumab*, blokujące wiązanie się receptora, antygeny 4 związanego z limfocytom T cytotoksycznym (ang. *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*, CTLA-4) z jego ligandami CD80/CD86, zatwierdzone zostało przez amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*, FDA) w 2011 roku w leczeniu czerniaka [15]. W kolejnych latach pojawiły się kolejne przeciwciała, wiążące się z białkami PD-1 lub PD-L1, które wykorzystywane są w leczeniu również innych chorób nowotworowych [16]. Przeciwciała nie są jednak lekami idealnymi i posiadają wady, a do najważniejszych z nich można zaliczyć wysokie koszty ich produkcji, długi okres półtrwania w organizmie oraz liczne powikłania o charakterze autoimmunologicznym oraz zapalnym [17,18]. Dlatego też poszukuje się inhibitorów ICP wśród związków małowcząsteczkowych, peptydów oraz peptydomimetyków.

Prowadzone przez mnie badania skupiają się na poszukiwaniu peptydowych inhibitorów tworzenia kompleksów BTLA/HVEM oraz PD-1/PD-L1. Poniżej opisana została budowa i funkcja tych białek.

1.3. BUDOWA I FUNKCJA BIAŁEK BTLA I HVEM

Atenuator limfocytów B i T (BTLA, CD272) należy do nadrodziny białek immunoglobulinopodobnych (ang. *immunoglobulin superfamily*, IgSF). Białko to składa się z 289 reszt aminokwasowych, które dzielą się na peptyd sygnałowy oraz trzy domeny: zewnątrzkomórkową, transbłonową oraz wewnątrzkomórkową (cytoplazmatyczną) [19].

Domena zewnątrzkomórkowa białka BTLA ma budowę charakterystyczną dla nadrodziny białek Ig i składa się ona z dwóch β -kartek, które tworzy osiem antyrównoległych β -nici. Stabilizowana jest ona przez wiązania disulfidowe pomiędzy resztami cysteiny znajdującymi się w pozycjach 72–79, 34–63 oraz 58–115. To ona jest zaangażowana w oddziaływanie z białkiem HVEM [20].

Domena wewnątrzkomórkowa białka BTLA zawiera dwa motywy hamujące: motyw przełączający immunoreceptora oparty na tyrozynie (ang. *immunoreceptor tyrosine-based switch motif*, ITSM) i motyw hamujący immunoreceptora oparty na tyrozynie (ang. *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*, ITIM). Wiązanie białka HVEM z domeną zewnątrzkomórkową białka BTLA aktywuje fosforylację reszt tyrozyny, znajdujących się w motywach ITIM oraz ITMS. Fosforylowane reszty tyrozyny służą jako miejsca wiązania białkowych fosfataz tyrozynowych głównie SHP-1 (w mniejszym stopniu SHP-2), mających specyficzne domeny SH1/SH2 (ang. *Src homology*), które biorą udział w działaniu immunosupresyjnym poprzez defosforylację różnych białek uczestniczących w wewnątrzkomórkowym przekazywaniu sygnału [6]. W domenie wewnątrzkomórkowej białka BTLA znajduje się również motyw asocjacyjny białka wiążącego receptor czynnika wzrostu 2 (ang. *growth factor receptor-bound protein 2*, Grb-2), który odpowiada za aktywację kinazy białkowej B (zwanej inaczej kinazą AKT), która promuje proliferację i przeżycie komórek (Rysunek 2A). Podkreśla to dwojaką rolę tego białka w regulacji odpowiedzi immunologicznej [21].

Jak dotąd zidentyfikowano dwa ligandy białka BTLA – wspomniane wcześniej białko HVEM oraz białko UL144 pochodzące z ludzkiego wirusa cytomegalii (ang. *human cytomegalovirus*, HCMV) (Rysunek 3). Białko UL144 charakteryzuje się budową podobną do

białka HVEM i w wyniku oddziaływania z BTLA również hamuje aktywację komórek T [22,23].

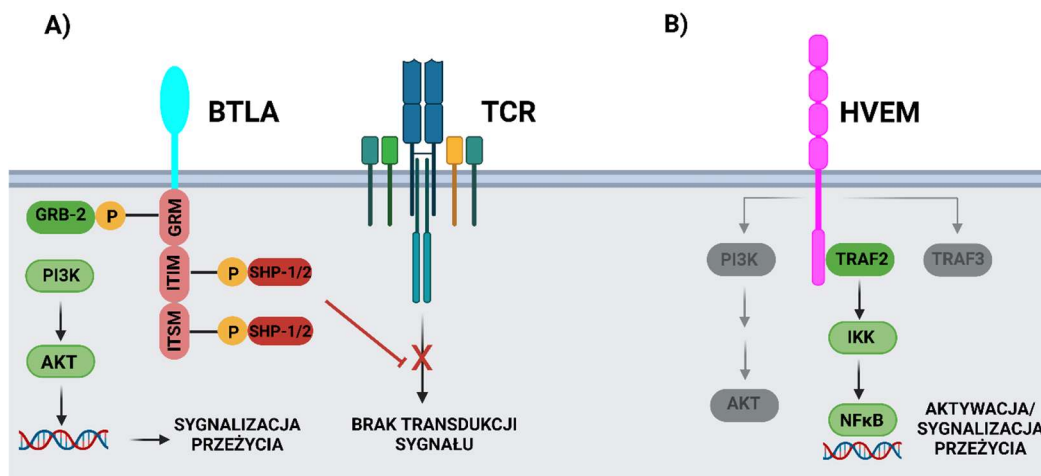
BTLA ulega ekspresji na większości komórek odpornościowych, takich jak limfocyty B i T, monocyty, makrofagi, komórki dendrytyczne i komórki naturalnych zabójców (ang. *natural killer*, NK) [24]. Naiwne limfocyty T wykazują wysoki poziom BTLA na swojej powierzchni, a ekspresja białka jest stopniowo zmniejszana w trakcie ich różnicowania się. W niektórych typach nowotworów obserwuje się jednak zwiększony poziom białka BTLA na powierzchni limfocytów T, znajdujących się w mikrośrodowisku guza [25–28] lub na komórkach nowotworowych [29–31].

Mediator wejścia wirusa opryszczki (HVEM, CD270) należy do nadrodziny receptorów czynnika martwicy nowotworu (ang. *tumor necrosis factor receptor superfamily*, TNFRSF) i składa się z 275 reszt aminokwasowych. Sekwencję aminokwasową HVEM można podzielić na peptyd sygnałowy, domenę zewnątrzkomórkową, transbłonową i wewnątrzkomórkową. Część zewnątrzkomórkowa białka podzielna jest dodatkowo na 4 domeny bogate w reszty cysteiny (ang. *cysteine rich domain*, CRD), każda po około 40 reszt aminokwasowych. Trzy pierwsze CRD stabilizowane są przez trzy mostki disulfidowe, podczas gdy CRD4 posiada dwa mostki disulfidowe [32,33]. Domena zewnątrzkomórkowa białka HVEM zaangażowana jest w oddziaływanie z BTLA [20].

HVEM występuje na powierzchni limfocytów T, B i komórek dendrytycznych [32,34]. Jak już wspomniano wcześniej, liczne doniesienia literaturowe potwierdzają ekspresję HVEM na powierzchni komórek nowotworowych, takich jak rak żołądka [29], rak jelita grubego [35], rak płaskonabłonkowy przełyku [36], rak wątrobowokomórkowy [37], rak piersi [38], czerniak [27], rak jajnika [39], rak jasnokomórkowy nerki [40].

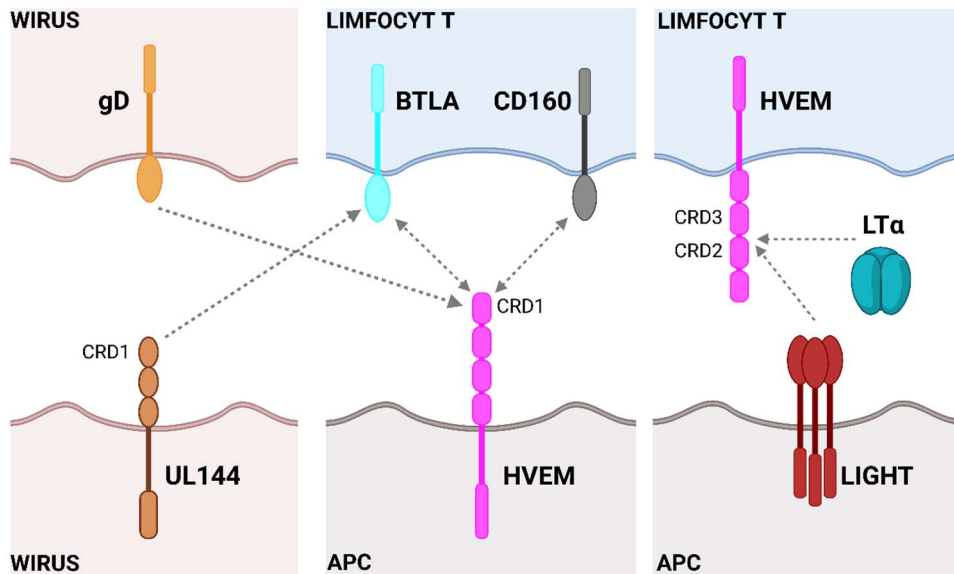
Białko HVEM w organizmie pełni dwie funkcje: stymulującą oraz hamującą odpowiedź immunologiczną. Są one zależne od cząsteczki, z którą oddziałuje HVEM oraz od typu komórki, na której białko to się znajduje. Gdy białko HVEM znajduje się na komórkach APC lub komórkach nowotworowych pełni funkcję liganda, a w wyniku jego oddziaływania z białkiem BTLA, znajdującym się na powierzchni limfocytów T, wysyłany jest sygnał hamujący aktywację komórek T [6]. Podobnie jest gdy białko HVEM oddziałuje z receptorem CD160 [41]. Gdy natomiast HVEM znajduje się na limfocytach T, pełni wówczas funkcję receptora i oddziałuje z limfotoksyną α (ang. *lymphotoxin α* , LT α) oraz białkiem LIGHT (nazwa białka pochodzi od ang. *homologous to lymphotoxin, exhibits inducible expression and competes with HSV glycoprotein D for binding to herpesvirus entry mediator, a receptor expressed on T lymphocytes*). W tym przypadku wysyłany jest sygnał stymulujący aktywację limfocytów T. W

domenie wewnątrzkomórkowej białka HVEM znajduje się motyw wiązania czynnika aktywującego zależnego od TNF 2 (ang. *TNF receptor associated factor 2*, TRAF2), który prowadzi do aktywacji jądrowego czynnika transkrypcyjnego κ B (ang. *nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells*, NF- κ B). NF- κ B odgrywa kluczową rolę w transkrypcji genów kodujących białka związane ze stanem zapalnym, aktywacją, proliferacją i apoptozą komórki. Dodatkowo stymulacja odpowiedzi immunologicznej z udziałem HVEM może nastąpić również poprzez rekrutację TRAF3 oraz za pośrednictwem szlaku AKT, jednak mechanizmy te nie zostały jeszcze do końca wyjaśnione (Rysunek 2B) [42,43].



Rysunek 2. Szlaki sygnałowe regulowane przez białka A) BTLA i B) HVEM, GRM – motyw wiążący Grb-2, PI3K – kinaza 3-fosfatydyloinozytolu (ang. *phosphoinositide 3-kinase*), IKK – kinaza białkowa I κ B (ang. *I κ B kinase*).

W oddziaływanie z LIGHT oraz LT α zaangażowane są domeny CRD2 oraz CRD3 białka HVEM [44], podczas gdy w wiązaniu się z BTLA i CD160 uczestniczy domena CRD1 [20,45]. Wykazano, że białko HVEM wiąże się również z glikoproteiną D (ang. *glycoprotein D*, gD) wirusa opryszczki (ang. *herpes simplex virus type 1/2*, HSV-1/2), a za oddziaływanie to odpowiedzialna jest głównie domena CRD1 i fragment domeny CRD2 białka HVEM [46] (Rysunek 3).



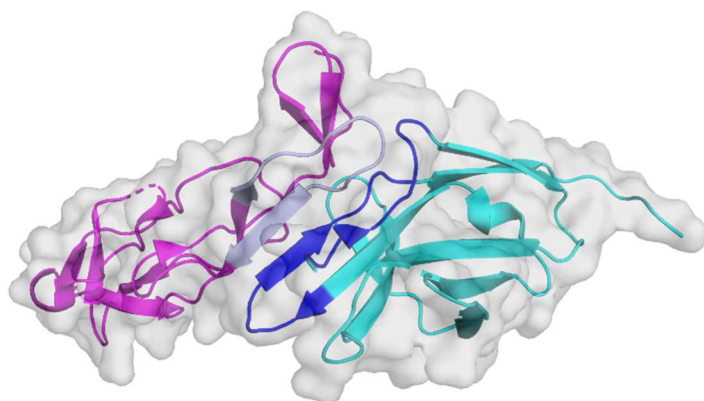
Rysunek 3. Oddziaływanie białek BTLA i HVEM z innymi molekułami.

1.4. KOMPLEKS BTLA/HVEM

Oddziaływanie białka BTLA z HVEM hamuje aktywację limfocytów T, a zatem przerwanie ścieżki sygnalizacyjnej zależnej od białka BTLA, może być jedną z metod symulacji układu immunologicznego do walki z komórkami nowotworowymi. Pierwsze doniesienia o tym, że białko BTLA ulega zwiększonej ekspresji na limfocytach T w mikrośrodowisku nowotworu pojawiły się w 2010 roku. Badania te wykazały również, że HVEM ulega ekspresji na komórkach nowotworowych czerniaka [27]. Od tamtej pory liczne dane potwierdziły podwyższoną ekspresję tych białek również w innych typach nowotworów [13,43]. Wraz z tym, zaczęto poszukiwać związków hamujących tworzenie kompleksu BTLA/HVEM. Obecnie w fazie badań klinicznych znajdują się przeciwciała anty-BTLA, które są w stanie blokować wiązanie się białek i przywracać prawidłowe funkcje limfocytów T [47–50]. Do blokowania oddziaływania wyżej wymienionych molekuł wykorzystywano również przeciwciała anty-HVEM [51], rozpuszczalne białko BTLA (sBTLA) [52] oraz białko gD [53].

Tworzenie kompleksu pomiędzy cząsteczką BTLA należącą do nadrodziny IgSF oraz cząsteczką HVEM z nadrodziny TNFRSF jest pierwszym przykładem oddziaływania białek należących do tych dwóch różnych nadrodziny. Molekuły te wiążą się ze sobą w stosunku stechiometrycznym 1:1. Struktura krystaliczna kompleksu BTLA/HVEM pokazuje, że w oddziaływanie białek zaangażowany jest fragment 26-38, zlokalizowany z domenie CRD1 białka HVEM, który wiąże się z dwoma fragmentami 35-43 oraz 118-128 w białku BTLA (Rysunek 4). Cząsteczki te tworzą antyrównoległą międzycząsteczkową β -kartkę, która

stabilizowana jest głównie przez oddziaływania pomiędzy łańcuchami głównymi tych białek [20].



Rysunek 4. Struktura kompleksu BTLA/HVEM (PDB: 2AW2), HVEM – magenta, BTLA – cyjan, fragment wiążący HVEM – fioletowy, fragmenty wiążące BTLA – granatowy.

Szlaki sygnałowe regulowane przez białka BTLA i HVEM są bardzo złożone, gdyż obie te cząsteczki mogą pełnić dwojaką funkcję, stymulować lub hamować odpowiedź immunologiczną organizmu. Mogą one również ulegać jednoczesnej ekspresji zarówno na komórkach T, komórkach APC oraz komórkach nowotworowych. Dodatkowo BTLA i HVEM mogą oddziaływać ze sobą w dwóch konfiguracjach. Gdy znajdują się one na tej samej komórce oddziaływanie takie określane jest jako *cis*, natomiast gdy znajdują się one na różnych komórkach wówczas takie oddziaływanie określane jest jako *trans*. W obu przypadkach sygnał hamujący zależny od białka BTLA pełni rolę dominującą [54,55] Wszystkie te doniesienia sprawiają, że badania prowadzone dla tych molekuł są niezwykle skomplikowane.

Zagadnienia związane z rolą kompleksu BTLA/HVEM w chorobach nowotworowych i autoimmunologicznych jak również budowa i funkcja tych białek zostały opisane w dwóch pracach przeglądowych, których jestem współautorem:

H5. Wojciechowicz K, **Spodzieja M**, Lisowska KA, Wardowska A[✉]. *The role of the BTLA-HVEM complex in the pathogenesis of autoimmune diseases*. Cell Immunol. 2022; 376:104532. doi: 10.1016/j.cellimm.2022.104532.

H10. Wojciechowicz K[✉], **Spodzieja M**, Wardowska A[✉]. *The BTLA-HVEM complex - The future of cancer immunotherapy*. Eur J Med Chem. 2024; 268:116231. doi: 10.1016/j.ejmech.2024.116231.

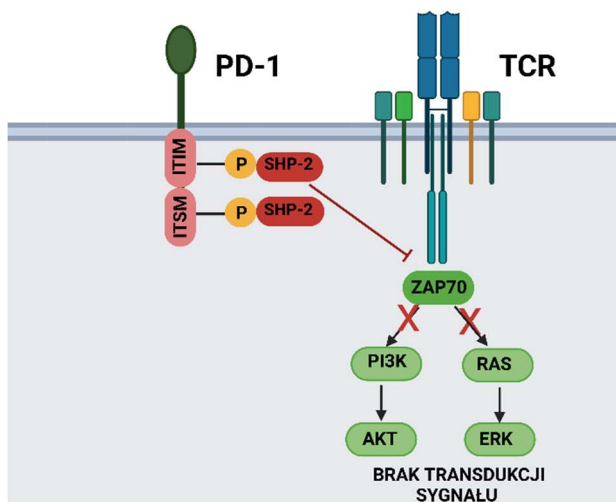
1.5. BUDOWA I FUNKCJA BIAŁEK PD-1 I PD-L1

Receptor programowanej śmierci komórki 1 (PD-1, CD279) oraz ligand receptora programowanej śmierci komórki 1 (PD-L1, CD274, B7-H1), podobnie jak BTLA należą do nadrodziny IgSF, dlatego też charakteryzują się one budową podobną do tego białka. PD-1 składa się z 288, natomiast PD-L1 z 290 reszt aminokwasowych. W sekwencji aminokwasowej obu białek można wyróżnić peptyd sygnałowy oraz trzy domeny: zewnątrzkomórkową, transbłonową oraz wewnątrzkomórkową [56,57].

Cześć zewnątrzkomórkowa białka PD-1 ma budowę typu IgV i składa się z dwóch β -kardtek, które tworzy 9 antyrównoległych β -nici. Białko PD-L1 posiada dwie domeny zewnątrzkomórkowe typu IgV oraz IgC2, połączone krótkim łącznikiem, które różnią się od siebie ilością β -nici. Część PD-1 jest stabilizowana wiązaniami disulfidowymi pomiędzy resztami C54–C123, podczas gdy w białku PD-L1 wiązania disulfidowe występują pomiędzy resztami C40–C114 oraz C155–C209 [56,57]. Domena IgV liganda oddziałuje z domeną IgV receptora [58].

Cześć wewnątrzkomórkowa białka PD-1, podobnie jak BTLA, zawiera dwa motywy: ITIM oraz ITSM, które uczestniczą w hamowaniu aktywacji limfocytów T. Po związaniu liganda, reszty tyrozyny znajdujące się w tych motywach ulegają fosforylacji a następnie są one rozpoznawane przez białkowe fosfatazy tyrozynowe SHP-2 (oraz w mniejszym stopniu SHP-1). Fosfatazy te defosforylują takie cząsteczki jak kinazę białkową związaną z łańcuchem Zeta 70 (ang. *zeta chain-associated protein kinase 70*, ZAP-70), co prowadzi do zahamowania przekazania sygnału płynącego od receptora limfocyty T [50] Mają one również wpływ na kinazę PI3K i białko RAS (ang. *rat sarcoma*), co skutkuje zahamowaniem czynników transkrypcyjnych, odpowiedzialnych za aktywację i proliferację komórek T (Rysunek 5) [59–61].

Receptor PD-1 posiada jeszcze jeden opisany dotąd ligand – białko PD-L2, jednak jego rola w regulacji odpowiedzi immunologicznej jest nie do końca poznana i wymaga dalszych wyjaśnień, ponieważ opisana została zarówno jego funkcja stymulująca jak i hamująca odpowiedź immunologiczną [62,63].



Rysunek 5. Szlaki sygnałowe regulowane przez białko PD-1.

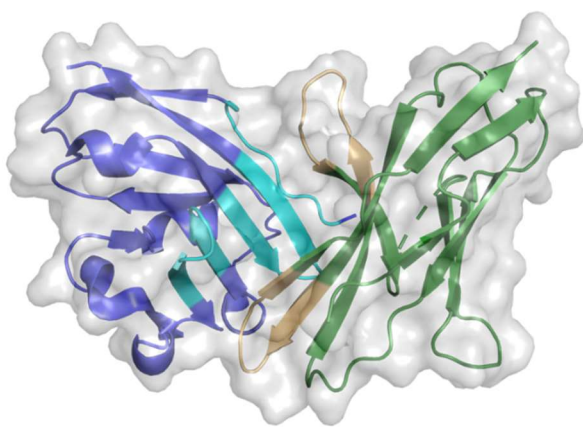
PD-1 ulega ekspresji w małych ilościach na naiwnych komórkach T oraz na aktywowanych komórkach T i B, komórkach dendrytycznych, monocytach i komórkach NK [56]. PD-L1 ulega natomiast ekspresji na makrofagach, aktywowanych limfocytach B i T oraz komórkach dendrytycznych [64]. Białko PD-L1 może również ulegać ekspresji na komórkach nowotworowych w różnych typach chorób, takich jak rak piersi [65], rak trzustki [66], niedrobnokomórkowy rak płuca [67], rak jajnika [68] rak wątrobowokomórkowy [69], rak pęcherzyka żółciowego [70] i wielu innych.

1.6. KOMPLEKS PD-1/PD-L1

Tworzenie kompleksu PD-1/PD-L1 negatywnie reguluje odpowiedź immunologiczną, dlatego wciąż poszukiwane i testowane są nowe związki hamujące wiązanie się tych białek takie jak przeciwciała, peptydy, peptydomimetyki, związki małocząsteczkowe czy aptamery [71,72]. W ciągu ostatnich kilku lat FDA zaakceptowała cztery przeciwciała anty-PD-1 – *pembrolizumab* [73], *nivolumab* [74], *cemiplimab* [75] i *tislelizumab* [76] oraz trzy przeciwciała anty-PD-L1 – *atezolizumab* [77], *avelumab* [78] i *durvalumab* [79] do leczenia różnych typów nowotworów. Stosowane są one samodzielnie oraz w kombinacji z innymi związkami. Oprócz tego, obecnie prowadzonych jest ponad tysiąc badań klinicznych, których celem są białka PD-1 lub PD-L1 [80].

Struktura kompleksu ludzkich białek PD-1/PD-L1 została określona w 2015 roku. Cząsteczki te oddziałują ze sobą w stosunku stechiometrycznym 1:1, a w tworzenie kompleksu zaangażowane są ich domeny IgV. Receptor PD-1 posiada dwa fragmenty uczestniczące w oddziaływaniu z ligandem i znajdują się one w środkowej oraz C-końcowej części białka

(Rysunek 6). W białku PD-L1 można natomiast wyróżnić trzy regiony zaangażowane w oddziaływanie z receptorem i są to fragment *N*-końcowy, fragment znajdujący się w środkowej części białka i fragment *C*-końcowy (Rysunek 6). W strukturze białka PD-L1 znajdują się dwie kieszenie i jeden rowek, w których lokuje się białko PD-1. W pierwszej kieszeni tworzonej przez reszty aminokwasowe Y56, E58, R113, M115 oraz Y123 białka PD-L1 lokuje się I134 z białka PD-1, natomiast w drugiej kieszeni, na którą składają się reszty M115, A121, Y123 z białka PD-L1 lokuje się I126 z białka PD-1. W rowku utworzonym przez takie aminokwasy jak D122, Y123, K124, R125 oraz D26 z PD-L1 lokują się natomiast Y68, Q75 and T76 z białka PD-1 [58].



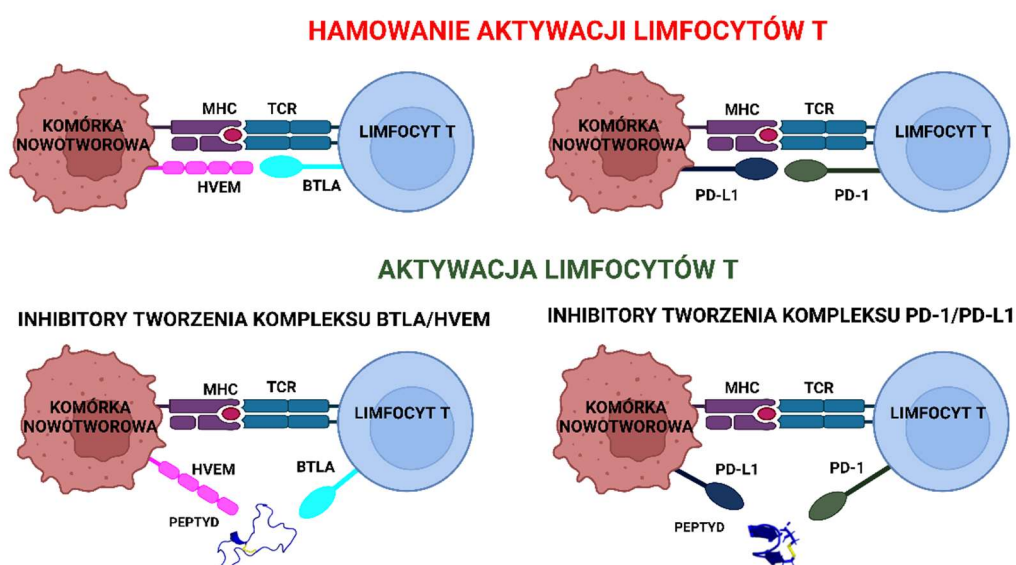
Rysunek 6.
Struktura kompleksu PD-1/PD-L1 (PDB: 4ZQK), PD-1 – zielony, PD-L1 – granatowy, fragmenty wiążące PD-1 – pomarańczowy, fragmenty wiążące PD-L1 – cyjan.

2. CEL NAUKOWY PROWADZONYCH BADAŃ

Celem prowadzonych przez mnie badań było otrzymanie związków hamujących oddziaływanie białek BTLA/HVEM oraz PD-1/PD-L1. Zablokowanie wiązania się wyżej wymienionych molekuł ma na celu przywrócenie prawidłowych funkcji układu immunologicznego (Rysunek 7). Inhibitory immunologicznych punktów kontrolnych mogą zostać wykorzystane w immunoterapii nowotworów, do blokowania negatywnych ścieżek sygnalizacyjnych zależnych od białek BTLA i PD-1, które hamują aktywację limfocytów T.

Jako inhibitory wiązania się białek wybrałam peptydy. Peptydy jako środki terapeutyczne mają wiele zalet, w tym wysoką selektywność wobec cząsteczek docelowych, niską akumulację w tkankach i dobrze znane szlaki metaboliczne. Peptydy posiadają również lepszą niż przeciwciała możliwość penetracji guzów i wykazują krótszy okres półtrwania, co prowadzi do mniejszej liczby niepożądanych efektów ubocznych, związanych z układem immunologicznym [81–83]. Biorąc pod uwagę ich zalety, peptydy mogą stanowić alternatywę dla przeciwciał wykorzystywanych w immunoterapii nowotworów jako inhibitory ICPs.

Bazując na strukturach krystalicznych kompleksów BTLA/HVEM, HVEM/gD oraz PD-1/PD-L1 zaprojektowałam i otrzymałam peptydy, które mogą być potencjalnymi inhibitorami wiązania się białek. Dla związków tych wykonałam szereg badań, mających na celu potwierdzenie ich oddziaływania z celem molekularnym, określenie ich struktury, sprawdzenie ich stabilności i bezpieczeństwa biologicznego i co najważniejsze, określenie ich właściwości hamujących. Dla części z nich wykonałam badania na limfocytach T, w których sprawdziłam ich potencjał do przywracania prawidłowych funkcji tych komórek.



Rysunek 7. Immunoterapia z wykorzystaniem peptydów jako inhibitorów punktów kontrolnych układu immunologicznego.

3. OMÓWIENIE OTRZYMANYCH WYNIKÓW

3.1. PEPTYDOWE INHIBITORY WIĄZANIA SIĘ BIAŁEK BTLA/HVEM

Do zaprojektowania inhibitorów wiązania się białek BTLA/HVEM wykorzystałam strukturę krystaliczną kompleksów BTLA/HVEM (PDB: 2AW2) oraz HVEM/gD (PDB: 1JMA). Badania, te rozpocząłam podczas pracy w polsko-szwajcarskim projekcie pt. „Projektowanie inhibitorów białka BTLA jako nowych leków przeciwko czerniakowi”. Następnie, prace te kontynuowałam w ramach dwóch projektów finansowanych przez NCN pt. „Inhibitory tworzenia kompleksu BTLA-HVEM jako potencjalne cele w immunoterapii nowotworów”, którego byłam kierownikiem oraz „Nowe immunomodulatory kompleksu BTLA-HVEM jako potencjalna terapia w toczeniu rumieniowatym układowym”, który obecnie realizuję

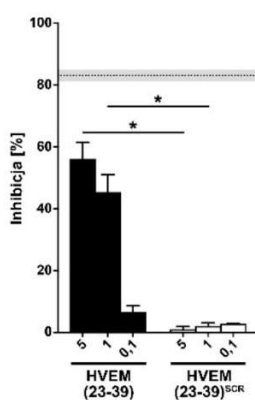
w konsorcjum z Gdańskim Uniwersytetem Medycznym. Badania opisane w podrozdziale 3.1.4. są przedmiotem rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Wojciechowicz (Gdański Uniwersytet Medyczny, Wydział Lekarski, Katedra i Zakład Fizjopatologii), pt. „*Immunomodulujący wpływ syntetycznych ligandów kompleksu BTLA – HVEM na aktywność limfocytów T w czerniaku*”, której promotorem jest dr hab. Anna Wardowska (Gdański Uniwersytet Medyczny, Wydział Lekarski, Katedra i Zakład Fizjopatologii).

3.1.1. PEPTYDY ZAPROJEKTOWANE NA PODSTAWIE SEKWENCJI AMINOKWASOWEJ BIAŁKA HVEM, KTÓRYCH CELEM MOLEKULARNYM JEST BIAŁKO BTLA

W pierwszym etapie prowadzonych przez mnie badań celem molekularnym było białko BTLA, a peptydy – potencjalne inhibitory tworzenia kompleksu BTLA/HVEM zaprojektowane zostały na podstawie struktury i sekwencji aminokwasowej białka HVEM. W oddziaływanie z białkiem BTLA zaangażowana jest domena CRD1 białka HVEM (Rysunek 4). Punktem startowym prowadzonych przez mnie badań były wyniki eksperymentów, uzyskanych z dynamiki molekularnej. Wykazały one, że fragment białka HVEM, na który składają się reszty aminokwasowe 23-39, tworzy z białkiem BTLA stabilny kompleks. Poszukiwanie związków, potencjalnych inhibitorów wiązania się białek BTLA i HVEM, rozpoczęłam więc od otrzymania peptydu, pokrywającego tą sekwencję aminokwasową. Oddziaływanie peptydu HVEM(23-39) z białkiem BTLA potwierdziłam przy wykorzystaniu chromatografii powinowactwa. Dla peptydu tego wykonane zostały również testy immunoenzymatyczne (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA), które pokazały, że hamuje on tworzenie kompleksu BTLA/HVEM. Właściwości takich nie posiadał otrzymany przez mnie peptyd kontrolny – HVEM(23-39)^{SCR} (ang. *scrambled peptide*, SCR), składający się z tych samych reszt aminokwasowych, ale ułożonych w sposób losowy (Rysunek 8A). W kolejnym etapie, aby wskazać reszty aminokwasowe kluczowe dla oddziaływania peptydu HVEM(23-39) z białkiem BTLA wykonałam syntezę jego skanu alaninowego, w którym kolejno, każdą z reszt aminokwasowych w peptydzie, zastępowałam resztą alaniny. Większość z otrzymanych związków wiązała się z białkiem BTLA, co potwierdzałam przy wykorzystaniu chromatografii powinowactwa oraz wykazywała zbliżony potencjał hamujący do peptydu HVEM(23-39) w testach ELISA. Wyjątek stanowiły dwa analogi, w których resztą alaniny zastąpiłam cysteinę w pozycji 29 lub 37 (Rysunek 8B).

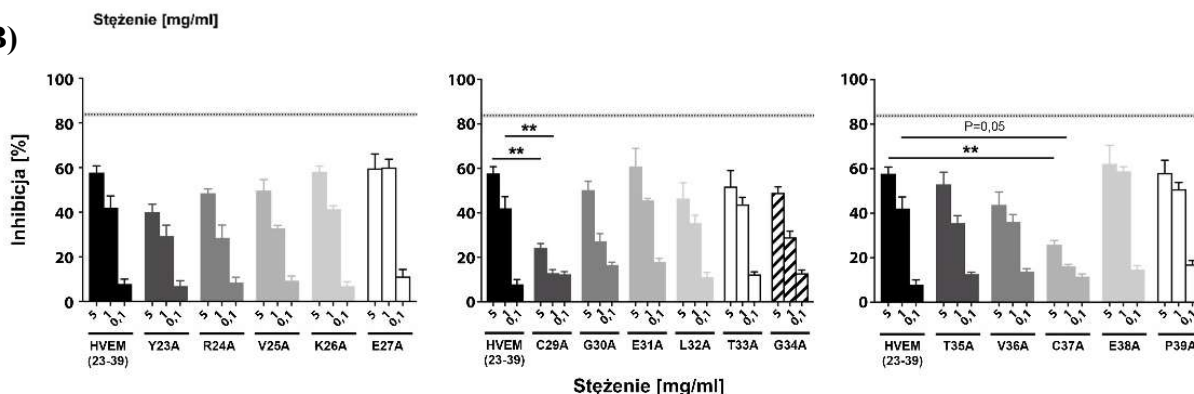
Aby określić, jaką rolę pełni cysteina w oddziaływaniu z BTLA i hamowaniu wiązania się białek BTLA i HVEM, otrzymałam również kilka innych analogów peptydu HVEM(23-39). Wyniki otrzymane z testów ELISA potwierdziły, że cysteina jest kluczowa dla właściwości hamujących również tych związków. Następnie postanowiłam sprawdzić wpływ aminokwasów: cysteiny, metioniny oraz dimeru cysteiny (cystyny) na hamowanie wiązania się białek BTLA i HVEM. Cysteina z wolną grupą sulfhydrylową częściowo zapobiegała tworzeniu kompleksu białkowego, podczas gdy metionina i cystyna, które nie posiadają wolnych grup –SH, nie wykazywały takich właściwości.

A)



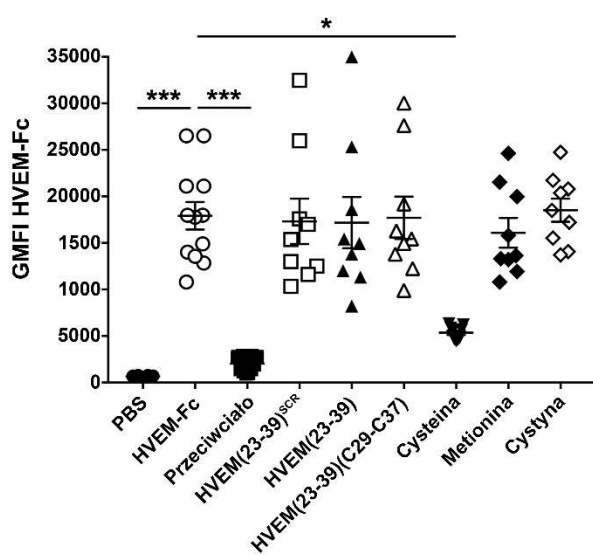
Rysunek 8. Właściwości hamujące peptydów: A) HVEM(23-39) oraz HVEM(23-39)^{SCR}; B) alaninowych analogów fragmentu HVEM(23-39), względem kompleksu BTLA/HVEM, określone na podstawie testów ELISA.

B)



W kolejnym etapie potencjał hamujący otrzymanych przez mnie związków względem kompleksu BTLA/HVEM, sprawdzony zostały w badaniach na liniach komórkowych, z potwierdzoną wcześniej ekspresją białka BTLA. Do badań tych wybrałam następujące związki: HVEM(23-39), HVEM(23-39)(C29-C37) – peptyd z wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem disulfidowym, HVEM(23-39)^{SCR} oraz aminokwasy: cysteinę, metioninę oraz cystynę. W przeciwieństwie do testów ELISA, peptyd HVEM(23-39) nie blokował wiązania się BTLA i

HVEM. Pozostałe związki również nie hamowały tworzenia kompleksu, jedynie cysteina wykazywała potencjał inhibicyjny (Rysunek 9).



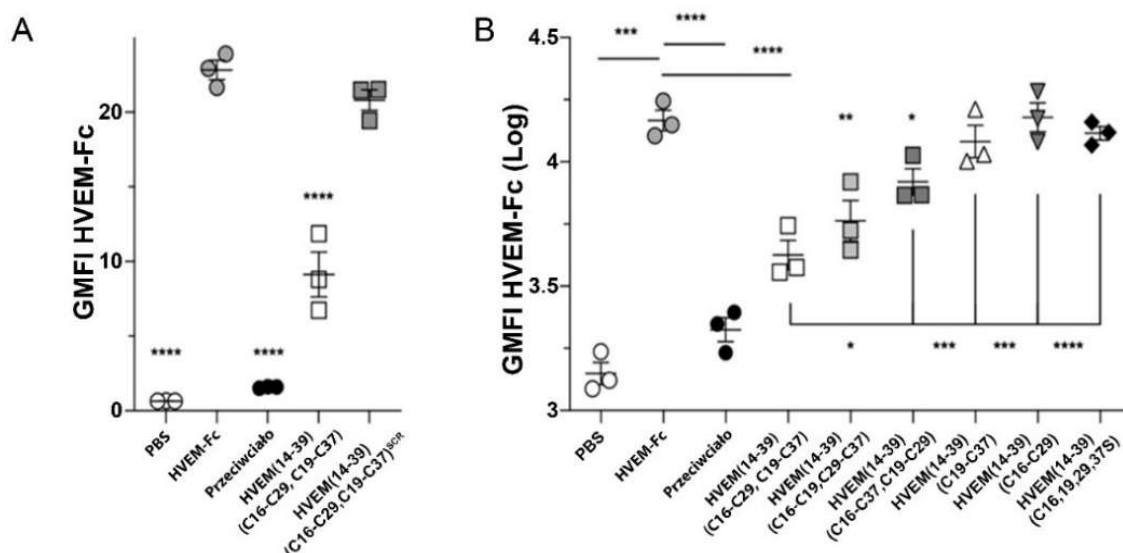
Rysunek 9. Właściwości hamujące wybranych peptydów oraz aminokwasów: cysteiny, metioniny oraz cystyny, względem kompleksu BTLA/HVEM, określone na podstawie testów z wykorzystaniem linii komórkowej z ekspresją białka BTLA; gFMI – średnia geometryczna intensywność fluorescencji (ang. geometric mean fluorescence intensity).

W domenie zewnątrzkomórkowej białka BTLA obecne jest sześć reszt cysteiny. Tworzą one trzy wiązania disulfidowe, które charakteryzują się różną dostępnością dla rozpuszczalnika. Grupy sulfhydrylowe peptydu HVEM(23-39), jego analogów oraz cysteiny mogą konkurować w testach ELISA z mostkami disulfidowymi (C58–C115 lub C34–C63), obecnymi w białku BTLA. W ten sposób mogą się tworzyć wiązania disulfidowe pomiędzy peptydem (lub cysteiną) i białkiem BTLA, co potwierdziłam przy wykorzystaniu testu Ellmana. Związanie peptydu z białkiem BTLA najprawdopodobniej hamuje oddziaływanie receptora z białkiem HVEM. Efekt ten nie był obserwowany w przypadku testów komórkowych (z wyjątkiem cysteiny), co sugeruje, że dostępność znajdującego się na powierzchni komórki białka BTLA, dla peptydów może być mniejsza.

Do dalszych badań wybrałam fragment białka HVEM składający się z reszt aminokwasowych 14-39 i posiadający dwa mostki disulfidowe w pozycjach 16–29 oraz 19–37, które występują również w natywnym białku HVEM. Oddziaływanie peptydu HVEM(14-39)(C16-C29,C19-C37) z białkiem BTLA potwierdziłam przy wykorzystaniu chromatografii powinowactwa oraz plazmonowego rezonansu powierzchniowego (ang. *surface plasmon resonance*, SPR), a wyznaczona równowagowa stała dysocjacji (ang. *equilibrium dissociation constant*, K_D) wynosiła 0,102 μM , co oznacza, że wiąże się on silniej z BTLA niż białko HVEM [20,23,84,85]. Właściwości hamujące tego peptydu względem kompleksu BTLA/HVEM zbadane zostały przy wykorzystaniu testów, w których użyto linii komórkowej z ekspresją białka BTLA. Otrzymane wyniki wskazywały, że HVEM(14-39)(C16-C29,C19-C37) hamuje

wiązanie się białek BTLA i HVEM. Otrzymałam również peptyd kontrolny – HVEM(14-39)(C16-C29,C19-C37)^{SCR}, ale on takich właściwości nie posiadał (Rysunek 10A).

W kolejnym etapie postanowiłam sprawdzić, jaki wpływ ma pozycja i ilość mostków disulfidowych w peptydzie, na hamowanie wiązania się białek BTLA i HVEM. W tym celu otrzymałam: (i) peptydy różniące się pozycją mostków: HVEM(14-39)(C16-C19,C29-C37) oraz HVEM(14-39)(C16-C37,C19-C29), (ii) peptydy z pojedynczym mostkiem disulfidowym: HVEM(14-39)(C16-C29) oraz HVEM(14-39)(C19-C37) oraz (iii) peptyd liniowy HVEM(14-39)(C16,19,29,37S), w którym reszty cysteiny wymieniłam na reszty seryny. Związki z dwoma mostkami disulfidowymi również blokowały wiązanie się białek, ale efekt ten jest dużo słabszy, niż ten obserwowany dla peptydu HVEM(14-39)(C16-C29,C19-C37). Peptydy z pojedynczym mostkiem oraz liniowy nie wykazywały właściwości hamujących (Rysunek 10B).



Rysunek 10. Właściwości hamujące peptydów, fragmentów białka HVEM, względem kompleksu BTLA/HVEM, określone na podstawie testów, w których wykorzystano linię komórkową z ekspresją białka BTLA, gFMI – średnia geometryczna intensywność fluorescencji.

Dla otrzymanego przez mnie peptydu HVEM(14-39)(C16-C29,C19-C37) określona została również struktura trzeciorzędowa, przy wykorzystaniu techniki magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. *nuclear magnetic resonance*, NMR). Badania te wykazały, że różni się ona od tej, jaką posiada dany fragment w białku HVEM, pomimo obecności dwóch mostków disulfidowych. Najbardziej zbliżoną konformację do odpowiedniego fragmentu białka HVEM wykazywały reszty aminokwasowe znajdujące się w pozycjach 32-36, które oddziałują z fragmentem 118-128 w białku BTLA. Wyniki eksperymentów uzyskane z dynamiki molekularnej, wykonanej w polu siłowym UNRES (ang. *UNited RESidue*) potwierdziły

oddziaływanie peptydu z białkiem BTLA i wykazały, że wiąże się on w tym samym miejscu co białko HVEM.

Peptyd HVEM(14-39)(C16-C29,C19-C37) wybrałam do dalszych badań, w których oceniłam jego wpływ na limfocyty T pochodzące od zdrowych dawców oraz od pacjentów z czerniakiem (wyniki opisane w podrozdziale 3.1.4.).

Sekwencje aminokwasowe omówionych wyżej peptydów przedstawiłam w Tabeli 2 (Peptydy: 1-30), a opisane powyżej wyniki opublikowane zostały w pracach:

H1. Spodzieja M, Lach S, Iwaszkiewicz J, Cesson V, Kalejta K, Olive D, Michielin O, Speiser DE, Zoete V, Derré L[✉], Rodziewicz-Motowidło S[✉]. *Design of short peptides to block BTLA/HVEM interactions for promoting anticancer T-cell responses*. PLoS One. 2017; 12(6):e0179201. doi: 10.1371/journal.pone.0179201;

H2. Spodzieja M, Kuncewicz K, Sieradzan A, Karczyńska A, Iwaszkiewicz J, Cesson V, Węgrzyn K, Zhukov I, Maszota-Zieleniak M, Michielin O, Speiser DE, Zoete V, Derré L[✉], Rodziewicz-Motowidło S[✉]. *Disulfide-Linked Peptides for Blocking BTLA/HVEM Binding*. Int J Mol Sci. 2020; 21(2):636. doi: 10.3390/ijms21020636.

Jak dotąd, ukazała się jedna praca, w której zaprojektowano i zbadano peptydy, których celem molekularnym było białko BTLA [86]. Wspomniane wyżej związki są to analogi fragmentów HVEM(26-39) oraz HVEM(14-39), w których wymienione zostały wybrane reszty aminokwasowe. Niektóre z nich silnie wiążą się z białkiem BTLA i posiadają zdolność do hamowania tworzenia kompleksu BTLA/HVEM w testach ELISA. Peptydy te posiadają jednak w swojej sekwencji aminokwasowej reszty cysteiny, z wolnymi grupami sulfhydrylowymi, których obecność może wpływać na ich właściwości hamujące, obserwowane w testach ELISA. Potencjał tych peptydów nie został zweryfikowany w żadnych innych badaniach eksperymentalnych.

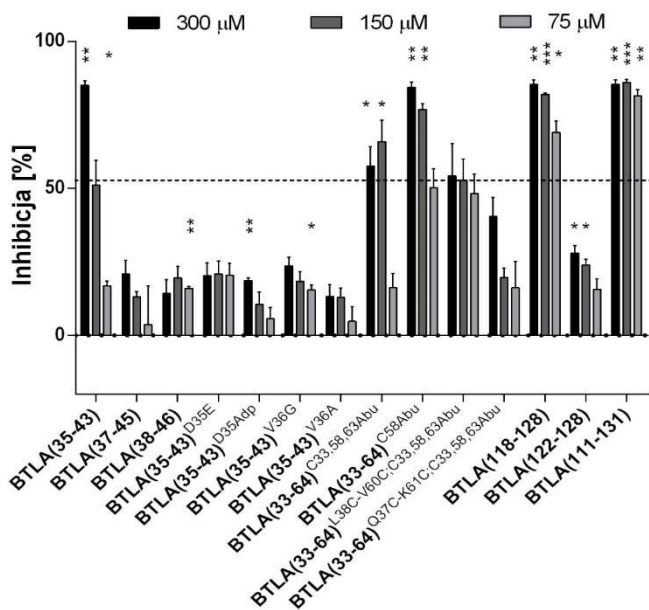
3.1.2. PEPTYDY ZAPROJEKTOWANE NA PODSTWIE SEKWENCJI AMINOKWASOWEJ BIAŁKA BTLA, KTÓRYCH CELEM MOLEKULARNYM JEST BIAŁKO HVEM

W kolejnym etapie prowadzonych badań jako cel molekularny wybrałam białko HVEM, a peptydy – potencjalne inhibitory wiązania się białek BTLA/HVEM, projektowałam na podstawie struktury i sekwencji aminokwasowej białka BTLA. Ponieważ byłam koordynatorem i pomysłodawcą wszystkich opisanych badań, przedstawię tutaj najważniejsze wyniki uzyskane przez mnie i innych członków zespołu badawczego.

W oddziaływanie z białkiem HVEM zaangażowane są dwa fragmenty białka BTLA – 35-43 oraz 118-128 (Rysunek 4). W pierwszym etapie dla kompleksu BTLA/HVEM (PDB: 2AW2) przeprowadzona została analiza uogólnionego modelu Borna i powierzchni molekularnej (ang. *molecular mechanics generalized Born surface area*, MM/GBSA). Analiza ta opiera się na symulacjach dynamiki molekularnej kompleksu receptor – ligand i pozwala określić wkład energetyczny poszczególnych reszt aminokwasowych w oddziaływanie białek. Wyznaczyliśmy dwa rodzaje energii: na resztę aminokwasową (ang. *per-residue*), która określa wkład energetyczny pojedynczego aminokwasu, obliczony poprzez zsumowanie jego interakcji ze wszystkimi aminokwasami w kompleksie białkowym oraz na parę reszt aminokwasowych (ang. *pairwise per-residue*), która określa energię wyznaczoną dla dwóch oddziałujących ze sobą reszt w kompleksie białkowym. Analiza ta wykazała, że reszty Q37, Y39, R42, Q43, R114, L123, I124, H127 w BTLA są kluczowe dla wiązania się z HVEM.

Na podstawie wyników otrzymanych z analizy MM/GBSA oraz bazując na strukturze krystalicznej kompleksu BTLA/HVEM zaprojektowałam i otrzymałam 14 peptydów, których celem molekularnym było białko HVEM. Składają się one z (i) krótkich peptydów, obejmujących *N*-koniec białka BTLA, (ii) dłuższych sekwencji zawierających *N*-koniec białka, do których wprowadziłam mostki disulfidowe oraz (iii) fragmentów *C*-końcowych białka BTLA. Mostki disulfidowe wprowadziłam do struktury peptydów poprzez wyminę wybranych reszt aminokwasowych na cysteiny, aby usztywnić ich strukturę i umożliwić im tworzenie struktury β -spinki, podobnej do tej, jaką posiada odpowiadający im fragment w białku BTLA. Liczne dane literaturowe potwierdzają ponadto, że struktura β -spinki w peptydzie może mieć kluczowe znaczenie dla jego oddziaływania z białkami bogatymi w struktury β , do których należy białko HVEM [87–89].

Dla peptydów tych wykonane zostały testy ELISA, na podstawie których, określiłam ich zdolność do blokowania wiązania się białek BTLA i HVEM. Wśród krótkich peptydów (i), obejmujących *N*-koniec białka BTLA, właściwości hamujące zaobserwowałam jedynie dla BTLA(35-43), który stanowi fragment natywnego białka BTLA. Wprowadzone do tej grupy związków modyfikacje nie wpłynęły pozytywnie na właściwości hamujące peptydów. Wszystkie długie peptydy (ii) blokowały wiązania się BTLA i HVEM, przy czym najlepszą zdolność do hamowania tworzenia kompleksu BTLA/HVEM obserwowałam dla peptydu BTLA(33-64)^{C58Abu}. Cząsteczka ta posiada mostek disulfidowy w pozycji 34–63, który również występuje w natywnym białku BTLA. Biorąc pod uwagę *C*-końcowe fragmenty białka BTLA (iii) zdolność do hamowania wiązania się białek wykazywały peptydy BTLA(118-128) oraz BTLA(111-131) (Rysunek 11).

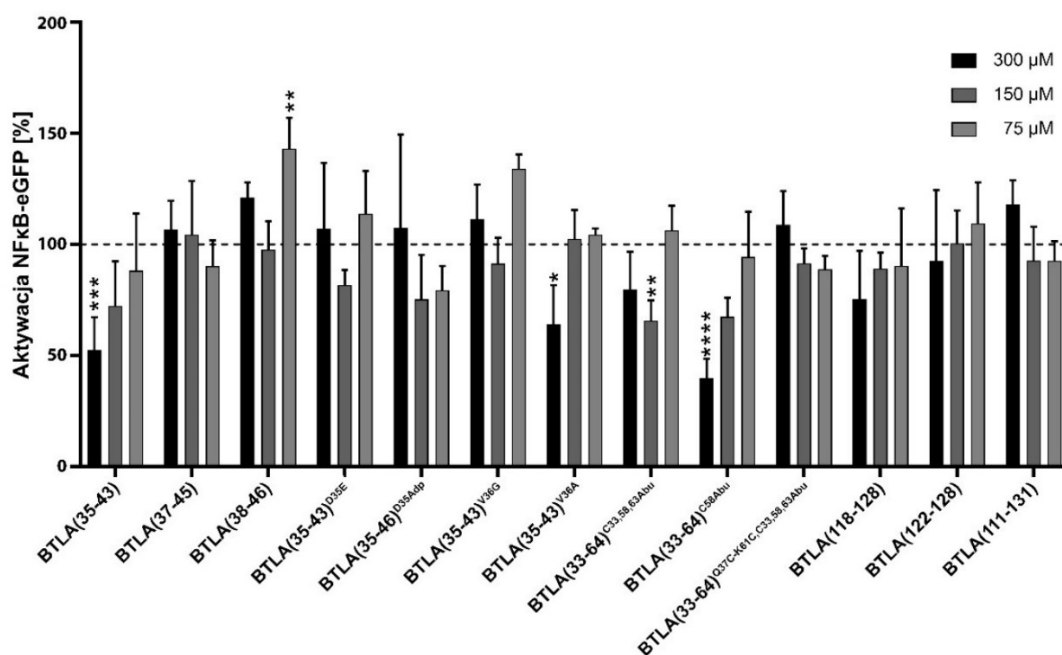


Rysunek 11. Właściwości hamujące peptydów, fragmentów białka BTLA, względem kompleksu BTLA/HVEM, określone na postawie testów ELISA.

W kolejnym etapie, dzięki współpracy, którą nawiązałam z prof. Peterem Steinbergerem z Uniwersytetu Medycznego w Wiedniu, mogłam ocenić właściwości hamujące otrzymanych i zaprojektowanych przez mnie związków, przy wykorzystaniu opracowanych w Jego grupie badawczej testów komórkowych. Przed ich wykonaniem sprawdziłam cytotoksyczność związków względem komórek wykorzystywanych w eksperymentach. Oceniona została również ich stabilność w pożywce, wykorzystywanej w hodowlach komórkowych. Peptyd BTLA(33-64)^{L38C-V60C;C33,58,63Abu} wykazywał właściwości cytotoksyczne, dlatego odrzuciłam go z dalszych badań.

Hamowanie tworzenia kompleksu BTLA/HVEM w obecności peptydów zbadaliśmy przy użyciu dwóch linii komórkowych: **(i)** komórek reporterowych z ekspresją białka HVEM (J-NF-κB::eGFP-HVEM) oraz **(ii)** stymulatora komórek T z ekspresją białka BTLA (TCS-BTLA). Komórki reporterowe skonstruowane są na linii komórkowej Jurkat E6.1, pochodzącej od pacjenta z ostrą białaczką limfoblastyczną T, natomiast komórki TCS skonstruowane zostały na linii BW5147, pochodzącej od myszy z chłoniakiem. Linie te zostały zmodyfikowane w taki sposób, aby zapewnić pierwszy sygnał niezbędny do aktywacji komórek reporterowych. Komórki reporterowe posiadają dodatkowo element odpowiedzi w postaci NF-κB, który po aktywacji powoduje ekspresję białka o wzmocnionej zielonej fluorescencji (ang. *enhanced green fluorescent protein*, eGFP). Po utworzeniu kompleksu BTLA/HVEM poziom aktywacji NF-κB wzrasta, spada natomiast, gdy oddziaływanie białek BTLA i HVEM zostaje zahamowane. Dwa peptydy – BTLA(35-43) i BTLA(33-64)^{C58Abu} wykazały właściwości hamujące, a w ich obecności poziom aktywacji NF-κB ulegał zmniejszeniu w sposób zależny

od stężenia. W przypadku pozostałych związków efekt ten nie był obserwowany lub nie był zależny od stężenia (Rysunek 12).



Rysunek 12. Właściwości hamujące peptydów, fragmentów białka BTLA, względem kompleksu BTLA/HVEM, określone na podstawie testów komórkowych.

Następnie, przy wykorzystaniu techniki SPR, wyznaczyłam stałe K_D dla białka HVEM i dla dwóch peptydów o najsilniejszych właściwościach hamujących. Ich wartości były do siebie bardzo zbliżone i wynosiły odpowiednio $1,50 \mu\text{M}$ dla BTLA(35-43) oraz $1,49 \mu\text{M}$ dla BTLA(33-64)^{C58Abu}. Zbliżone wartości K_D , jak również podobny potencjał hamujący może sugerować, że wydłużenie sekwencji i wprowadzenie mostka disulfidowego do peptydu BTLA(33-64)^{C58Abu} nie poprawiło jego właściwości. Peptyd BTLA(33-64)^{C58Abu} charakteryzuje się jednak znacznie większą stabilnością w osoczu niż BTLA(35-43), co powoduje, że posiada on większy potencjał zarówno w dalszych badaniach jak i w przyszłych zastosowaniach terapeutycznych. Jest to zgodne z danymi literaturowymi, które potwierdzają, że wprowadzenie do sekwencji peptydu mostka disulfidowego zwiększa jego stabilność [90–92]. Żaden z peptydów nie wykazywał cytotoksyczności w stosunku do jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (ang. *peripheral blood mononuclear cell*, PBMC), co potwierdza ich bezpieczeństwo biologiczne.

Struktura trzeciorzędowa peptydu BTLA(33-64)^{C58Abu} wyznaczona została przy wykorzystaniu techniki NMR. Porównanie struktury peptydu wyznaczonej za pomocą NMR, ze strukturą tego fragmentu w białku BTLA wykazało, że reszty aminokwasowe S44-D52 oraz

łańcuchy boczne aminokwasów takich jak K41, R42 i Q43 ułożone są przestrzennie w bardzo podobny sposób. Reszty R42 oraz Q43 są kluczowe dla wiązania się białek. Nie zaobserwowałam jednak podobieństw w ułożeniu przestrzennym reszt Q37 i Y39, które również są ważne dla oddziaływania białka BTLA z białkiem HVEM. Niestety, nie udało się przeprowadzić eksperymentu dokowania peptydu do białka HVEM, co mogłoby pokazać, czy związek ten zmienia swoją konformację podczas oddziaływania z celem molekularnym. Dla peptydu BTLA(35-43) nie określiłam struktury, gdyż jest on za krótki, aby przyjmować w roztworze zdefiniowaną konformację.

Badania dla peptydów BTLA(35-43) oraz BTLA(33-64)^{C58Abu} są przez mnie kontynuowane, a ich celem jest ocena wpływu tych związków na limfocyty T uzyskane od osób zdrowych oraz pacjentów z chorobami nowotworowymi i autoimmunologicznymi. Prace te są obecnie prowadzone we współpracy z dr hab. Anną Wardowską z Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w ramach projektu OPUS 22.

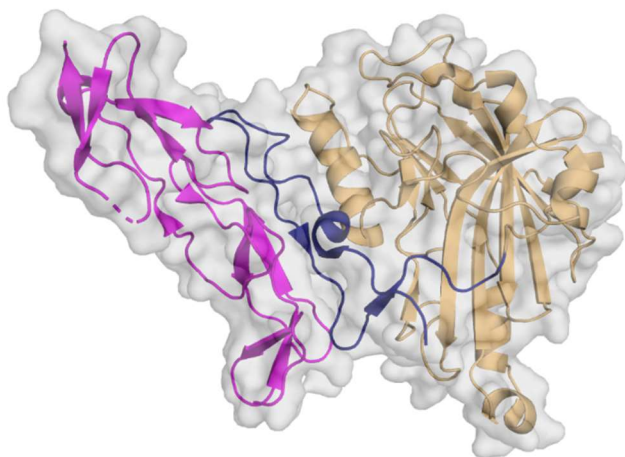
Sekwencje aminokwasowe otrzymanych peptydów przedstawiłam w Tabeli 2 (Peptydy: 31-44), a opisane powyżej wyniki opublikowane zostały w pracy:

H7. Kuncewicz K, Bojko M, Battin C, Karczyńska A, Sieradzan A, Sikorska E, Węgrzyn K, Wojciechowicz K, Wardowska A, Steinberger P, Rodziewicz-Motowidło S, **Spodzieja M**[✉]. *BTLA-derived peptides as inhibitors of BTLA/HVEM complex formation - design, synthesis and biological evaluation.* Biomed Pharmacother. 2023; 165:115161. doi: 10.1016/j.biopha.2023.115161.

3.1.3. PEPTYDY ZAPROJEKTOWANE NA PODSTAWIE SEKWENCJI AMINOKWASOWEJ GLIKOPROTEIN D, KTÓRYCH CELEM MOLEKULARNYM JEST BIAŁKO HVEM

Glikoproteina D (ang. *glycoprotein D*) wirusa opryszczki (ang. *herpes simplex virus type 1/2*, HSV-1/2) była pierwszym poznany ligandem białka HVEM [46,93]. Oddziałuje ona z HVEM, w tym samym miejscu co białka BTLA oraz CD160. W oddziaływanie to zaangażowany jest *N*-końcowy fragment białka gD, a dokładnej reszty aminokwasowe znajdujące się w pozycjach 7-15 oraz 26-32, które wiążą się głównie z domeną CRD1 białka HVEM (Rysunek 13). Porównanie struktury krystalicznej samego białka gD, ze strukturą tej cząsteczki w kompleksie z HVEM pokazało że, *N*-końcowy fragment gD ma strukturę nieuporządkowaną, która pod wpływem oddziaływania z HVEM ulega organizacji i tworzy strukturę β -spinki [94,95]. Dane literaturowe pokazują również, że białko gD zakłóca tworzenie kompleksu BTLA/HVEM [53,85]. W kolejnym etapie prowadzonych przez mnie badaniach

postanowiłam więc sprawdzić, czy podobne właściwości będą posiadały peptydy, bazujące na *N*-końcowym fragmencie białka gD. W tej części badań za cel molekularny również wybrałam białko HVEM, a peptydy projektowałam na podstawie struktury i sekwencji aminokwasowej *N*-końcowego fragmentu białka gD. Ponieważ byłam koordynatorem i pomysłodawcą wszystkich opisanych badań, przedstawiłam tutaj najważniejsze wyniki uzyskane przez mnie i innych członków zespołu badawczego.



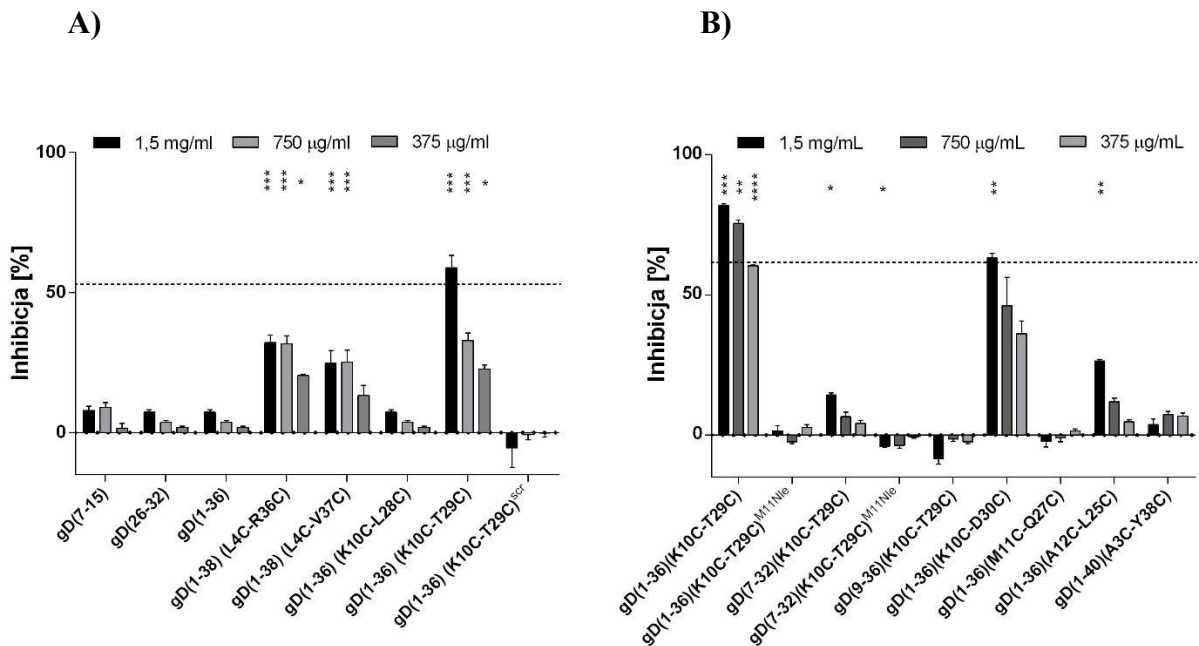
Rysunek 13. Struktura kompleksu HVEM/gD (PDB: 1JMA); HVEM – magenta, gD – pomarańczowy, fragment wiążący gD – granatowy.

Dla kompleksu HVEM/gD przeprowadzona została analiza MM/GBSA, która umożliwiła wyznaczenie wkładu energetycznego poszczególnych reszt, w oddziaływanie białek. Badania te pokazały, że reszty kluczowe w sekwencji aminokwasowej białka gD są: M11, A12, P14, N15, V24, Q27, L28, T29, P31, P32, R35. Na podstawie tych wyników oraz struktury krystalicznej HVEM/gD zaprojektowałam i otrzymałam 15 peptydów, bazujących na *N*-końcowym fragmencie glikoproteiny D. Do części z nich wprowadziłam mostki disulfidowe, aby umożliwić im tworzenie struktury β -spinki, podobnej do tej, jaką przyjmuje białko gD podczas wiązania się z HVEM.

Oddziaływanie peptydów z białkiem HVEM zbadalam za pomocą techniki SPR lub/i za pomocą chromatografii powinowactwa. Najsilniejsze wiązanie do białka HVEM obserwowałam dla peptydów: gD(1-36)(K10C-T29C) ($K_D = 1,30 \mu\text{M}$), gD(1-36)(K10C-D30C) ($K_D = 4,36 \mu\text{M}$), gD(1-36)(M11C-Q27C) ($K_D = 3,15 \mu\text{M}$) oraz gD(1-36)(A12C-L25C) ($K_D = 9,35 \mu\text{M}$). Pozostałe związki albo nie wiązały się z białkiem HVEM, albo oddziaływanie to było dużo słabsze niż dla tych opisanych powyżej.

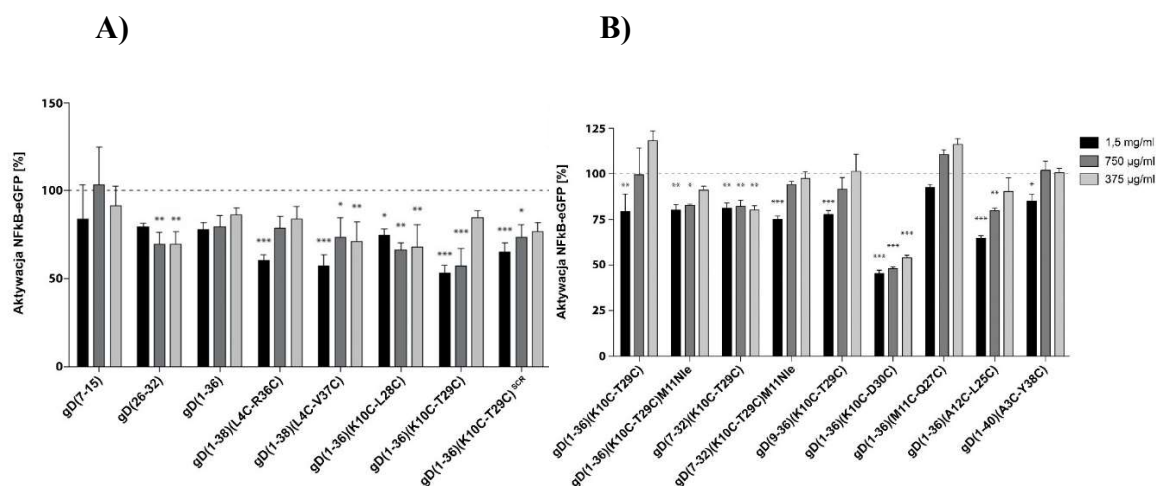
W kolejnym etapie dla peptydów wykonane zostały testy ELISA, w których oceniłam czy są one w stanie hamować tworzenie kompleksu BTLA/HVEM. Najlepsze właściwości

hamujące obserwowaliśmy dla dwóch peptydów gD(1-36)(K10C-T29C) oraz gD(1-36)(K10C-D30C). Związki gD(1-38)(L4C-R36C), gD(1-38)(L4C-V37C) oraz gD(1-36)(A12C-L25C) również blokowały wiązanie się białek, ale efekt ten był zdecydowanie słabszy (Rysunek 14).



Rysunek 14. Właściwości hamujące peptydów, fragmentów białka gD, względem kompleksu BTLA/HVEM, określone na podstawie testów ELISA; A) wyniki uzyskane dla peptydów opisanych w publikacji H3, B)) wyniki uzyskane dla peptydów opisanych w publikacji H4.

Zdolność peptydów do blokowania wiązania się białek BTLA/HVEM oceniłam również przy wykorzystaniu testów komórkowych. Badania te, podobnie jak dla peptydów bazujących na sekwencji aminokwasowej białka BTLA, wykonane zostały dzięki współpracy z prof. Peterem Steinbergerem z Uniwersytetu Medycznego w Wiedniu. Wszystkie peptydy z wyjątkiem gD(7-15) wykazywały pewne właściwości inhibicyjne względem kompleksu BTLA/HVEM. Związek gD(1-36)(K10C-D30C) – opisany w publikacji H3 oraz gD(1-36)(K10C-T29C) – opisany w publikacji H4, najlepiej hamowały wiązanie się białek BTLA i HVEM. Potencjał inhibicyjny obserwowaliśmy również dla peptydów gD(1-36)(A12C-L25C), gD(1-38)(L4C-R36C) oraz gD(1-38)(L4C-V37C), ale był on zdecydowanie słabszy (Rysunek15).



Rysunek 15. Właściwości hamujące peptydów, fragmentów białka gD, względem kompleksu BTLA/HVEM, określone na podstawie testów komórkowych; A) wyniki uzyskane dla peptydów opisanych w publikacji H3, B) wyniki uzyskane dla peptydów opisanych w publikacji H4.

Dla peptydu gD(1-36)(K10C-D30C), który wykazywał najlepszy potencjał do blokowania wiązania się białek BTLA i HVEM, wyznaczona została również struktura trzeciorzędowa, przy wykorzystaniu techniki NMR. Otrzymane wyniki pokazały, że różni się ona od tej, jaką posiada *N*-końcowy fragment białka gD w kompleksie z białkiem HVEM. Eksperymenty dokowania molekularnego, przy użyciu pola siłowego UNRES, potwierdziły że gD(1-36)(K10C-D30C) wiąże się z domeną CRD1 białka HVEM, w tym samym miejscu co białko BTLA. W wyniku tego oddziaływania peptyd w pewnym stopniu zmienia również swoją konformację, co powoduje, że staje się ona bardziej zbliżona do tej, którą posiada odpowiadający mu fragment białka gD, podczas oddziaływania z białkiem HVEM.

W kolejnym etapie postanowiłam ocenić stabilność otrzymanych związków w osoczu oraz zbadać ich wpływ na komórki PBMC. Do badań tych wybrałam następujące peptydy: gD(1-36)(K10C-D30C), gD(1-36)(K10C-T29C), gD(1-36)(A12C-L25C), gD(1-38)(L4C-R36C) oraz gD(1-38)(L4C-V37C). Otrzymane wyniki pokazały, że związki te nie są cytotoksyczne, co więcej niektóre z nich powodowały zwiększoną proliferację tych komórek. Peptydy charakteryzowały się również dość dużą stabilnością w osoczu, ale wiązały się ze składnikami osocza, takimi jak ludzka albumina, co zostało potwierdzone przy wykorzystaniu chromatografii powinowactwa. Cztery z opisanych powyżej związków wybrałam do dalszych badań, w których oceniłam ich wpływ na limfocyty T wyizolowane od osób zdrowych oraz od pacjentów z zaawansowanym czerniakiem (wyniki opisane w podrozdziale 3.1.4.).

Sekwencje aminokwasowe otrzymanych peptydów przedstawiłam w Tabeli 2 (Peptydy: 45-59), a opisane powyżej wyniki opublikowane zostały w pracach:

H3. Kuncewicz K, Battin C, Sieradzan A, Karczyńska A, Orlikowska M, Wardowska A, Pikula M, Steinberger P, Rodziewicz-Motowidło S, **Spodzieja M**[✉]. *Fragments of gD Protein as Inhibitors of BTLA/HVEM Complex Formation-Design, Synthesis, and Cellular Studies*. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(22):8876. doi: 10.3390/ijms21228876;

H4. Kuncewicz K, Battin C, Węgrzyn K, Sieradzan A, Wardowska A, Sikorska E, Giedroń I, Smardz P, Pikula M, Steinberger P, Rodziewicz-Motowidło S, **Spodzieja M**[✉]. *Targeting the HVEM protein using a fragment of glycoprotein D to inhibit formation of the BTLA/HVEM complex*. *Bioorg Chem*. 2022; 122:105748. doi: 10.1016/j.bioorg.2022.105748.

3.1.4. WPLYW WYBRANYCH PEPTYDÓW NA FUNKCJĘ LIMFOCYTÓW T POCHODZĄCYCH OD OSÓB ZDROWYCH ORAZ CHORYCH NA CZERNIAKA

W kolejnym etapie prowadzonych przez mnie prac naukowych postanowiłam sprawdzić, jaki wpływ mają otrzymane przez mnie peptydowe inhibitory wiązania się białek BTLA/HVEM, na funkcję limfocytów T otrzymanych od osób zdrowych oraz od pacjentów z czerniakiem. Badania te wykonałam na Gdańskim Uniwersytecie Medycznym, dzięki współpracy, którą nawiązałam z dr hab. Anna Wardowską, a otrzymane wyniki będą przedmiotem rozprawy doktorskiej mgr Karolina Wojciechowicz. Klasyfikacja pacjentów oraz materiał biologiczny otrzymany został natomiast dzięki współpracy z prof. Jackiem Jassemem oraz dr Jackiem Rutkowskim z Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego z Klinika Radioterapii i Onkologii.

Do testów tych wybrałam pięć związków (w publikacjach peptydy te określane są jako Pep(1) – Pep(5)):

- ✓ cztery bazujące na sekwencji aminokwasowej białka gD, których celem molekularnym jest białko HVEM: gD(1-36)(K10C-T29C), gD(1-36)(K10C-D30C), gD(1-36)(A12C-L25C), gD(1-38)(L4C-V37C);
- ✓ jeden bazujący na sekwencji aminokwasowej białka HVEM, który oddziałuje z białkiem BTLA: HVEM(14-39)(C16-C29,C19-C37).

W pierwszym etapie limfocyty T pochodzące od zdrowych dawców oraz pacjentów z czerniakiem podzielone zostały na dwie subpopulacje CD8⁺ (limfocyty cytotoksyczne) oraz CD4⁺ (limfocyty pomocnicze). Przy wykorzystaniu cytometrii przepływowej potwierdzona została obecność białek BTLA i HVEM, na obu subpopulacjach komórek T. Następnie, w celu zahamowania wiązania się białek BTLA i HVEM, komórki inkubowane były z otrzymanymi przez mnie peptydami.

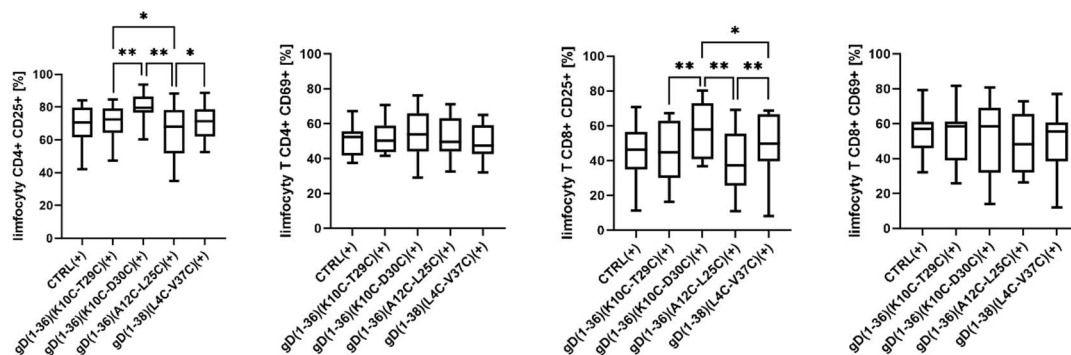
Zbadałam wpływ peptydów na:

- ekspresję białek BTLA i HVEM na limfocytach T;
- ekspresję markerów aktywacji na limfocytach T;
- proliferaację limfocytów T;
- apoptozę limfocytów T;
- powstawanie komórek pamięci;
- profil wydzielniczy komórek T;
- na komórki SK-MEL30 (ludzka linia komórkowa czerniaka) w kohodowli z limfocytami T.

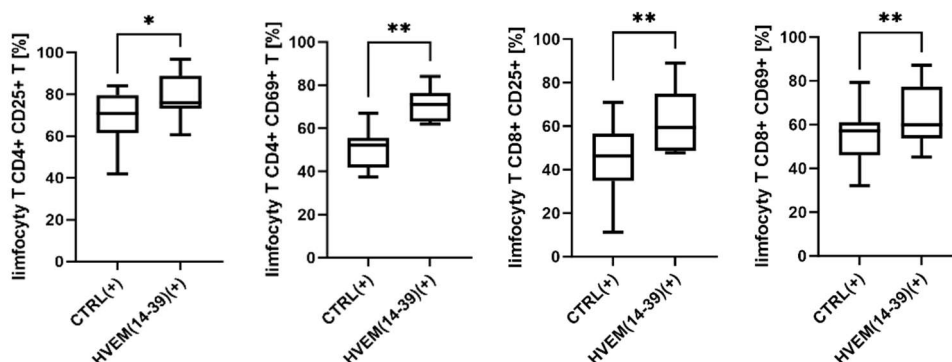
Otrzymane przez mnie związki miały najbardziej istotny wpływ na funkcje komórek T wymienione w punktach b i c, dlatego też zostaną one omówione poniżej. Ze względu na bardzo dużą ilość otrzymanych wyników, skupię się tutaj tylko na porównaniu komórek T pacjentów z zaawansowanym czerniakiem w obecności peptydu oraz w przypadku jego braku.

Cechą charakterystyczną aktywowanych limfocytów T jest to, że na ich powierzchni pojawiają się cząsteczki takie jak CD25 lub CD69, które należą do markerów aktywacji. Ekspresja CD69 ulega zwiększeniu zaraz po aktywacji limfocytu T, a cząsteczka ta stymuluje wytwarzanie i wydzielanie cytokin oraz proliferację komórek T [96]. CD25 jest natomiast późnym markerem aktywacji, a jego ekspresja wzrasta w sposób zależny od czasu [97]. Spośród fragmentów białka gD najbardziej znaczący wpływ na ekspresję markerów aktywacji miał peptyd gD(1-36)(K10C-D30C), który zwiększał ilość limfocytów zarówno CD4+ jak i CD8+, na powierzchni których, znajdowała się cząsteczka CD25. Nie miał on natomiast wpływu na ilość komórek T (zarówno CD4+ jak i CD8+), na powierzchni których znajdowała się cząsteczka CD69 (Rysunek 16A). Peptyd HVEM(14-39)(C16-C29,C19-C37) znacząco zwiększał natomiast ilość komórek CD4+ oraz CD8+, na których powierzchni znajdowały się oba markery aktywacji. Podobne wyniki obserwowałam również w przypadku inkubacji peptydów z limfocytami T uzyskanymi od osób zdrowych.

A)



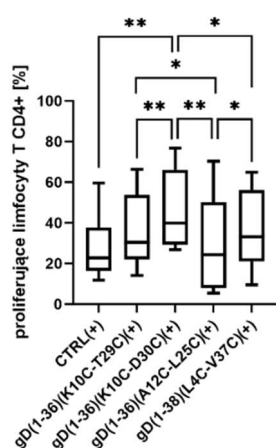
B)



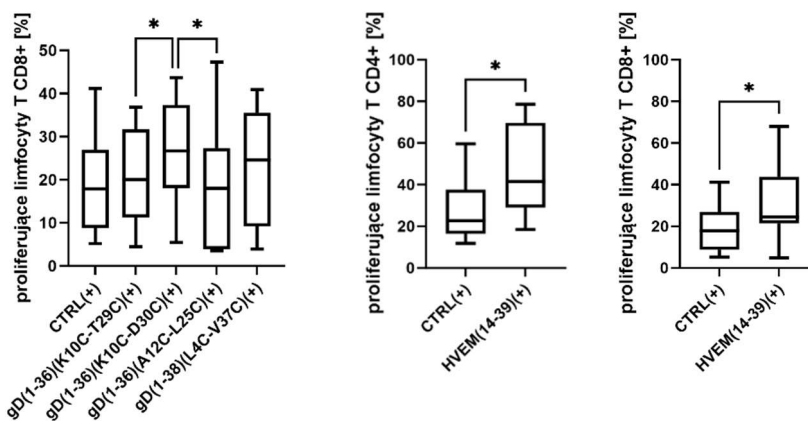
Rysunek 16. Ekspresja markerów aktywacji na limfocytach T CD4+ i CD8+, otrzymanych od chorych z zaawansowanym czerniakiem, w obecności badanych peptydów: A) fragmentów białka gD, B) peptydu HVEM(14-39)(C16-C29,C19-C37), CTRL(+) – kontrola bez peptydu.

W kolejnym etapie sprawdziłam wpływ związków na proliferację limfocytów T. Peptydy gD(1-36)(K10C-D30C) oraz HVEM(14-39)(C16-C29,C19-C37) znacząco zwiększały proliferację obu subpopulacji komórek T (Rysunek 17). Pozostałe związki, fragmenty białka gD, również miały wpływ na proliferację limfocytów T, ale efekt ten był zdecydowanie słabszy.

A)



B)



Rysunek 17. Proliferacja limfocytów T uzyskanych od osób chorych na czerniaka w obecności peptydów; A) fragmentów białka gD, B) peptydu HVEM(14-39)(C16-C29,C19-C37), CTRL(+) – kontrola bez peptydu.

Otrzymane wyniki wskazują, że peptydy hamujące wiązanie się białek BTLA i HVEM, wykazują również potencjał immunomodulacyjny i są w stanie wpływać na funkcję limfocytów T takie jak aktywacja i proliferacja. Jest to zgodne z zakładanym mechanizmem ich działania. Najbardziej obiecującymi związkami są peptydy gD(1-36)(K10C-D30C) oraz HVEM(14-39)(C16-C29,C19-C37). Poza opisanymi wyżej wynikami, oba związki mają również wpływ na powstawanie komórek pamięci, apoptozę komórek T jak również wpływają na wydzielanie cytokin takich jak IL-1 β i sCD137. Są to pierwsze opisane w literaturze związki, inne niż przeciwciała, które poprzez hamowanie tworzenia kompleksu BTLA/HVEM wpływają na funkcje komórek T. Ze względu jednak na skomplikowaną sieć tworzoną przez białka BTLA i HVEM, dla peptydów tych wymagane są dalsze badania. Zaprezentowane wyniki opisane zostały w pracach:

H8. Wojciechowicz K, Kuncewicz K, Lisowska KA, Wardowska A[✉], **Spodzieja M[✉]**. *Peptides targeting the BTLA-HVEM complex can modulate T cell immune response*. Eur J Pharm Sci. 2024 Feb 1;193:106677. doi: 10.1016/j.ejps.2023.106677;

H11. Wojciechowicz K, Kuncewicz K, Rutkowski J, Jassem J, Rodziewicz-Motowidło S, Wardowska A[✉], **Spodzieja M[✉]**. *Targeting BTLA with the peptide inhibitor HVEM(14-39) - A new way to restore the activity of T cells in melanoma*. Biomed Pharmacother. 2024; 175:116675. doi: 10.1016/j.biopha.2024.116675;

H12. Wojciechowicz K, Kuncewicz K, Rutkowski J, Jassem J, Wardowska A[✉], **Spodzieja M[✉]**. *The effect of gD-derived peptides on T cell immune response mediated by BTLA-HVEM protein complex in melanoma patients*. Front Immunol. 2024; 15:1362152. doi: 10.3389/fimmu.2024.1362152.

3.2. PEPTYDOWE INHIBITORY WIĄZANIA SIĘ BIAŁEK PD-1/PD-L1

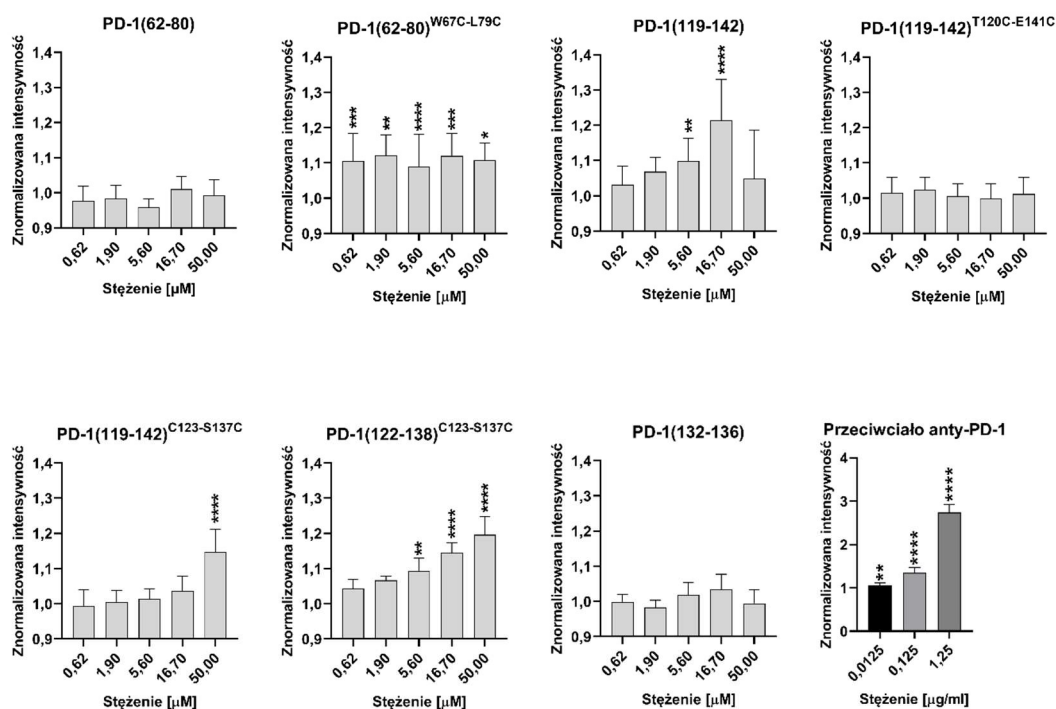
Do zaprojektowania inhibitorów wiązania się białek wykorzystałam strukturę krystaliczną kompleksu PD-1/PD-L1 (PDB:4ZQK). Badania te realizowałam w ramach projektu pt. „*Immunomodulatory peptydowe jako inhibitory punktów kontrolnych PD-1/PD-L1 następnej generacji*” finansowanego przez Naukową Fundację Polpharmy, w którym byłam wykonawcą. Przedstawione poniżej wyniki były przedmiotem rozprawy doktorskiej dr Magdaleny Bojko pt. „*Searching for peptides interacting with the PD-1 and PD-L1 immune checkpoint proteins for cancer immunotherapies*”, w której pełniłam funkcję promotora pomocniczego. W tej części przedstawionych badań zajmowałam się koordynowaniem i planowaniem wszystkich prac eksperymentalnych.

3.2.1. PEPTYDY ZAPROJEKTOWANE NA PODSTAWIE SEKWENCJI AMINOKWASOWEJ BIAŁKA PD-1, KTÓRYCH CELEM MOLEKULARNYM JEST BIAŁKO PD-L1

W pierwszym etapie prowadzonych badań jako cel molekularny wybrałam białko PD-L1, a peptydy – potencjalne inhibitory wiązania się białek, projektowałam na podstawie struktury i sekwencji aminokwasowej białka PD-1. Struktura krystaliczna kompleksu PD-1/PD-L1 umożliwiły mi zaprojektowanie 13 peptydów, bazujących na dwóch fragmentach wiążących białka PD-1, pokrywających środkową część białka oraz jego C-koniec (Rysunek 6). Do niektórych peptydów wprowadziłam wewnątrzcząsteczkowe mostki disulfidowe, poprzez wymianę wybranych reszt aminokwasowych na reszty cysteiny, po to, aby usztywnić ich strukturę i ułatwić im tworzenie struktury β -spinki.

Dla peptydów tych oraz białka PD-L1 wyznaczone zostały równowagowe stałe dysocjacji. Najsilniejsze oddziaływanie z białkiem PD-L1 zaobserwowałam dla peptydów: PD-1(119-142)^{T120C-E141C} ($K_D = 5,36 \mu\text{M}$), PD-1(119-142)^{C123-S137C} ($K_D = 4,66 \mu\text{M}$), PD-1(122-138)^{C123-S137C} ($K_D = 1,52 \mu\text{M}$) oraz PD-1(132-136) ($K_D = 7,30 \mu\text{M}$), przy czym K_D wyznaczona w tych samych warunkach eksperymentalnych dla białek PD-1 i PD-L1 wynosiła $1,56 \mu\text{M}$. Podane w literaturze wartości K_D otrzymane dla kompleksu PD-1/PD-L1 różnią się w zależności od warunków eksperymentu i mieszczą się one w przedziale $1,15 - 8,2 \mu\text{M}$ [57,98]. Otrzymane wyniki wskazują, że jeden z zaprojektowanych przez mnie peptydów określany jako PD-1(122-138)^{C123-S137C}, wiąże się z białkiem PD-L1 z podobną siłą, co białko PD-1.

Zdolność peptydów do zakłócania wiązania się białek PD-1/PD-L1 oceniłam przy wykorzystaniu komercyjnie dostępnych testów komórkowych. Do badań tych wybrałam tylko te związki, które wiązały się z białkiem PD-L1. Przed ich wykonaniem sprawdzona została stabilność peptydów w pożywce wykorzystywanej w hodowlach komórkowych oraz ich cytotoksyczność względem linii komórkowych używanych w testach. Pozwoliło mi to na wybór odpowiednich stężeń związków do dalszych badań. Właściwości hamujące względem kompleksu PD-1/PD-L1 obserwowałam dla peptydów PD-1(119-142)^{C123-S137C} i PD-1(122-138)^{C123-S137C}, przy czym dla pierwszego z nich wartości statystycznie zależne udało otrzymać się jedynie dla najwyższego stężenia. Liniowy peptyd PD-1(119-142) oraz PD-1(62-80)^{W67C-L79C} również zakłócały wiązanie się białek, ale efekt ten nie był stężeniowo zależny (Rysunek 18). Peptydy PD-1(119-142)^{C123-S137C} i PD-1(122-138)^{C123-S137C} posiadają mostek disulfidowy w tej samej pozycji, co może sugerować, że zastąpienie reszty seryny w pozycji 137 resztą cysteiny i wprowadzenie mostka disulfidowego w pozycjach 123–137 jest korzystne dla oddziaływania związków z celem molekularnym.



Rysunek 18. Właściwości hamujące peptydów, fragmentów białka PD-1, względem kompleksu PD-1/PD-L1, określone na podstawie testów komórkowych.

Peptyd PD-1(122-138)^{C123-S137C} najsilniej wiązał się z białkiem PD-L1 oraz posiadał największy potencjał hamujący względem kompleksu PD-1/PD-L1, spośród zaprojektowanych przez mnie związków, dlatego też w kolejnym etapie postanowiłam wyznaczyć jego strukturę trzeciorzędową. Wyniki uzyskane z NMR wykazały, że tworzy on dwie główne rodziny konformacyjne, które różnią się od siebie ułożeniem *N*- i *C*-końców reszt aminokwasowych. Poza tym, peptyd ten ma dobrze zdefiniowaną strukturę trzeciorzędową, podobną do tej, jaką przyjmuje odpowiadający mu fragment w białku PD-1. Wyniki uzyskane z eksperymentów dokowania molekularnego, przy wykorzystaniu pola siłowego UNRES wykazały ponadto, że peptyd PD-1(122-138)^{C123-S137C} wiąże się z PD-L1, w tym samym miejscu co białko PD-1.

Sekwencje aminokwasowe omówionych wyżej peptydów przedstawiłam w Tabeli 2 (Peptydy: 60-72), a opisane powyżej wyniki opublikowane zostały w pracy:

H6. Bojko M, Węgrzyn K, Sikorska E, Kocikowski M, Parys M, Battin C, Steinberger P, Kogut MM, Winnicki M, Sieradzan AK, **Spodzieja M**[✉], Rodziewicz-Motowidło S[✉]. *Design, synthesis and biological evaluation of PD-1 derived peptides as inhibitors of PD-1/PD-L1*

complex formation for cancer therapy. Bioorg Chem. 2022; 128:106047. doi: 10.1016/j.bioorg.2022.106047.

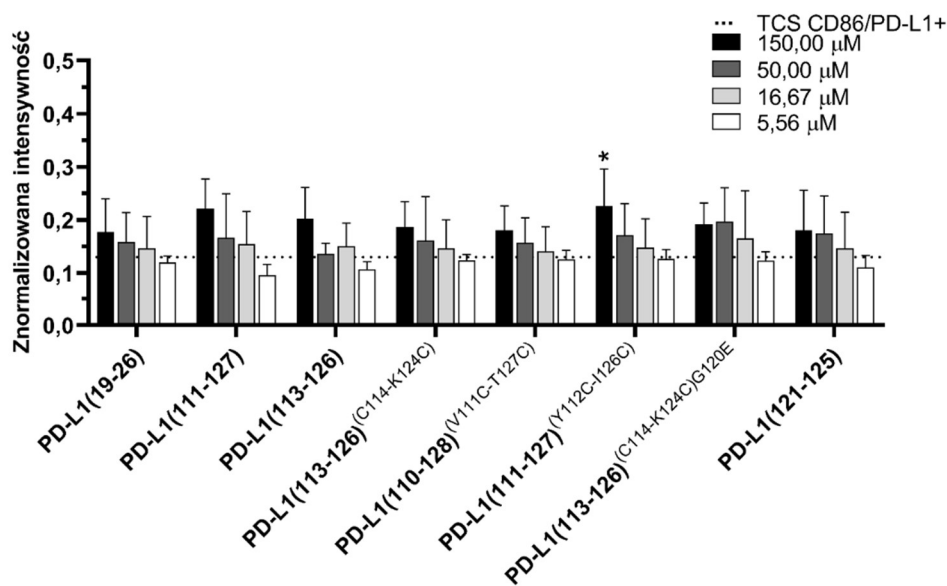
3.2.2. PEPTYDY ZAPROJEKTOWANE NA PODSTAWIE SEKWENCJI AMINOKWASOWEJ BIAŁKA PD-L1, KTÓRYCH CELEM MOLEKULARNYM JEST BIAŁKO PD-1

W kolejnym etapie prowadzonych badań zaprojektowałam peptydy, bazujące na sekwencji aminokwasowej białka PD-L1, których celem molekularnym było białko PD-1. Podobnie jak poprzednio, wykorzystałam do tego celu strukturę krystaliczną kompleksu białek. Za oddziaływanie z białkiem PD-1 odpowiedzialne są trzy fragmenty białka PD-L1 (Rysunek 6), natomiast najważniejszymi resztami aminokwasami w ligandzie są: F19, R113, A121, Y123, R125. Na podstawie tych danych, zaprojektowałam 15 peptydów. Do części z nich wprowadziłam mostki disulfidowe, poprzez wymianę wybranych reszt aminokwasowych na reszty cysteiny.

Aby ocenić wiązanie się peptydów z celem molekularnym, dla związków tych wykonane zostały testy ELISA oraz pomiary SPR. Wyniki, jakie uzyskałam z pomiarów SPR, wykazały, że peptyd PD-L1(111-127)^(Y112C-I126C) najsilniej oddziałuje z białkiem PD-1, a wyznaczona wartość K_D wynosiła 2,04 μM . Pozostałe peptydy wiązały się z receptorem dużo słabiej lub z nim nie oddziaływały.

Właściwości hamujące peptydów względem kompleksu PD-1/PD-L1 oceniłam na podstawie testów kompetycyjnych oraz badań komórkowych. Eksperymenty te wykonane zostały w laboratorium prof. Petera Steinbergera z Uniwersytetu Medycznego w Wiedniu. Podobnie jak dla innych, opisanych wcześniej związków, przed wykonaniem tych badań sprawdzona została ich stabilność w pożywce wykorzystywanej w testach oraz ich cytotoksyczność względem badanych komórek. W testach kompetycyjnych wykorzystane zostały linie komórkowe z ekspresją białka PD-1. Największą zdolność do wypierania białka PD-L1 z kompleksu z białkiem PD-1 zaobserwowałam dla dwóch związków: PD-L1(19-26) oraz PD-L1(111-127)^(Y112C-I126C). Testy komórkowe, podobnie jak dla inhibitorów wiązania się białek BTLA/HVEM, wykonane zostały z wykorzystaniem dwóch linii komórkowych **(i)** komórek reporterowych z ekspresją białka PD-1 (J-NF- κ B::eGFP-PD-1) oraz **(ii)** stymulatora komórek T z ekspresją białka PD-L1 (TCS-PD-L1). Właściwości hamujące względem kompleksu PD-1/PD-L1 posiadała większość peptydów, jednak zależność statystyczną udało

się uzyskać jedynie dla peptydu PD-L1(111-127)^(Y112C-I126C), przy najwyższym testowanym stężeniu (Rysunek 19).



Rysunek 19. Właściwości hamujące peptydów, fragmentów białka PD-L1, względem kompleksu PD-1/PD-L1, określone na podstawie testów komórkowych.

Peptyd PD-L(111-127)^(Y112C-I126C) posiadał największą zdolność do hamowania tworzenia kompleksu PD-1/PD-L1, konkuruje z PD-L1 o wiązanie z PD-1 i charakteryzuje się najsilniejszym wiązaniem z receptorem spośród testowanych związków, dlatego też został on przez mnie wybrany do dalszych badań. Dla peptydu tego wyznaczona została struktura trzeciorzędowa przy wykorzystaniu techniki NMR. Otrzymane wyniki pokazały, że peptyd PD-L(111-127)^(Y112C-I126C) nie tworzy dobrze zdefiniowanej struktury, ale wiąże się on z receptorem w tym samym miejscu co białko PD-L1, co udało się potwierdzić dzięki wynikom uzyskanym z eksperymentów dynamiki molekularnej.

Sekwencje aminokwasowe omówionych wyżej peptydów przedstawiłam w Tabeli 2 (Peptydy: 73-87), a opisane powyżej wyniki opublikowane zostały w pracy:

H9. Bojko M, Węgrzyn K, Sikorska E, Ciura P, Battin C, Steinberger P, Magiera-Mularz K, Dubin G, Kulesza A, Sieradzan AK, **Spodzieja M**[✉], Rodziewicz-Motowidło S[✉]. *Peptide-based inhibitors targeting the PD-1/PD-L1 axis: potential immunotherapeutics for cancer.* Transl Oncol. 2024; 42:101892. doi: 10.1016/j.tranon.2024.101892.

4. WSPÓŁPRACA NAUKOWA

Stosunkowo szeroki zakres prowadzonych prac naukowo-badawczych z pogranicza chemii, biochemii i immunologii wymagał interdyscyplinarnego podejścia do analizy problemów oraz nawiązania współprac naukowych z ośrodkami badawczymi z zagranicy, Polski oraz naukowcami z Uniwersytetu Gdańskiego. Opisane w przedstawionym osiągnięciu badania udało się zrealizować dzięki współpracy z:

- ✓ Dr Laurent Derré (University Hospital of Lausanne, Urology Department, Urology Research Unit, Switzerland) oraz prof. Daniel Speiser (University of Lausanne, Department of Oncology, Switzerland) – stanowili Oni cenne wsparcie merytoryczne, ze względu na swoje doświadczenie w podjętej przez mnie nowej tematyce badań; współpraca z dr Laurent Derré obejmowała również badania komórkowe oraz testy ELISA (prace: H1 i H2);
- ✓ Prof. Vincent Zoete oraz dr Justyna Iwaszkiewicz (SIB Swiss Institute of Bioinformatics, Switzerland) – współpraca obejmowała badania dynamiki molekularnej z wykorzystaniem pełnoatomowego pola siłowego CHARMM (praca: H1);
- ✓ Prof. Peter Steinberger oraz dr Claire Battin (Medical University of Vienna, Institute of Immunology, Division of Immune Receptors and T cell Activation) – współpraca obejmowała badania z wykorzystaniem opracowanych w tej grupie badawczej platform komórkowych (prace: H3, H4, H7 oraz H9);
- ✓ Dr hab. Anna Wardowska (Gdański Uniwersytet Medyczny, Wydział Lekarski, Katedra i Zakład Fizjopatologii) – współpraca dotyczyła określenia wpływu otrzymanych przez mnie związków na funkcję limfocytów T oraz badań cytotoksyczność peptydów względem komórek PBMC (prace: H3, H4, H7, H8, H11 oraz H12);
- ✓ Dr Katarzyna Węgrzyn (Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Instytut Biotechnologii, Zakład Biologii Molekularnej) – współpraca dotyczyła pomiarów SPR oraz wyznaczania paramentów kinetycznych wiązania białko-białko, białko-peptyd (prace: H2, H4, H6, H7 oraz H9).
- ✓ Dr hab. Adam Sieradzan (Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii, Katedra Chemii Teoretycznej, Pracownia Modelowania Molekularnego) – współpraca dotyczyła dokowania białko/białko, białko/peptyd przy wykorzystaniu pola siłowego UNRES (prace: H2, H3, H4, H6, H7 oraz H9);
- ✓ Dr hab. Emilia Sikorska (Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii, Katedra Chemii Organicznej, Pracownia Badań Strukturalnych Biopolimerów) – współpraca dotyczyła

wyznaczania struktury peptydów przy wykorzystaniu techniki NMR (prace: H4, H6, H7 oraz H9).

- ✓ Prof. Jacek Jassem oraz dr med. Jacek Rutkowski (Gdański Uniwersytet Medyczny, Klinika Radioterapii i Onkologii) – współpraca dotyczyła klasyfikacji pacjentów do badań oraz dostarczenia materiału biologicznego (prace: H11 oraz H12).

5. PODSUMOWANIE

W ramach prowadzonych przeze mnie badań:

- ✓ zaprojektowałam i otrzymałam 59 peptydów – potencjalnych inhibitorów wiązania się białek BTLA/HVEM, których sekwencje aminokwasowe bazowały na fragmentach wiążących białek HVEM, BTLA oraz gD. Wykazałam, że sześć z nich wiąże się z białkami BTLA lub HVEM i hamuje tworzenie kompleksu BTLA/HVEM;
- ✓ wykazałam, że spośród otrzymanych przez mnie inhibitorów wiązania się białek BTLA/HVEM, dwa peptydy są w stanie wpływać na funkcje limfocytów T takie jak: aktywacja, proliferacja, powstawanie komórek pamięci, apoptoza i wydzielanie cytokin. Są to jedyne opisane w literaturze związki (inne niż przeciwciała), które poprzez hamowanie wiązania się białek BTLA i HVEM, przywracają prawidłowe funkcje limfocytów T;
- ✓ zaprojektowałam 27 peptydów – potencjalnych inhibitorów wiązania się białek PD-1/PD-L1. Dwa z nich wiążą się z białkami PD-1 lub PD-L1 z wartościami stałych K_D zbliżonymi do tej wyznaczonej dla kompleksu PD-1/PD-L1 i wykazują potencjał hamujący. Będą one przeze mnie modyfikowane, w celu poprawy ich właściwości hamujących.

Sekwencje aminokwasowe wszystkich zaprojektowanych i testowanych peptydów przedstawiłam w Tabeli 2.

Tabela 2. Sekwencje aminokwasowe peptydów, potencjalnych inhibitorów wiązania się białek BTLA-HVEM oraz PD-1/PD-L1, X_1 – norleucyna (Nle), X_2 – kwas 2-aminobutanowy (Abu), & – pozycja mostka disulfidowego.

Lp.	PEPTYD	SEKWENCJA AMINOKWASOWA
PEPTYDY ZAPROJEKTOWANE NA PODSTAWIE SEKWENCJI AMINOKWASOWEJ BIAŁKA HVEM, KTÓRYCH CELEM MOLEKULARNYM JEST BIAŁKO BTLA		
1.	HVEM(23-39)	Ac-YRVKEACGELTGTVCEP-NH ₂
2.	HVEM(23-39)Y23A	Ac-ARVKEACGELTGTVCEP-NH ₂
3.	HVEM(23-39)R24A	Ac-YAVKEACGELTGTVCEP-NH ₂
4.	HVEM(23-39)V25A	Ac-YRAKEACGELTGTVCEP-NH ₂
5.	HVEM(23-39)K26A	Ac-YRVAEACGELTGTVCEP-NH ₂
6.	HVEM(23-39)E27A	Ac-YRVKAACGELTGTVCEP-NH ₂

7.	HVEM(23-39)C29A	Ac-YRVKEAAGELTGTVCEP-NH ₂
8.	HVEM(23-39)G30A	Ac-YRVKEACAELTGTVCEP-NH ₂
9.	HVEM(23-39)E31A	Ac-ARVKEACGALTGTVCEP-NH ₂
10.	HVEM(23-39)L32A	Ac-ARVKEACGEATGTVCEP-NH ₂
11.	HVEM(23-39)T33A	Ac-ARVKEACGELAGTVCEP-NH ₂
12.	HVEM(23-39)G34A	Ac-ARVKEACGELTATVCEP-NH ₂
13.	HVEM(23-39)T35A	Ac-ARVKEACGELTGAVCEP-NH ₂
14.	HVEM(23-39)V36A	Ac-ARVKEACGELTGTACEP-NH ₂
15.	HVEM(23-39)C37A	Ac-ARVKEACGELTGTVAEP-NH ₂
16.	HVEM(23-39)E38A	Ac-ARVKEACGELTGTVCAP-NH ₂
17.	HVEM(23-39)P39A	Ac-ARVKEACGELTGTVCEA-NH ₂
18.	HVEM(23-39) ^{SCR}	Ac-ELCAGPVTRKVECTYGE-NH ₂
19.	HVEM(23-39)C29S	Ac-YRVKEASGELTGTVCEP-NH ₂
20.	HVEM(23-39)C29Y	Ac-YRVKEAYGELTGTVCEP-NH ₂
21.	HVEM(31-39)	Ac-ELTGTVCEP-NH ₂
22.	HVEM(31-39)C37S	Ac-ELTGTVSEP-NH ₂
23.	HVEM(23-39)(C29-C37)	Ac-YRVKEAC(&)GELTGTVC(&)EP-NH ₂
24.	HVEM(14-39) (C16-C29,C19-C37)	Ac-ESC(&)PKC(&)SPGYRVKEAC(&)GELTGTVC(&)EP-NH ₂
25.	HVEM(14-39) (C16-C19,C29-C37)	Ac-ESC(&)PKC(&)SPGYRVKEAC(&)GELTGTVC(&)EP-NH ₂
26.	HVEM(14-39) (C16-C37,C19-C29)	Ac-ESC(&)PKC(&)SPGYRVKEAC(&)GELTGTVC(&)EP-NH ₂
27.	HVEM(14-39)(C16-C29)	Ac-ESC(&)PKSSPGYRVKEAC(&)GELTGTVSEP-NH ₂
28.	HVEM(14-39)(C19-C37)	Ac-ESSPKC(&)SPGYRVKEASGELTGTVC(&)EP-NH ₂
29.	HVEM(14-39)(C16,19,29,37S)	Ac-ESSPKSSPGYRVKEASGELTGTVSEP-NH ₂
30.	HVEM(14-39) ^{SCR}	Ac-SEC(&)GRC(&)EAPEKTKSLC(&)VTPEPVGC(&)YG-NH ₂
PEPTYDY ZAPROJEKTOWANE NA PODSTWIE SEKWENCJI AMINOKWASOWEJ BIAŁKA BTLA, KTÓRYCH CELEM MOLEKULARNYM JEST BIAŁKO HVEM		
31.	BTLA(35-43)	Ac-DVQLYIKRQ-NH ₂
32.	BTLA(37-45)	Ac-QLYIKRQSE-NH ₂
33.	BTLA(38-46)	Ac-LYIKRQSEH-NH ₂
34.	BTLA(35-43) ^{D35E}	Ac-EVQLYIKRQ-NH ₂
35.	BTLA(35-43) ^{D35Adp}	Ac-AdpVQLYIKRQ-NH ₂
36.	BTLA(35-43) ^{V36G}	Ac-DGQLYIKRQ-NH ₂
37.	BTLA(35-43) ^{V36A}	Ac-DAQLYIKRQ-NH ₂
38.	BTLA(33-64) ^{C34,58,63Abu}	Ac-SX ₂ DVQLYIKRQSEHSILAGDPFELEX ₂ PVKYX ₂ A-NH ₂
39.	BTLA(33-64) ^{C58Abu}	Ac-SC(&)DVQLYIKRQSEHSILAGDPFELEX ₂ PVKYC(&)A-NH ₂
40.	BTLA(33-64) ^{L38C-V60C;C34,58,63Abu}	Ac-SX ₂ DVQC(&)YIKRQSEHSILAGDPFELEX ₂ PC(&)KYX ₂ A-NH ₂
41.	BTLA(33-64) ^{O37C-K61C;C34,58,63Abu}	Ac-SX ₂ DVC(&)LYIKRQSEHSILAGDPFELEX ₂ PVC(&)YX ₂ A-NH ₂
42.	BTLA(122-128)	Ac-NLIESHS-NH ₂
43.	BTLA(118-128)	Ac-NFQSNLIESHS-NH ₂
44.	BTLA(111-131)	Ac-GSYRX ₂ SANFQSNLIESHSTTL-NH ₂
PEPTYDY ZAPROJEKTOWANE NA PODSTAWIE SEKWENCJI AMINOKWASOWEJ GLIKOPROTEINY D, KTÓRYCH CELEM MOLEKULARNYM JEST BIAŁKO HVEM		
45.	gD(7-15)	Ac-ASLKMADPN-NH ₂
46.	gD(26-32)	Ac-DQLTDPN-NH ₂
47.	gD(1-36)	Ac-KYALVDASLKMADPNRFRGKDLPLVDQLTDPGVRN-NH ₂
48.	gD(1-38)(L4C-R36C)	Ac-KYAC(&)VDASLKMADPNRFRGKDLPLVDQLTDPGVRN(&)VY-NH ₂
49.	gD(1-38)(L4C-V37C)	Ac-KYAC(&)VDASLKMADPNRFRGKDLPLVDQLTDPGVRN(&)Y-NH ₂
50.	gD(1-36)(K10C-L28C)	Ac-KYALVDASLC(&)MADPNRFRGKDLPLVDQC(&)TDPGVRN-NH ₂
51.	gD(1-36)(K10C-T29C)	Ac-KYALVDASLC(&)MADPNRFRGKDLPLVDQLC(&)DPPGVRN-NH ₂
52.	gD(1-36)(K10C-T29C) ^{M11Nlc}	Ac-KYALVDASLC(&)X ₁ ADPNRFRGKDLPLVDQLC(&)DPPGVRN-NH ₂
53.	gD(7-32)(K10C-T29C)	Ac-ASLC(&)MADPNRFRGKDLPLVDQLC(&)DPP-NH ₂
54.	gD(7-32)(K10C-T29C) ^{M11Nlc}	Ac-ASLC(&)X ₁ ADPNRFRGKDLPLVDQLC(&)DPP-NH ₂
55.	gD(9-36)(K10C-T29C)	Ac-LC(&)MADPNRFRGKDLPLVDQLC(&)DPPGVRN-NH ₂
56.	gD(1-36)(K10C-D30C)	Ac-KYALVDASLC(&)MADPNRFRGKDLPLVDQLTC(&)PPGVRN-NH ₂
57.	gD(1-36)(M11C-Q27C)	Ac-KYALVDASLKC(&)ADPNRFRGKDLPLVDC(&)LTDPPGVRN-NH ₂
58.	gD(1-36)(A12C-L25C)	Ac-KYALVDASLKM(&)ADPNRFRGKDLPLVC(&)DQLTDPGVRN-NH ₂
59.	gD(1-40)(A3C-Y38C)	Ac-KYC(&)LVDASLKMADPNRFRGKDLPLVDQLTDPGVRNVC(&)HI-NH ₂
PEPTYDY ZAPROJEKTOWANE NA PODSTAWIE SEKWENCJI AMINOKWASOWEJ BIAŁKA PD-1, KTÓRYCH CELEM MOLEKULARNYM JEST BIAŁKO PD-L1		
60.	PD-1(68-78)	Ac-YRX ₁ SPSNQTDK-NH ₂
61.	PD-1(62-80)	Ac-SFVLNWXRX ₁ SPSNQTDKLA-NH ₂
62.	PD-1(62-80) ^{W67C-L79C}	Ac-SFVLNC(&)YRX ₁ SPSNQTDKC(&)A-NH ₂

63.	PD-1(62-80) ^{R69C-D77C}	Ac-SFVLNWYC(&)X ₁ SPSNQTC(&)KLA-NH ₂
64.	PD-1(119-142)	Ac-GTYLX ₂ GAISLAPKAQIKESLRAEL-NH ₂
65.	PD-1(119-142) ^{F120C-E141C}	Ac-GC(&)YLX ₂ GAISLAPKAQIKESLRAC(&)L-NH ₂
66.	PD-1(119-142) ^{C123-S137C}	Ac-GTYLXC(&)GAISLAPKAQIKEC(&)LRAEL-NH ₂
67.	PD-1(119-142) ^{A125C-K135C}	Ac-GTYLX ₂ GC(&)ISLAPKAQIC(&)ESLRAEL-NH ₂
68.	PD-1(122-138)	Ac-LX ₂ GAISLAPKAQIKESLN-NH ₂
69.	PD-1(122-138) ^{C123-S137C}	Ac-LC(&)GAISLAPKAQIKEC(&)L-NH ₂
70.	PD-1(122-138) ^{A125C-K135C}	Ac-LX ₂ GC(&)ISLAPKAQIC(&)ESL-NH ₂
71.	PD-1(124-136) ^{A125C-K135C}	Ac-GC(&)ISLAPKAQIC(&)E-NH ₂
72.	PD-1(132-136)	Ac-AQIKE-NH ₂
PEPTYDY ZAPROJEKTOWANE NA PODSTAWIE SEKWENCJI AMINOKWASOWEJ BIAŁKA PD-L1, KTÓRYCH CELEM MOLEKULARNYM JEST BIAŁKO PD-1		
73.	PD-L1(19-26)	Ac-FTVTVPKD-NH ₂
74.	PD-L1(52-68)	Ac-ALIVYWEX ₁ EDKNIIQFV-NH ₂
75.	PD-L1(52-73)	Ac-ALIVYWEX ₁ EDKNIIQFVHGEEED-NH ₂
76.	PD-L1(52-79)	Ac-ALIVYWEX ₁ EDKNIIQFVHGEEEDLKVQHS-NH ₂
77.	PD-L1(45-68)	Ac-EKQLDLAALIVYWEX ₁ EDKNIIQFV-NH ₂
78.	PD-L1(56-66)	Ac-YWEX ₁ EDKNIIQ-NH ₂
79.	PD-L1(111-127)	Ac-VYRX ₂ X ₁ ISYGGADYKRIT-NH ₂
80.	PD-L1(113-126)	Ac-RX ₂ X ₁ ISYGGADYKRI-NH ₂
81.	PD-L1(113-126) ^(C114-K124C)	Ac-RC(&)X ₁ ISYGGADYCY(&)RI-NH ₂
82.	PD-L1(110-128) ^(V111C-T127C)	Ac-GC(&)YRX ₂ X ₁ ISYGGADYKRIC(&)V-NH ₂
83.	PD-L1(111-127) ^(Y112C-I126C)	Ac-VC(&)RX ₂ X ₁ ISYGGADYKRC(&)T-NH ₂
84.	PD-L1(113-126) ^{(C114-K124C)G120S}	Ac-RC(&)X ₁ ISYGSADYCY(&)RI-NH ₂
85.	PD-L1(113-126) ^{(C114-K124C)G120F}	Ac-RC(&)X ₁ ISYGFADYCY(&)RI-NH ₂
86.	PD-L1(113-126) ^{(C114-K124C)G120E}	Ac-RC(&)X ₁ ISYGEADYCY(&)RI-NH ₂
87.	PD-L1(121-125)	Ac-ADYKR-NH ₂

F) OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO – BADAWCZYCH

Okres 2002–2012 (przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora)

W latach 2002–2007 studiowałam na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego na kierunku Chemia. Pracę magisterską pt. „*Badania wpływu mostków solnych na stabilność fragmentu heliakalnego ludzkiej cystatyny C*”, wykonywałam w Katedrze Chemii Organicznej (obecnie Katedra Chemii Biomedycznej), pod kierunkiem dr hab. Anety Szymańskiej, a w roku 2007 uzyskałam tytuł zawodowy magistra.

W październiku 2007 rozpoczęłam studia doktoranckie w Katedrze Chemii Organicznej (obecnie Katedra Chemii Biomedycznej) Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Pracę doktorską pt. „*Charakterystyka kompleksu ludzkiej cystatyny C (hCC) z surowiczym białkiem amyloidu A (SAA)*” wykonywałam pod kierunkiem prof. dr hab. Zbigniewa Grzonki oraz pod opieką dr hab. Pauliny Czaplewskiej.

Badania prowadzone w mojej rozprawie doktorskiej koncentrowały się na dwóch białkach: surowiczym białku amyloidu A (ang. *serum amyloid A*, SAA) oraz ludzkiej cystatynie C (ang. *human cystatin C*, hCC). Surowicze białko amyloidu A należy do białek ostrej fazy i jest ono mediatorem stanu zapalnego, który indukuje i podtrzymuje produkcję cytokin prozapalnych. SAA jest również białkiem amyloidogennym, a jego wysokie stężenie,

utrzymujące się między innymi u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów (ang. *rheumatoid arthritis*, RZS), może prowadzić do rozwoju amyloidozy wtórnej (ang. *secondary amyloidosis*, AA) [99]. Ludzka cystatyna C występuje we wszystkich płynach ustrojowych człowieka, gdzie pełni rolę inhibitora proteaz cysteinowych [100]. Podobnie jak SAA należy ona do białek amyloidogennych, a jej agregacja, spowodowana punktową mutacją L68Q jest przyczyną występowania dziedzicznej amyloidowej angiopatii mózgowej (ang. *hereditary cystatin C amyloid angiopathy*, HCCAA). Bokarewa i współpracownicy zaobserwowali korelację pomiędzy stężeniem SAA i hCC u chorych na RZS. U osób, u których nie dochodzi do rozwoju amyloidozy wtórnej, następuje obniżenie stężenia cystatyny C krążącej w organizmie. Sugeruje to możliwość tworzenia kompleksu przez oba białka, co zostało potwierdzone przy wykorzystaniu testu immunoenzymatycznego [101]. Struktura krystaliczna kompleksu SAA/hCC nie była i do tej pory nie jest znana, dlatego też w swoich badaniach zajmowałam się wyznaczeniem miejsc wiążących w obu białkach. Do tego celu wykorzystałam chromatografię powinowactwa połączoną z trawieniem enzymatycznym oraz analizą otrzymanych frakcji przy wykorzystaniu spektrometrii mas. Wykazałam, że w oddziaływanie zaangażowane są C-końcowe fragmenty białek: hCC(96-102) oraz SAA(86-104). W celu wyznaczenia reszt aminokwasowych, które są ważne dla oddziaływania SAA i hCC otrzymałam analogi tych peptydów, w których kolejno każdą z reszt aminokwasowych podstawiałam resztą alaniny (skan alaninowy). Następnie przy wykorzystaniu chromatografii powinowactwa oraz testów ELISA wyznaczyłam kluczowe dla oddziaływania reszty aminokwasowe w obu białkach. Potwierdziłam również tworzenie kompleksu pomiędzy fragmentami SAA(86-104) i hCC(93-120) w roztworze, przy wykorzystaniu spektrometrii mas. W ostatnim etapie prowadzonych badań sprawdziłam wpływ SAA oraz jego fragmentu wiążącego na proces agregacji cystatyny C. Uzyskane wyniki pokazały, że SAA podobnie jak jego fragment – SAA(86-104), nie hamują dimeryzacji/oligomeryzacji ludzkiej cystatyny C. Wpływu hCC na właściwości agregacyjne SAA nie udało mi się natomiast jednoznacznie określić.

Badania prowadzone w mojej rozprawie doktorskiej były częścią projektu finansowanego przez MNiSW pt. „*Poszukiwanie miejsca oddziaływania ludzkiej cystatyny C z biologicznie aktywnymi ligandami*”, którego kierownikiem była dr hab. Paulina Czaplewska. W czasie trwania studiów doktoranckich urodziłam dziecko, a ponieważ byłam jednym z głównych wykonawców we wspomnianym wyżej projekcie, uzyskałam grant z Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej – POMOST C/18. Pozwolił mi on na zatrudnienie osoby, która podczas mojego urlopu macierzyńskiego, kontynuowała prowadzone przez mnie badania.

W trakcie studiów doktoranckich odbyłam trzymiesięczny staż naukowy w grupie prof. Michaela Przybylskiego (University of Konstanz, Department of Chemistry, Laboratory of Analytical Chemistry and Biopolymer Structure Analysis). Współpracowałam również z prof. Piotrem Stefanowiczem (Uniwersytet Wrocławski, Wydział Chemii). Pracę doktorską obroniłam w lutym 2012 roku, uzyskując stopień naukowy doktora nauk chemicznych w dziedzinie chemii.

W latach 2007–2012 byłam współautorem 1 publikacji znajdującej się w bazie JCR, 3 prac opublikowanych w recenzowanych materiałach pokonferencyjnych o zasięgu międzynarodowym oraz 9 wystąpień na konferencjach krajowych i zagranicznych.

W trakcie studiów doktoranckich prowadziłam ćwiczenia laboratoryjne z Chemii Organicznej dla studentów Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego.

Okres 2012 – 2024 (po uzyskaniu stopnia naukowego doktora)

W lutym 2012 roku zostałam zatrudniona na stanowisku starszego referenta technicznego w Katedrze Chemii Medycznej (obecnie Katedrze Chemii Biomedycznej) Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Następnie w marcu 2013 rozpoczęłam pracę w polsko-szwajcarskim projekcie pt. *„Projektowanie inhibitorów białka BTLA jako nowych leków przeciwko czerniakowi”*. W tym samym czasie pracowałam również w projekcie finansowanym przez NCN pt. *„Charakterystyka molekularna kompleksu ludzkiej cystatyny C z naturalnymi autoprzeciwciałami”*. W obu tych grantach byłam zatrudniona na umowę o pracę (na ½ etatu w każdym), dlatego też w latach 2013–2016 moja działalność skupiała się głównie na zadaniach naukowych. W październiku 2016 zostałam zatrudniona na stanowisku adiunkta w Katedrze Chemii Biomedycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego.

W marcu 2018 roku uzyskałam grant SONATA 13 pt. *„Inhibitory tworzenia kompleksu BTLA-HVEM jako potencjalne cele w immunoterapii nowotworów”* (projekt zakończony i rozliczony), natomiast w lipcu 2022 roku, w konsorcjum z Gdańskim Uniwersytetem Medycznym (lider), uzyskaliśmy grant OPUS 22 pt. *„Nowe immunomodulatory kompleksu BTLA-HVEM jako potencjalna terapia w toczeniu rumieniowatym układowym”* (projekt w trakcie realizacji). Oba te projekty sfinansowane zostały przez NCN i związane są one z tematyką naukową przedstawioną w osiągnięciu habilitacyjnym.

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora współpracowałam z grupą prof. Henryka Kozłowskiego (Uniwersytet Wrocławski, Wydział Chemii) oraz z grupą prof. Elżbiety Jagusztyn-Krynickiej (Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii). Jestem współautorem

pięciu publikacji, których tematyka rozwijana była w tych grupach badawczych (prace: C1– C5 znajdujące się w Załączniku 3: „Wykaz osiągnięć naukowych albo artystycznych, stanowiących znaczny wkład w rozwój określonej dyscypliny”). Byłam również wykonawcą w dwóch grantach finansowanych przez NCN, których kierownikiem była prof. Elżbieta Jagusztyn-Krynicka.

Moje zainteresowania, po uzyskaniu stopnia naukowego doktora, oprócz punktów kontrolnych układu immunologicznego skupiały się również na białkach amyloidogennych takich jak opisane wcześniej hCC i SAA oraz amyloid β ($A\beta$). Stanowiło to kontynuację tematyki rozpoczętej przez mnie podczas studiów doktoranckich. Badania, w których uczestniczyłam oraz ich wyniki zostały opisane poniżej.

Do moich głównych osiągnięć naukowych (niezwiązanych z cyklem publikacji stanowiących osiągnięcie habilitacyjne) należą badania dotyczące agregacji białek amyloidogennych. Ich celem było poszukiwanie inhibitorów agregacji tych białek, jak również wyjaśnienie mechanizmów związanych z tym procesem. Wyniki badań, w których uczestniczyłam, opisane zostały w 9 pracach (B1–B9), jestem również współautorem jednej pracy przeglądowej, związanej z tą tematyką (B10). Tytuły prac, jak również mój wkład w ich powstanie przedstawiony został w Załączniku 3: „Wykaz osiągnięć naukowych albo artystycznych, stanowiących znaczny wkład w rozwój określonej dyscypliny”. Praca B1 dotyczy tematyki białek amyloidogennych, ale ukazała się ona w trakcie odbywania przez mnie studiów doktoranckich. Publikacje oznaczone jako B2–B4 dotyczą wyników uzyskanych w ramach mojej rozprawy doktorskiej (ich wyniki opisane zostały w punkcie wyżej), ukazały się one jednak po uzyskaniu przez mnie stopnia naukowego doktora, natomiast pozostałe prace B5–B9 opisują badania, które nie są związane z moją rozprawą doktorską.

Amyloidozy są to choroby, które charakteryzują się odkładaniem nierozpuszczalnych włókien białkowych w różnych tkankach i narządach, doprowadzając do ich niewydolności. Tworzą się one najczęściej w wyniku nieprawidłowego fałdowania się białek, choć mechanizmów tworzenia włókien amyloidowych opisano więcej [102,103]. W ciągu ostatnich kilku lat prowadzone są liczne badania, mające na celu poszukiwanie inhibitorów tego procesu oraz wyjaśnienia mechanizmów agregacji białek. Wcześniejsze doniesienia literaturowe pokazały, że hCC oddziałuje nie tylko ze białkiem SAA (co zostało opisane powyżej), ale również z amyloidem β . Agregacja amyloidu β jest główną przyczyną choroby Alzheimera, w której dochodzi do powolnego niszczenia kory mózgowej, a tym samym do zaburzeń funkcjonowania mózgu. W oddziaływanie to zaangażowany jest C-końcowy fragment ludzkiej cystatyny, a dokładniej hCC(101-117), który posiada również zdolność do hamowania

agregacji A β [104]. W ramach prowadzonych przez mnie badań otrzymałam szereg analogów fragmentu hCC(101-117) oraz określiłam, które reszty aminokwasowe w tym fragmencie są ważne dla oddziaływania z A β . Wyniki te opisane zostały w pracy B7 i mogą one zostać wykorzystane do projektowania inhibitorów agregacji A β .

Moje badania skupiały się również na badaniu oddziaływania ludzkiej cystatyny C z przeciwciałami. Zajmowałam się między innymi wyznaczeniem miejsca wiązania hCC z przeciwciałami monoklonalnymi, określanymi jako Cyst28 oraz Cyst10. Na podstawie uzyskanych wyników wyjaśniliśmy, dlaczego przeciwciało Cyst28 posiada zdolność do hamowania agregacji hCC, natomiast przeciwciało Cyst10, takich właściwości nie wykazuje (wyniki opisane zostały w pracy B5). Uczestniczyłam również w badaniach, mających na celu wyznaczenie epitopu dla przeciwciała określanego jako HCC3, które również posiada zdolność do hamowania agregacji cystatyny C (wyniki opisane zostały w pracy B9). Brałam również udział w pracach, których celem była izolacja z frakcji IgG ludzkiej surowicy naturalnych przeciwciał anti-HCC (wyniki opisane zostały w pracy B6). Wykorzystaliśmy również peptyd hCC(60-70), będący fragmentem cystatyny C do immunizacji królików, w wyniku czego, udało nam się uzyskać specyficzne przeciwciała anti-hCC (wyniki opisane zostały w pracy B8).

Badania, skupiające się na ludzkiej cytynie C i jej oddziaływaniu z ligandami stanowiły osiągnięcie habilitacyjne dr hab. Pauliny Czaplewskiej (Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego) pt. „*Mapowanie oddziaływań ludzkiej cystatyny C z biologicznie aktywnymi ligandami*”, w których dzięki naszej wieloletniej współpracy mogłam uczestniczyć. Otrzymałam również dwa granty na badania dla młodych naukowców finansowane przez UG (wymienione w punkcie IV D – 12 i 13), których tematyka związana była z białkami amyloidogennymi.

G) DANE NAUKOMETRYCZNE WSZYSTKICH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

Tabela 3: Wykaz najważniejszych osiągnięć naukowo-badawczych.

	Przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora	Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora	Łącznie	Osiągnięcie naukowe
Publikacje naukowe z bazy JCR	1	30	31	12
IF publikacji *	4,1	131,4	135,5	64,2
Liczba punktów MNiSW	30	2595	2625	1340
Liczba cytowań	Web of Science – 251; Scopus – 277; Google Scholar – 348			WoS – 103 Scopus – 109 GS – 133
Liczba cytowań (bez autocytowań)	Web of Science – 195; Scopus – 158; Google Scholar – 275			WoS – 63 Scopus – 59 GS – 87
Index Hirscha	Web of Science – 9; Scopus – 10; Google Scholar – 12			
Oryginalne prace opublikowane w sprawozdaniach pokonferencyjnych lub innych (bez IF)	3	2	5	
Kierownik projektów zewnętrznych	0	1	1	
Udział w projektach zewnętrznych realizowanych w konsorcjum – kierownik ze strony UG	0	1	1	
Wykonawca w projektach zewnętrznych	1	6	7	
Kierownik projektów wewnętrznych finansowanych ze środków UG	0	5	5	

*Współczynniki wpływu podane zostały z roku ukazania się publikacji, na podstawie bazy Web of Science. W przypadku, gdy IF z danego roku nie jest dostępny, podany został ten, który obowiązywał w roku poprzednim.

H) DALSZY PLAN NAUKOWO – BADAWCZY

Moje najbliższe plany naukowo-badawcze skupiać się będą głównie na punktach kontrolnych układu immunologicznego:

- ✓ obecnie zajmuję się optymalizacją struktury peptydów, których celem molekularnym są białka PD-1 oraz PD-L1. Do sekwencji tych peptydów wprowadzam modyfikacje takie jak D-aminokwasy lub tzw. „zamki tryptofanowe”, które powinny sprzyjać przyjmowaniu przez peptydy struktury β -spinki;
- ✓ prowadzę dalsze badania, mające na celu znalezienie inhibitorów wiązania się białek BTLA i HVEM. Zaprojektowałam peptydy bazujące na sekwencji białek CD160 (których celem molekularnym jest białko HVEM) oraz UL144 (których celem molekularnym jest białko BTLA). Badania te prowadzę w ramach grantu OPUS 22, realizowanego w konsorcjum z Gdańskim Uniwersytetem Medycznym. Będą one również przedmiotem rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Lipińskiej, której jestem promotorem pomocniczym. Związki takie mogą działać jako agoniści lub antagoniści wyżej wspomnianych białek, dlatego też zamierzam sprawdzić ich potencjał zarówno w chorobach nowotworowych jak i autoimmunologicznych;
- ✓ zamierzam wykorzystać technologię „phage display” do poszukiwania peptydów, wiążących się z białkami BTLA lub HVEM, a następnie sprawdzić ich potencjał hamujący względem kompleksu tych białek;
- ✓ prowadzę badania, mając na celu znalezienie inhibitorów wiązania się białek HVEM/LIGHT. Związki takie mogą mieć potencjał terapeutyczny w przypadku leczenia chorób autoimmunologicznych oraz odrzucania przeszczepów. Jestem promotorem pomocniczym rozprawy doktorskiej mgr inż. Piotra Ciury, w której zajmujemy się projektowaniem, syntezą oraz badaniem związków, bazujących na sekwencji aminokwasowej białek HVEM oraz LIGHT. Zaprojektowałam i otrzymałam również związki, których celem molekularnym jest białko LIGHT, bazujące na sekwencji aminokwasowej receptora wabikowego 3 (ang. *decoy receptor 3*, DcR3). Obecnie zamierzam zbadać ich potencjał jako inhibitorów wiązania się białek HVEM/LIGHT;
- ✓ w wielu typach nowotworów potwierdzona została obecność rozpuszczalnych form białek (sBTLA, sHVEM, sPD-1 oraz sPD-L1). W moich planach badawczych jest wykorzystanie peptydów (wykazujących najsilniejsze powinowactwo do wyżej wymienionych białek) w testach diagnostycznych;

- ✓ jestem obecnie wykonawcą w projekcie „*Blokowanie oddziaływań TNF-TNFR2 jako nowa metoda leczenia raka jajnika*”, w którym poszukujemy inhibitorów wiązania się receptora 2 czynnika martwicy nowotworu (ang. *tumor necrosis factor receptor 2*, TNFR2) i jego ligandu – czynnika martwicy nowotworu (ang. *tumor necrosis factor*, TNF). W projekcie tym zajmuję się koordynowaniem prac eksperymentalnych prowadzonych przez doktorantki mgr Karolinę Sławińską oraz mgr Paulinę Stencel;
- ✓ zamierzam wykorzystać system PROTAC (ang. *PROteolysis TARgeting Chimeras*) do znakowania białek takich jak HVEM, BTLA, PD-1 czy PD-L1 na komórkach nowotworowych lub limfocytach T, w celu zaprojektowania leków ukierunkowanych na degradację tych białek;
- ✓ rozpoczęłam prace nad poszukiwaniem inhibitorów wiązania się białka regulatorowego sygnału α (ang. *signal regulatory protein α* , SIRP α) oraz białka różnicowania komórkowego CD47 (ang. *cluster differentiation 47*, CD47). Oddziaływanie białek SIRP α /CD47 hamuje proces fagocytozy komórek nowotworowych, zależnej od makrofagów. Badanie te zamierzam realizować we współpracy z dr Laurent Derré (Department of Urology, Urology Research Unit and Urology Biobank, University Hospital of Lausanne, Switzerland) oraz dr Mihai Ciubotaru (Department of Immunology, Colentina Clinical Hospital Bucharest, Romania). Wspólnie złożyliśmy grant pt. „*Peptide inhibitors of SIRP α /CD47 interaction*” do Szwajcarskiej Narodowej Fundacji Nauki w konkursie MAPS (ang. *Multilateral Academic Projects*) na wielostronne projekty badawcze realizowane przez naukowców ze Szwajcarii we współpracy z zespołami z Polski, Bułgarii, Chorwacji, Węgier i Rumunii.

V. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej

W roku 2009 odbyłam dwutygodniową wizytę naukową na Uniwersytecie Wrocławskim, podczas której współpracowałam z prof. Piotrem Stefanowiczem (Uniwersytet Wrocławski, Wydział Chemii). W ramach prowadzonych wspólnie badań potwierdziłam oddziaływanie fragmentu ludzkiej cystatyny C – hCC(93-120) z fragmentem surowiczego białka amyloidu A – SAA(86-104) w roztworze, przy wykorzystaniu spektrometrii mas. Otrzymane w ramach tej współpracy wyniki zaprezentowałam na konferencjach krajowych i zagranicznych, których lista znajduje się w załączniku 3: „*Wykaz osiągnięć naukowych lub*

artystycznych, stanowiący znaczny wkład w rozwój określonej dyscypliny” oraz opisane zostały one w pracy:

- ✓ **Spodzieja M**, Szymańska A, Kołodziejczyk A, Prądzińska M, Maszota M, Stefanowicz P, Szewczuk Z, Grubb A, Czaplewska P. *Interaction of serum amyloid A with human cystatin C--identification of binding sites*. J Mol Recognit. 2012; 25(10):513-24. doi: 10.1002/jmr.2220.

W roku 2010 (11 styczeń–9 kwiecień) odbyłam trzymiesięczny staż naukowy u prof. Michaela Przybylskiego (University of Konstanz, Department of Chemistry, Laboratory of Analytical Chemistry and Biopolymer Structure Analysis), podczas którego zajmowałam się wyznaczaniem parametrów kinetycznych oddziaływania białek hCC i SAA oraz oddziaływania tych białek z peptydami. Podczas stażu zajmowałam się również charakterystyką kompleksów tworzonych przez białko hCC i przeciwciała monoklonalne Cyst10 oraz Cyst13. Badania te dotyczyły identyfikacji fragmentów wiążących tych molekuł oraz wyznaczania parametrów kinetycznych oddziaływania. Wyniki badań, które uzyskałam podczas tego stażu opublikowane zostały w recenzowanych materiałach pokonferencyjnych oraz zaprezentowane przeze mnie w postaci posteru i komunikatu ustnego.

- ✓ **Spodzieja M**, Szymańska A, Stefanowicz P, Szewczuk Z, Cozma C, Przybylski M, Grzonka Z, Czaplewska P. *Characterization of human Cystatin C (hCC) – Serum Amyloid A (SAA) complex*, Cystatins, Ciężań, Polska, 2010 – prezentacja ustna;
- ✓ **Spodzieja M**, Szymańska A, Śladewska A, Stefanowicz P, Szewczuk Z, Grzonka Z, Cozma C, Przybylski M, Kołodziejczyk A, Czaplewska P. *Characterization of human cystatin C - serum amyloid A complex*. Peptides 2010, Proceedings of Thirty-First European Peptide Symposium, Kopenhaga, Dania, 2010, strony: 288 – 289;
- ✓ **Spodzieja M**, Szymańska A, Śladewska A, Stefanowicz P, Szewczuk Z, Cozma C, Przybylski M, Grzonka Z, Czaplewska P. *Characterization of human Cystatin C (hCC) - Serum Amyloid A (SAA) complex*, 31-st European Peptide Symposium, Kopenhaga, Dania, 2010 – poster.

W latach 2013-2016 pracowałam na stanowisku typu post doc w polsko-szwajcarskim projekcie badawczym pt. „Projektowanie inhibitorów białka BTLA jako nowych leków przeciwko czerniakowi”. W trakcie jego trwania odbyliśmy spotkania naukowe, których celem było przygotowanie planu badań oraz konsultacje merytoryczne, dotyczące prowadzonych prac badawczych. Praca w tym projekcie, była dla mnie szczególnie cenna, ponieważ stanowiła ona dla mnie nową tematykę, którą obecnie się zajmuję. Wspólnie z grupą szwajcarską opublikowaliśmy trzy prace. W dwóch z nich jestem pierwszym autorem i są one

częścią cyklu stanowiącego opisane przez mnie osiągnięcie habilitacyjne (prace oznaczone jako **H1** i **H2**) oraz jedną, która stanowi uzupełnienie prezentowanego osiągnięcia naukowego.

- ✓ Kuncewicz K, **Spodzieja M**, Sieradzan A, Karczyńska A, Dąbrowska K, Dadlez M, Speiser DE, Derré L, Rodziewicz-Motowidło S. A structural model of the immune checkpoint CD160-HVEM complex derived from HDX-mass spectrometry and molecular modeling. *Oncotarget*. 2019; 10(4):536-550. doi: 10.18632/oncotarget.26570.

Obecnie kontynuuję współpracę z dr Laurentem Derré (Department of Urology, Urology Research Unit and Urology Biobank, University Hospital of Lausanne, Switzerland), w ramach której zamierzamy skupić się na poszukiwaniu inhibitorów wiązania się białek SIRP α i CD47.

W latach 2018–2024 odbyłam liczne wizyty naukowe na Gdańskim Uniwersytecie Medycznym, gdzie współpracowałam z dr hab. Anną Wardowską (Gdański Uniwersytet Medyczny, Wydział Lekarski, Katedra i Zakład Fizjopatologii). Zainteresowania naukowe dr hab. Anny Wardowskiej od wielu lat skupią się w układzie immunologicznym, dlatego też Jej wiedza i doświadczenie pozwoliły na wspólne zaplanowanie badań, dotyczących wpływu otrzymanych przez mnie inhibitorów BTLA/HVEM na funkcję limfocytów T. Dr hab. Anna Wardowska była wykonawcą w kierowanym przez mnie projekcie SONATA 13, a zaplanowane przez nas badania są przedmiotem rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Wojciechowicz (Gdański Uniwersytet Medyczny, Wydział Lekarski, Katedra i Zakład Fizjopatologii, promotor: dr hab. Anna Wardowska) i sfinansowane zostały z projektu, który uzyskałam z Narodowego Centrum Nauki. W ramach tej współpracy wykonałam również na Gdańskim Uniwersytecie Medycznym takie badania jak sprawdzenie cytotoksyczności związków, zbadanie ich wpływu na hemolizę erytrocytów czy sprawdzenie ich stabilność w ludzkim osoczu. Wyniki uzyskane dzięki tej współpracy opisane zostały w sześciu publikacjach oznaczonych jako **H3**, **H4**, **H7**, **H8**, **H11** oraz **H12** i są one częścią przestawionego osiągnięcia habilitacyjnego. Podjęta współpraca zapoczątkowała również nową tematykę badawczą w grupie, w której pracuje dr hab. Anna Wardowska, dotyczącą punktów kontrolnych układu immunologicznego i jest ona przez nas kontynuowana w ramach projektu OPUS 22, który realizujemy w konsorcjum pomiędzy GUMed i UG. Z projektu tego finansowane jest również stypendium doktorskie mgr Magdaleny Lipińskiej (Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii), w której przewodzie doktorskim jestem obecnie promotorem pomocniczym.

W 2019 roku nawiązałam współpracę z prof. Peterem Stainbergerem oraz dr Claire Battin (Medical University of Vienna, Institute of Immunology, Division of Immune Receptors and T cell Activation). W grupie tej opracowane zostały platformy komórkowe, które pozwalają

na badanie właściwości hamujących związków – potencjalnych inhibitorów, takich punktów kontrolnych jak BTLA/HVEM czy PD-1/PD-L1. Wyniki prowadzonych przez nas badań opublikowane zostały w pracach **H3**, **H4**, **H7**, **H6** oraz **H9**, w których jestem autorem korespondencyjnym lub jednym z autorów korespondencyjnych. Współpraca ta umożliwiła odbycie stażu naukowego w laboratorium w Austrii dwóm doktorantom, w których przewodowych doktorskich byłam lub jestem promotorem pomocniczym. Dr Magdalena Bojko, podczas swojego trzymiesięcznego stażu naukowego, zbadała zdolność zaprojektowanych przez mnie peptydów do hamowania tworzenia kompleksu PD-1/PD-L1, natomiast mgr inż. Piotrowi Ciura testował związki, które są inhibitorami wiązania się białek HVEM/LIGHT.

Byłam również wykonawcą w dwóch projektach kierowanych przez prof. Elżbietę Jagusztyn-Krynicką (Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii, Instytut Mikrobiologii) – OPUS 9 i OPUS 15. Moim zadaniem była synteza i charakterystyka związków, wykorzystywanych w badaniach jako substraty lub inhibitory białek, związanych z procesami utleniania i redukcji mostków disulfidowych. Jestem współautorem dwóch publikacji dotyczących opisanej wyżej tematyki.

- ✓ Banaś AM, Bocian-Ostrzycka KM, Dunin-Horkawicz S, Ludwiczak J, Wilk P, Orlikowska M, Wszyńska A, Dąbrowska M, Plichta M, **Spodzieja M**, Polańska MA, Malinowska A, Jagusztyn-Krynicka EK. *Interplay between DsbA1, DsbA2 and C8J_1298 Periplasmic Oxidoreductases of Campylobacter jejuni and Their Impact on Bacterial Physiology and Pathogenesis*. Int J Mol Sci. 2021; 22(24):13451. doi: 10.3390/ijms222413451;
- ✓ Roszczenko-Jasińska P, Giełdoń A, Mazur D, **Spodzieja M**, Plichta M, Czaplewski C, Bal W, Jagusztyn-Krynicka EK, Bartosik D. *Exploring the inhibitory potential of in silico-designed small peptides on Helicobacter pylori Hp0231 (DsbK), a periplasmic oxidoreductase involved in disulfide bond formation*. Front Mol Biosci. 2024; 10:1335704. doi: 10.3389/fmolb.2023.1335704.

VI. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę

A) OSIĄGNIĘCIA DYDAKTYCZNE

W zakresie aktywności dydaktycznej prowadziłam następujące zajęcia dla studentów Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego: Chemia leków (wykład), Chemia leków (ćwiczenia laboratoryjne), Chemiczne metody identyfikacji leków (ćwiczenia laboratoryjne), Spektrochemia (ćwiczenia laboratoryjne), Preparatyka i analiza związków naturalnych (ćwiczenia laboratoryjne) oraz pracownie: dyplomową, specjalizacyjną i magisterską dla studentów Katedry Chemii Biomedycznej, Wydziału Chemii, Uniwersytetu Gdańskiego. Dotychczas wypromowałam 7 dyplomantów i 7 magistrów.

Byłam promotorem pomocniczym dwóch prac doktorskich:

- 1) „*Charakterystyka molekularna kompleksu białek HVEM-CD160, jako potencjalnego celu w immunoterapii*”, dr Katarzyna Kunciewicz, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański (2017), promotor: prof. Sylwia Rodziewicz-Motowidło;
- 2) „*Searching for peptides interacting with the PD-1 and PD-L1 immune checkpoint proteins for cancer immunotherapies*”, dr Magdalena Bojko, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański (2023), promotor: prof. Sylwia Rodziewicz-Motowidło.

Obecnie jestem promotorem pomocniczym dwóch prac doktorskich:

- 1) „*Blokowanie oddziaływań HVEM/LIGHT przy pomocy peptydów - innowacyjne podejście do immunosupresji*”, mgr inż. Piotr Ciura, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański, promotor: dr hab. Adam Sieradzan;
- 2) „*Projektowanie, synteza oraz badania inhibitorów tworzenia kompleksu BTLA/HVEM*”, mgr Magdalena Lipińska, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański, promotor: prof. Sylwia Rodziewicz-Motowidło.

W latach 2014 oraz 2015 roku prowadziłam kursy wyrównawcze dla studentów Wydziału Chemii pt. „*Zastosowanie spektrometrii mas w chemii i ochronie środowiska*”.

B) OSIĄGNIĘCIA ORGANIZACYJNE

Brałam udział w organizacji 24-tego Polskiego Sympozjum Peptydowego, Jastrzębia Góra, Polska, 3–7 września 2017.

Uczestniczyłam w organizacji konferencji „CYSTATINS 2022, Gdańsk, Polska, 16–18 czerwiec 2022.

Byłam członkiem Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego (2016–2020) oraz członkiem komisji ds. nagród i wyróżnień, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański (2016–2020).

C) OSIĄGNIĘCIA POPULARYZUJĄCE NAUKĘ

Brałam udział w organizacji pokazów i przygotowaniu stoiska na Pikniku Naukowym – Warszawa, 7 maja 2016.

Uczestniczyłam w organizacji Dnia Otwartego Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego – Gdańsk, 16 marca 2023

Uczestniczyłam w przygotowaniu i przeprowadzeniu warsztatów pt. „Związki zapachowe”, które odbyły się podczas Dnia Otwartego Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego w latach: 2017, 2019 oraz 2023.

LITERATURA CYTOWANA

- [1] Paul William E., *Fundamental immunology*, 7th ed., Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2013.
- [2] D.W. Talmage, C. Health, A two-step , two-signal model for the primary activation of precursor helper T cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96 (1999) 185–190. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.1.185>.
- [3] A.D. Waldman, J.M. Fritz, M.J. Lenardo, A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice, *Nat. Rev. Immunol.* 20 (2020) 651–668. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0306-5>.
- [4] X. Zang, J.P. Allison, The B7 family and cancer therapy: Costimulation and coinhibition, *Clin. Cancer Res.* 13 (2007) 5271–5279. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1030>.
- [5] M.L. Alegre, K.A. Frauwirth, C.B. Thompson, T-cell regulation by CD28 and CTLA-4, *Nat. Rev. Immunol.* 1 (2001) 220–228. <https://doi.org/10.1038/35105024>.
- [6] J.R. Sedy, M. Gavrieli, K.G. Potter, M.A. Hurchla, R.C. Lindsley, K. Hildner, S. Scheu, K. Pfeffer, C.F. Ware, T.L. Murphy, K.M. Murphy, B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator, *Nat. Immunol.* 6 (2005) 90–98. <https://doi.org/10.1038/ni1144>.
- [7] G.J. Freeman, A.J. Long, Y. Iwai, K. Bourque, T. Chernova, H. Nishimura, L.J. Fitz, N. Malenkovich, T. Okazaki, M.C. Byrne, H.F. Horton, L. Fouser, L. Carter, V. Ling, M.R. Bowman, B.M. Carreno, M. Collins, C.R. Wood, T. Honjo, Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation, *J. Exp. Med.* 192 (2000) 1027–1034. <https://doi.org/10.1084/jem.192.7.1027>.

- [8] P.A. Bretscher, The history of the two-signal model of lymphocyte activation: A personal perspective, *Scand. J. Immunol.* 89 (2019) 1–13. <https://doi.org/10.1111/sji.12762>.
- [9] G. Häcker, A. Bauer, A. Villunger, Apoptosis in activated T cells: What are the triggers, and what the signal transducers?, *Cell Cycle.* 5 (2006) 2421–2424. <https://doi.org/10.4161/cc.5.21.3397>.
- [10] Y. Zhan, E.M. Carrington, Y. Zhang, S. Heinzl, A.M. Lew, Life and death of activated T cells: How are they different from naïve T Cells?, *Front. Immunol.* 8 (2017) 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01809>.
- [11] G. Benichou, B. Gonzalez, J. Marino, K. Ayasoufi, A. Valujskikh, Role of memory T cells in allograft rejection and tolerance, *Front. Immunol.* 8 (2017). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00170>.
- [12] X. Wang, F. Teng, L. Kong, J. Yu, PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes, *Onco. Targets. Ther.* 9 (2016) 5023–5039. <https://doi.org/10.2147/OTT.S105862>.
- [13] C. Demerlé, L. Gorvel, D. Olive, BTLA-HVEM Couple in Health and Diseases: Insights for Immunotherapy in Lung Cancer, *Front. Oncol.* 11 (2021) 1–7. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.682007>.
- [14] C. Pasero, D. Olive, Interfering with coinhibitory molecules: BTLA/HVEM as new targets to enhance anti-tumor immunity, *Immunol. Lett.* 151 (2013) 71–75. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2013.01.008>.
- [15] G. Cameron, Fiona; Whiteside, C. Perry, Ipilimumab: First global approval, *Drugs.* 71 (2011) 1355–1365. <https://doi.org/10.2165/11595310-000000000-00000>.
- [16] A. Parvez, F. Choudhary, P. Mudgal, R. Khan, K.A. Qureshi, A. Aspatwar, H. Farooqi, PD-1 and PD-L1: Architects of Immune Symphony and Immunotherapy Breakthroughs in Cancer Treatment, *Front. Immunol.* 14 (2023) 1296341. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1296341>.
- [17] F. Martins, L. Sofiya, G.P. Sykiotis, F. Lamine, M. Maillard, M. Fraga, K. Shabafrouz, C. Ribbi, A. Cairoli, Y. Guex-Crosier, T. Kuntzer, O. Michielin, S. Peters, G. Coukos, F. Spertini, J.A. Thompson, M. Obeid, Adverse effects of immune-checkpoint inhibitors: epidemiology, management and surveillance, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 16 (2019) 563–580. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0218-0>.
- [18] H.R. Kourie, J. Klastersky, Immune checkpoint inhibitors side effects and management, *Immunotherapy.* 8 (2016) 799–807. <https://doi.org/10.2217/imt-2016-0029>.
- [19] N. Watanabe, M. Gavrieli, J.R. Sedy, J. Yang, F. Fallarino, S.K. Loftin, M.A. Hurchla, N. Zimmerman, J. Sim, X. Zang, T.L. Murphy, J.H. Russell, J.P. Allison, K.M. Murphy, BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1, *Nat. Immunol.* 4 (2003) 670–679. <https://doi.org/10.1038/ni944>.
- [20] D.M. Compaan, L.C. Gonzalez, I. Tom, K.M. Loyet, D. Eaton, S.G. Hymowitz, Attenuating lymphocyte activity: The crystal structure of the BTLA-HVEM complex, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 39553–39561. <https://doi.org/10.1074/jbc.M507629200>.
- [21] M. Gavrieli, K.M. Murphy, Association of Grb-2 and PI3K p85 with phosphotyrosine peptides derived from BTLA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345 (2006) 1440–1445. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.05.036>.
- [22] A. Bitra, I. Nemčovičová, G. Picarda, T. Doukov, J. Wang, C.A. Benedict, D.M. Zajonc, Structure of human cytomegalovirus UL144, an HVEM orthologue, bound to the B and T cell lymphocyte attenuator, *J. Biol. Chem.* 294 (2019) 10519–10529. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.009199>.
- [23] J. Šedý, M.O. Balmert, B.C. Ware, W. Smith, I. Nemčovičová, P.S. Norris, B.R. Miller, D. Aivazian, C.F. Ware, A herpesvirus entry mediator mutein with selective agonist action for the inhibitory receptor B and T lymphocyte attenuator, *J. Biol. Chem.* 292

- (2017) 21060–21070. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.813295>.
- [24] M.A. Hurchla, J.R. Sedy, M. Gavrielli, C.G. Drake, T.L. Murphy, K.M. Murphy, B and T lymphocyte attenuator exhibits structural and expression polymorphisms and is highly induced in anergic CD4⁺ T cells, *J. Immunol.* 174 (2005) 3377–3385. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.174.6.3377>.
- [25] J. Liu, J. Li, M. He, G.L. Zhang, Q. Zhao, Distinct changes of BTLA and HVEM expressions in circulating CD4⁺ and CD8⁺ T cells in hepatocellular carcinoma patients, *J. Immunol. Res.* 2018 (2018). <https://doi.org/10.1155/2018/4561571>.
- [26] Y. Yi, X.C. Ni, G. Liu, Y.R. Yin, J.L. Huang, W. Gan, P.Y. Zhou, R.Y. Guan, C. Zhou, B.Y. Sun, S.J. Qiu, Clinical significance of herpes virus entry mediator expression in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma, *Oncol. Lett.* 20 (2020) 1–9. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.11880>.
- [27] L. Derré, J.P. Rivals, C. Jandus, S. Pastor, D. Rimoldi, P. Romero, O. Michielin, D. Olive, D.E. Speiser, BTLA mediates inhibition of human tumor-specific CD8⁺ T cells that can be partially reversed by vaccination, *J. Clin. Invest.* 120 (2010) 157–167. <https://doi.org/10.1172/JCI40070>.
- [28] N. Malissen, N. Macagno, S. Granjeaud, C. Granier, V. Moutardier, C. Gaudy-Marqueste, N. Habel, M. Mandavit, B. Guillot, C. Pasero, E. Tartour, R. Ballotti, J.J. Grob, D. Olive, HVEM has a broader expression than PD-L1 and constitutes a negative prognostic marker and potential treatment target for melanoma, *Oncoimmunology.* 8 (2019) 1–14. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1665976>.
- [29] X. Lan, S. Li, H. Gao, A. Nanding, L. Quan, C. Yang, S. Ding, Y. Xue, Increased BTLA and HVEM in gastric cancer are associated with progression and poor prognosis, *Oncotargets. Ther.* 10 (2017) 919–926. <https://doi.org/10.2147/OTT.S128825>.
- [30] X.Y. Feng, X.Z. Wen, X.J. Tan, J.H. Hou, Y. Ding, K.F. Wang, J. Dong, Z.W. Zhou, Y.B. Chen, X.S. Zhang, Ectopic expression of B and T lymphocyte attenuator in gastric cancer: A potential independent prognostic factor in patients with gastric cancer, *Mol. Med. Rep.* 11 (2015) 658–664. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2699>.
- [31] X. Li, Z. Xu, G. Cui, L. Yu, X. Zhang, BTLA expression in stage I–III non–small-cell lung cancer and its correlation with PD-1/PD-L1 and clinical outcomes, *Oncotargets. Ther.* 13 (2020) 215–224. <https://doi.org/10.2147/OTT.S232234>.
- [32] R.I. Montgomery, M.S. Warner, B.J. Lum, P.G. Spear, Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family., *Cell.* 87 (1996) 427–36.
- [33] B.S. Kwon, K.B. Tan, J. Ni, Kwi-Ok-Oh, Z.H. Lee, K.K. Kim, Y.J. Kim, S. Wang, R. Gentz, G.L. Yu, J. Harrop, S.D. Lyn, C. Silverman, T.G. Porter, A. Truneh, P.R. Young, A newly identified member of the tumor necrosis factor receptor superfamily with a wide tissue distribution and involvement in lymphocyte activation, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 14272–14276. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.22.14272>.
- [34] H. Hsu, I. Solovyev, A. Colombero, R. Elliott, M. Kelley, W.J. Boyle, Communication ATAR, a Novel Tumor Family Member, Signals through TRAF2 and TRAF5 *, *J. Biol. Chem.* (1997) 13471–13475.
- [35] T. Inoue, M. Sho, S. Yasuda, S. Nishiwada, S. Nakamura, T. Ueda, N. Nishigori, K. Kawasaki, S. Obara, T. Nakamoto, F. Koyama, H. Fujii, Y. Nakajima, HVEM expression contributes to tumor progression and prognosis in human colorectal cancer, *Anticancer Res.* 35 (2015) 1361–1368.
- [36] K. Migita, M. Sho, K. Shimada, S. Yasuda, I. Yamato, T. Takayama, S. Matsumoto, K. Wakatsuki, K. Hotta, T. Tanaka, M. Ito, N. Konishi, Y. Nakajima, Significant involvement of herpesvirus entry mediator in human esophageal squamous cell carcinoma, *Cancer.* 120 (2014) 808–817. <https://doi.org/10.1002/cncr.28491>.

- [37] D. Hokuto, M. Sho, I. Yamato, S. Yasuda, S. Obara, T. Nomi, Y. Nakajima, Clinical impact of herpesvirus entry mediator expression in human hepatocellular carcinoma, *Eur. J. Cancer*. 51 (2015) 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2014.11.004>.
- [38] J.Y.S. Tsang, K.W. Chan, Y.B. Ni, T. Hlaing, J. Hu, S.K. Chan, S.Y. Cheung, G.M. Tse, Expression and Clinical Significance of Herpes Virus Entry Mediator (HVEM) in Breast Cancer, *Ann. Surg. Oncol.* 24 (2017) 4042–4050. <https://doi.org/10.1245/s10434-017-5924-1>.
- [39] L. Duan, J. Tao, X. Yang, L. Ye, Y. Wu, Q. He, Y. Duan, L. Chen, J. Zhu, HVEM/HIF-1 α promoted proliferation and inhibited apoptosis of ovarian cancer cells under hypoxic microenvironment conditions, *J. Ovarian Res.* 13 (2020) 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13048-020-00646-3>.
- [40] M. Tang, X. Cao, Y. Li, G.-Q. Li, Q.-H. He, S.-J. Li, J. Chen, G.-L. Xu, K.-Q. Zhang, High expression of herpes virus entry mediator is associated with poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma., *Am. J. Cancer Res.* 9 (2019) 975–987.
- [41] G. Cai, A. Anumanthan, J.A. Brown, E.A. Greenfield, B. Zhu, G.J. Freeman, CD160 inhibits activation of human CD4+ T cells through interaction with herpesvirus entry mediator, *Nat. Immunol.* 9 (2008) 176–185. <https://doi.org/10.1038/ni1554>.
- [42] M. Steinberg, T.C. Cheung, C.F. Ware, The Signaling Networks of the Herpesvirus Entry Mediator (TNFRSR14) in Immune Regulation, *Immunol. Rev.* 244 (2012) 169–187. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01064.x>.The.
- [43] C. Sordo-Bahamonde, S. Lorenzo-Herrero, R. Granda-Díaz, A. Martínez-Pérez, C. Aguilar-García, J.P. Rodrigo, J.M. García-Pedrero, S. Gonzalez, Beyond the anti-PD-1/PD-L1 era: promising role of the BTLA/HVEM axis as a future target for cancer immunotherapy, *Mol. Cancer*. 22 (2023) 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12943-023-01845-4>.
- [44] D.N. Mauri, R. Ebner, R.I. Montgomery, K.D. Kochel, T.C. Cheung, G.L. Yu, S. Ruben, M. Murphy, R.J. Eisenberg, G.H. Cohen, P.G. Spear, C.F. Ware, LIGHT, a new member of the TNF superfamily, and lymphotoxin α are ligands for herpesvirus entry mediator, *Immunity*. 8 (1998) 21–30. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80455-0](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80455-0).
- [45] W. Liu, S.C. Garrett, E. V Fedorov, U.A. Ramagopal, S.J. Garforth, J.B. Bonanno, S.C. Almo, W. Liu, S.C. Garrett, E. V Fedorov, U.A. Ramagopal, S.J. Garforth, J.B. Bonanno, Structural Basis of CD160 : HVEM Recognition Article Structural Basis of CD160 : HVEM Recognition, (2019) 1286–1295.
- [46] J.C. Whitbeck, C. Peng, H. Lou, R. Xu, S.H. Willis, M. Ponce de Leon, T. Peng, A. V Nicola, R.I. Montgomery, M.S. Warner, A.M. Soulika, L.A. Spruce, W.T. Moore, J.D. Lambris, P.G. Spear, G.H. Cohen, R.J. Eisenberg, Glycoprotein D of herpes simplex virus (HSV) binds directly to HVEM, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily and a mediator of HSV entry., *J. Virol.* 71 (1997) 6083–93. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9223502><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC191868>.
- [47] Y.L. Chen, H.W. Lin, C.L. Chien, Y.L. Lai, W.Z. Sun, C.A. Chen, W.F. Cheng, BTLA blockade enhances Cancer therapy by inhibiting IL-6/IL-10-induced CD19^{high} B lymphocytes, *J. Immunother. Cancer*. 7 (2019) 1–14. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0744-4>.
- [48] C. Stecher, C. Battin, J. Leitner, M. Zettl, K. Grabmeier-Pfistershammer, C. Höller, G.J. Zlabinger, P. Steinberger, PD-1 blockade promotes emerging checkpoint inhibitors in enhancing T Cell responses to allogeneic dendritic cells, *Front. Immunol.* 8 (2017) 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00572>.
- [49] K. Grabmeier-Pfistershammer, C. Stecher, M. Zettl, S. Roskopf, A. Rieger, G.J. Zlabinger, P. Steinberger, Antibodies targeting BTLA or TIM-3 enhance HIV-1 specific

- T cell responses in combination with PD-1 blockade, *Clin. Immunol.* 183 (2017) 167–173. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2017.09.002>.
- [50] J. Choi, R. Medikonda, L. Saleh, T. Kim, A. Pant, S. Srivastava, Y.H. Kim, C. Jackson, L. Tong, D. Routkevitch, C. Jackson, D. Mathios, T. Zhao, H. Cho, H. Brem, M. Lim, Combination checkpoint therapy with anti-PD-1 and anti-BTLA results in a synergistic therapeutic effect against murine glioblastoma, *Oncoimmunology.* 10 (2021) 1–9. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2021.1956142>.
- [51] N. Aubert, S. Brunel, D. Olive, G. Marodon, Blockade of HVEM for prostate cancer immunotherapy in humanized mice, *Cancers (Basel).* 13 (2021). <https://doi.org/10.3390/cancers13123009>.
- [52] L. Han, W. Wang, Y. Fang, Z. Feng, S. Liao, W. Li, Y. Li, C. Li, M. Maitituoheti, H. Dong, Z. Lai, Q. Gao, L. Xi, M. Wu, D. Wang, J. Zhou, L. Meng, S. Wang, D. Ma, Correction: Soluble B and T Lymphocyte Attenuator Possesses Antitumor Effects and Facilitates Heat Shock Protein 70 Vaccine-Triggered Antitumor Immunity against a Murine TC-1 Cervical Cancer Model In Vivo, *J. Immunol.* 188 (2012) 4709–4709. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1290013>.
- [53] M.O. Lasaro, N. Tatsis, S.E. Hensley, J.C. Whitbeck, S.W. Lin, J.J. Rux, E.J. Wherry, G.H. Cohen, R.J. Eisenberg, H.C. Ertl, Targeting of antigen to the herpesvirus entry mediator augments primary adaptive immune responses, *Nat. Med.* 14 (2008) 205–212. <https://doi.org/10.1038/nm1704>.
- [54] T.C. Cheung, L.M. Osborne, M.W. Steinberg, M.G. Macauley, S. Fukuyama, H. Sanjo, C. D’Souza, P.S. Norris, K. Pfeffer, K.M. Murphy, M. Kronenberg, P.G. Spear, C.F. Ware, T Cell Intrinsic Heterodimeric Complexes between HVEM and BTLA Determine Receptivity to the Surrounding Microenvironment, *J. Immunol.* 183 (2009) 7286–7296. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.0902490>.
- [55] C. Battin, J. Leitner, P. Waidhofer-Söllner, K. Grabmeier-Pfistershammer, D. Olive, P. Steinberger, BTLA inhibition has a dominant role in the cis-complex of BTLA and HVEM, *Front. Immunol.* 13 (2022) 1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.956694>.
- [56] Y. Ishida, Y. Agata, K. Shibahara, T. Honjo, Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death., *EMBO J.* 11 (1992) 3887–95.
- [57] X. Cheng, V. Veverka, A. Radhakrishnan, L.C. Waters, F.W. Muskett, S.H. Morgan, J. Huo, C. Yu, E.J. Evans, A.J. Leslie, M. Griffiths, C. Stubberfield, R. Griffin, A.J. Henry, A. Jansson, J.E. Ladbury, S. Ikemizu, M.D. Carr, S.J. Davis, Structure and interactions of the human programmed cell death 1 receptor, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 11771–11785. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.448126>.
- [58] K.M. Zak, R. Kitel, S. Przetocka, P. Golik, K. Guzik, B. Musielak, A. Dömling, G. Dubin, T.A. Holak, Structure of the Complex of Human Programmed Death 1, PD-1, and Its Ligand PD-L1, *Structure.* 23 (2015) 2341–2348. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.09.010>.
- [59] K.A. Sheppard, L.J. Fitz, J.M. Lee, C. Benander, J.A. George, J. Wooters, Y. Qiu, J.M. Jussif, L.L. Carter, C.R. Wood, D. Chaudhary, PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3 ζ signalosome and downstream signaling to PKC θ , *FEBS Lett.* 574 (2004) 37–41. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.07.083>.
- [60] T. Okazaki, A. Maeda, H. Nishimura, T. Kurosaki, T. Honjo, PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 13866–13871. <https://doi.org/10.1073/pnas.231486598>.
- [61] J.L. Riley, PD-1 signaling in primary T cells, *Immunol. Rev.* 229 (2009) 114–125. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00767.x>.

- [62] S.Y. Tseng, M. Otsuji, K. Gorski, X. Huang, J.E. Slansky, S.I. Pai, A. Shalabi, T. Shin, D.M. Pardoll, H. Tsuchiya, B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells, *J. Exp. Med.* 193 (2001) 839–845. <https://doi.org/10.1084/jem.193.7.839>.
- [63] Y. Latchman, C.R. Wood, T. Chernova, D. Chaudhary, M. Borde, I. Chernova, Y. Iwai, A.J. Long, J.A. Brown, R. Nunes, E.A. Greenfield, K. Bourque, V.A. Boussiotis, L.L. Carter, B.M. Carreno, N. Malenkovich, H. Nishimura, T. Okazaki, T. Honjo, A.H. Sharpe, G.J. Freeman, PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation, *Nat. Immunol.* 2 (2001) 261–268. <https://doi.org/10.1038/85330>.
- [64] N. Selenko-Gebauer, O. Majdic, A. Szekeres, G. Höfler, E. Guthann, U. Korthäuer, G. Zlabinger, P. Steinberger, W.F. Pickl, H. Stockinger, W. Knapp, J. Stöckl, B7-H1 (Programmed Death-1 Ligand) on Dendritic Cells Is Involved in the Induction and Maintenance of T Cell Anergy, *J. Immunol.* 170 (2003) 3637–3644. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.170.7.3637>.
- [65] M.Z. Baptista, L.O. Sarian, S.F.M. Derchain, G.A. Pinto, J. Vassallo, Prognostic significance of PD-L1 and PD-L2 in breast cancer, *Hum. Pathol.* 47 (2016) 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2015.09.006>.
- [66] L. Zheng, PD-L1 Expression in Pancreatic Cancer, *J. Natl. Cancer Inst.* 109 (2017) 2016–2017. <https://doi.org/10.1093/jnci/djw304>.
- [67] T. Miyazawa, H. Marushima, H. Saji, K. Kojima, M. Hoshikawa, M. Takagi, H. Nakamura, PD-L1 expression in non-small-cell lung cancer including various adenocarcinoma subtypes, *Ann. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 25 (2019) 1–9. <https://doi.org/10.5761/atcs.0a.18-00163>.
- [68] J. Hamanishi, M. Mandai, M. Iwasaki, T. Okazaki, Y. Tanaka, K. Yamaguchi, T. Higuchi, H. Yagi, K. Takakura, N. Minato, T. Honjo, S. Fujii, 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.* 104 (2007) 3360–3365. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611533104>.
- [69] J. Calderaro, B. Rousseau, G. Amaddeo, M. Mercey, C. Charpy, C. Costentin, A. Luciani, E.S. Zafrani, A. Laurent, D. Azoulay, F. Lafdil, J.M. Pawlotsky, Programmed death ligand 1 expression in hepatocellular carcinoma: Relationship With clinical and pathological features, *Hepatology.* 64 (2016) 2038–2046. <https://doi.org/10.1002/hep.28710>.
- [70] A. Neyaz, N. Husain, S. Kumari, S. Gupta, S. Shukla, S. Arshad, N. Anand, A. Chaturvedi, Clinical relevance of PD-L1 expression in gallbladder cancer: a potential target for therapy, *Histopathology.* 73 (2018) 622–633. <https://doi.org/10.1111/his.13669>.
- [71] S. Yin, Z. Chen, D. Chen, D. Yan, Strategies targeting PD-L1 expression and associated opportunities for cancer combination therapy, *Theranostics.* 13 (2023) 1520–1544. <https://doi.org/10.7150/thno.80091>.
- [72] C. Pan, H. Yang, Y. Lu, S. Hu, Y. Wu, Q. He, X. Dong, 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.* 213 (2021) 113170. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113170>.
- [73] R.M. Poole, Pembrolizumab: First global approval, *Drugs.* 74 (2014) 1973–1981. <https://doi.org/10.1007/s40265-014-0314-5>.
- [74] S.L. Topalian, M. Sznol, D.F. McDermott, H.M. Kluger, R.D. Carvajal, W.H. Sharfman, J.R. Brahmer, D.P. Lawrence, M.B. Atkins, J.D. Powderly, P.D. Leming, E.J. Lipson, I. Puzanov, D.C. Smith, J.M. Taube, J.M. Wigginton, G.D. Kollia, A. Gupta, D.M. Pardoll, J.A. Sosman, F.S. Hodi, Survival, durable tumor remission, and long-term safety in

- patients with advanced melanoma receiving nivolumab., *J. Clin. Oncol.* 32 (2014) 1020–30. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.53.0105>.
- [75] A. Markham, S. Duggan, Cemiplimab: First Global Approval, *Drugs.* (2018). <https://doi.org/10.1007/s40265-018-1012-5>.
- [76] A. Lee, S.J. Keam, Tislelizumab: First Approval, *Drugs.* 80 (2020) 617–624. <https://doi.org/10.1007/s40265-020-01286-z>.
- [77] A. Markham, Atezolizumab: First Global Approval, *Drugs.* 76 (2016) 1227–1232. <https://doi.org/10.1007/s40265-016-0618-8>.
- [78] E.S. Kim, Avelumab: First Global Approval, *Drugs.* 77 (2017) 929–937. <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0749-6>.
- [79] Y.Y. Syed, Durvalumab: First Global Approval, *Drugs.* 77 (2017) 1369–1376. <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0782-5>.
- [80] ClinicalTrials.gov, (dostęp z dnia 01.09.2024).
- [81] D.J. Craik, D.P. Fairlie, S. Liras, D. Price, The Future of Peptide-based Drugs, *Chem. Biol. Drug Des.* 81 (2013) 136–147. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12055>.
- [82] M. Pelay-Gimeno, A. Glas, O. Koch, T.N. Grossmann, Structure-Based Design of Inhibitors of Protein-Protein Interactions: Mimicking Peptide Binding Epitopes, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 54 (2015) 8896–8927. <https://doi.org/10.1002/anie.201412070>.
- [83] P. Vlieghe, V. Lisowski, J. Martinez, M. Khrestchatsky, Synthetic therapeutic peptides: science and market, *Drug Discov. Today.* 15 (2010) 40–56. <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2009.10.009>.
- [84] R. Kojima, M. Kajikawa, M. Shiroishi, K. Kuroki, K. Maenaka, Molecular basis for herpesvirus entry mediator recognition by the human immune inhibitory receptor CD160 and its relationship to the cosignaling molecules BTLA and LIGHT, *J. Mol. Biol.* 413 (2011) 762–772. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.09.018>.
- [85] T.C. Cheung, I.R. Humphreys, K.G. Potter, P.S. Norris, H.M. Shumway, B.R. Tran, G. Patterson, R. Jean-Jacques, M. Yoon, P.G. Spear, K.M. Murphy, N.S. Lurain, C.A. Benedict, C.F. Ware, Evolutionarily divergent herpesviruses modulate T cell activation by targeting the herpesvirus entry mediator cosignaling pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 13218–13223. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506172102>.
- [86] M. Yu, H. Zhao, Y. Miao, S.Z. Luo, S. Xue, Virtual evolution of HVEM segment for checkpoint inhibitor discovery, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021). <https://doi.org/10.3390/ijms22126638>.
- [87] K. Wang, Y. Song, Y. Su, Y. Liang, L. Wang, Effect of the hairpin structure of peptide inhibitors on the blockade of PD-1/PD-L1 axis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 527 (2020) 453–457. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.04.018>.
- [88] W. jin Jeong, J. Bu, Y. Han, A.J. Drelich, A. Nair, P. Král, S. Hong, Nanoparticle Conjugation Stabilizes and Multimerizes β -Hairpin Peptides to Effectively Target PD-1/PD-L1 β -Sheet-Rich Interfaces, *J. Am. Chem. Soc.* 142 (2020) 1832–1837. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b10160>.
- [89] K. Zhou, J. Lu, X. Yin, H. Xu, L. Li, B. Ma, Structure-based derivation and intramolecular cyclization of peptide inhibitors from PD-1/PD-L1 complex interface as immune checkpoint blockade for breast cancer immunotherapy, *Biophys. Chem.* 253 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2019.106213>.
- [90] A.C. Conibear, A. Bochen, K.J. Rosengren, P. Stupar, C. Wang, H. Kessler, D.J. Craik, The cyclic cystine ladder of theta-defensins as a stable, bifunctional scaffold: A proof-of-concept study using the integrin-binding RGD motif., *ChemBioChem.* 15 (2014) 451–459. <https://doi.org/10.1002/cbic.201300568>.
- [91] A. Rozek, J.P.S. Powers, C.L. Friedrich, R.E.W. Hancock, Structure-Based Design of an Indolicidin Peptide Analogue with Increased Protease Stability, *Biochemistry.* 42 (2003)

- 14130–14138. <https://doi.org/10.1021/bi035643g>.
- [92] W. Zhai, X. Zhou, M. Zhai, W. Li, Y. Ran, Y. Sun, J. Du, W. Zhao, L. Xing, Y. Qi, Y. Gao, Blocking of the PD-1/PD-L1 interaction by a novel cyclic peptide inhibitor for cancer immunotherapy, *Sci. China Life Sci.* 64 (2021) 548–562. <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1740-8>.
- [93] R.I. Montgomery, M.S. Warner, B.J. Lum, P.G. Spear, Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family, *Cell*. 87 (1996) 427–436. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81363-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81363-X).
- [94] C. Krummenacher, V.M. Supekar, J.C. Whitbeck, E. Lazear, S.A. Connolly, R.J. Eisenberg, G.H. Cohen, D.C. Wiley, A. Carfi, Structure of unliganded HSV gD reveals a mechanism for receptor-mediated activation of virus entry, *EMBO J.* 24 (2005) 4144–4153. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600875>.
- [95] E. Lazear, J.C. Whitbeck, Y. Zuo, A. Carfi, G.H. Cohen, R.J. Eisenberg, C. Krummenacher, Induction of conformational changes at the N-terminus of herpes simplex virus glycoprotein D upon binding to HVEM and nectin-1, *Virology*. 448 (2014) 185–195. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.10.019>.
- [96] D. Cibrián, F. Sánchez-Madrid, CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper, *Eur. J. Immunol.* 47 (2017) 946–953. <https://doi.org/10.1002/eji.201646837>.
- [97] A. Bajnok, M. Ivanova, J. Rigó, G. Toldi, The Distribution of Activation Markers and Selectins on Peripheral T Lymphocytes in Preeclampsia, *Mediators Inflamm.* 2017 (2017). <https://doi.org/10.1155/2017/8045161>.
- [98] L. Zhu, X. Wang, H. Li, Z. Zhao, X. Liu, J. Lyu, J. Meng, Q. Li, Z. He, L. Quan, Discovery of peptide inhibitors targeting human programmed death 1 (PD-1) receptor, *Oncotarget*. 7 (2016). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11274>.
- [99] G.H. Sack Jr, Serum amyloid A – a review, *Mol. Med.* 24 (2018) 1–27.
- [100] M. Abrahamson, Cystatins, *Methods Enzymol.* 244 (1994) 685–700. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)44051-4](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)44051-4).
- [101] M. Bokarewa, M. Abrahamson, N. Levshin, A. Egesten, A. Grubb, L. Dahlberg, A. Tarkowski, Cystatin C binds serum amyloid A, downregulating its cytokine-generating properties, *J. Rheumatol.* 34 (2007) 1293–1301.
- [102] Z.L. Almeida, R.M.M. Brito, Structure and aggregation mechanisms in amyloids, *Molecules*. 25 (2020). <https://doi.org/10.3390/molecules25051195>.
- [103] J.A.J. Housmans, G. Wu, J. Schymkowitz, F. Rousseau, A guide to studying protein aggregation, *FEBS J.* 290 (2023) 554–583. <https://doi.org/10.1111/febs.16312>.
- [104] P. Juszczuk, G. Paraschiv, A. Szymanska, A.S. Kolodziejczyk, S. Rodziewicz-Motowidlo, Z. Grzonka, M. Przybylski, Binding epitopes and interaction structure of the neuroprotective protease inhibitor cystatin C with β -amyloid revealed by proteolytic excision mass spectrometry and molecular docking simulation, *J. Med. Chem.* 52 (2009) 2420–2428. <https://doi.org/10.1021/jm801115e>.