

1. Imię i nazwisko.

Tomasz Rygiel

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

2009: stopień doktora nauk medycznych

Wydział Medycyny, Uniwersytet Amsterdamski, Amsterdam, Holandia.

Data obrony - 8 maja 2009.

Tytuł rozprawy doktorskiej: "The function of Tiam1 in tumor cell biology."

2002: tytuł magistra biologii, specjalność biologia molekularna

Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski.

Data obrony - 19 września 2002

Tytuł: „Struktura i funkcja mitochondrialnego kompleksu białkowego Phb1/2”.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych.

2018-obecnie: adiunkt naukowy w Zakładzie Immunologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

2016 – 2018: kierownik projektu w Zakładzie Immunologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

2012 – 2016: adiunkt w Zakładzie Immunologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

2007 – 2011: staż podoktorski (post-doc), University Medical Center Utrecht, Department of Immunology, Utrecht, Holandia

2002 – 2007: doktorat w Netherlands Cancer Institute, Department of Cell Biology, Amsterdam, Holandia

4. Omówienie osiągnięć o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt 2 Ustawy.

Cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych, zgodnie z art. 219 ust. 1. pkt 2b Ustawy:

Tytuł osiągnięcia: **Zbadanie regulacji odpowiedzi odpornościowej przez immunologiczne receptory hamujące.**

4.1. Prace oryginalne:

1. **Rygiel TP***; Rijkers ESK*; de Ruiter T; Stolte EH; van der Valk M; Rimmelzwaan GF; Boon L; van Loon AM; Coenjaerts FE; Hoek RM; Tesselaar K; Meyaard L.
„Lack of CD200 Enhances Pathological T Cell Responses during Influenza Infection.”
J Immunol. 2009 Aug 1;183(3):1990-6.
* równy udział współautorów
IF 2009: 5,646
2. **Rygiel TP**, Stolte EH, de Ruiter T, van de Weijer ML, Meyaard L.
“Tumor-expressed collagens can modulate immune cell function through the inhibitory collagen receptor LAIR-1”.
Molecular Immunology. 2011 Oct;49(1-2):402-6
IF 2011: 2,897
3. **Rygiel TP**; Karnam G; Goverse G; van der Marel APJ; Greuter MJ; van Schaarenburg RA; Visser WF; Brenkman AB; Molenaar R; Hoek RM; Mebius RE; Meyaard L.
“CD200-CD200R signaling suppresses anti-tumor responses independently of CD200 expression on the tumor.”
Oncogene. 2012 Jun 14;31(24):2979-88.
IF 2012: 7,357
4. Karnam G*; **Rygiel TP***; Raaben M; Grinwis GCM; Coenjaerts FE; Rensing ME; Rottier PJM; de Haan CAM; Meyaard L.
“CD200 Receptor Controls Sex-Specific TLR7 Responses to Viral Infection.”
PLoS Pathog. 2012;8(5):e1002710.
* równy udział współautorów
IF 2012: 8,136

5. Pilch Z; Tonecka K; Braniewska A; Sas Z; Skorzynski M; Boon L; Golab J; Meyaard L; **Rygiel TP**.
„Antitumor Activity of TLR7 Is Potentiated by CD200R Antibody Leading to Changes in the Tumor Microenvironment.
Cancer Immunol Res. 2018 Aug;6(8):930-940.
IF 2018: 8,619

6. Pilch Z; Tonecka K; Skorzynski M; Sas Z; Braniewska A; Kryczka T; Boon L; Golab J; Meyaard L; **Rygiel TP**.
„The pro-tumor effect of CD200 expression is not mimicked by agonistic CD200R antibodies.”
PLoS One. 2019 Jan 17;14(1):e0210796..
IF 2018: 2,776

4.2. Praca przeglądowa:

7. **Rygiel TR**; Meyaard L.
“CD200R signaling in tumor tolerance and inflammation: A tricky balance.”
Curr. Opin. Immunol. 2012 Apr;24(2):233-8.
IF 2012: 8,771

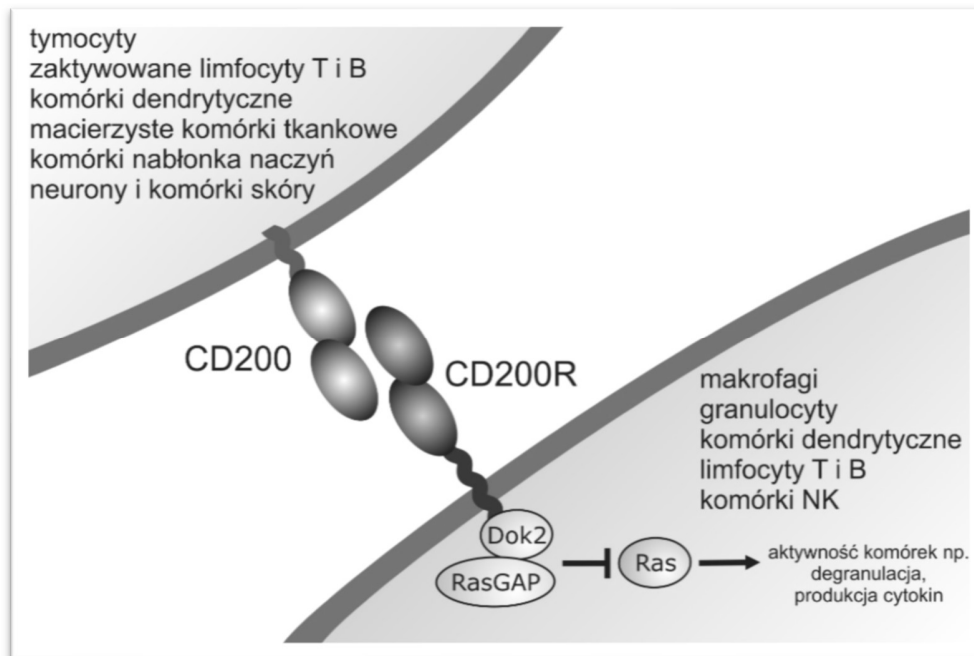
Sumaryczny Impact Factor cyklu publikacji = 44,202

4.3. Omówienie celu naukowego prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Naczelnym zadaniem układu odpornościowego jest utrzymanie homeostazy w organizmie zarówno podczas infekcji oraz innych stanów patologicznych, wliczając choroby nowotworowe. Regulacja układu odpornościowego jest niezwykle istotna zarówno dla stworzenia efektywnej odpowiedzi immunologicznej, jak i utrzymania normalnego funkcjonowania organizmu. Szlaki regulacyjne, znoszą swoje działanie (np. przez negatywne sprzężenie zwrotne), aby zapewnić właściwą kontrolę i wygaszanie odpowiedzi odpornościowej. Brak zahamowania odpowiedzi odpornościowej może prowadzić do: uszkodzenia tkanek, rozwoju nadwrażliwości immunologicznej czy chorób autoimmunizacyjnych. Istnieje szereg mechanizmów umożliwiających regulację aktywacji i hamowania odpowiedzi odpornościowej [1]. Czynnikiem aktywującym działanie komórek odpornościowych są: cząsteczki ko-stymulujące, cytokiny, chemokiny prozapalne i receptory aktywujące (np. NKG2D, TLR). Z kolei zrównoważenie aktywacji immunologicznej zachodzi dzięki działaniu receptorów punktów kontrolnych np.: CTLA-4, PD-1, innych receptorów hamujących (np. KIR, SIRP-1 α , VISTA, LAG-3, TIM-3, CD200R, LAIR-1, SIRT), przeciwciał (FcR), hamujących receptory, cytokin przeciwzapalnych i komórek regulatorowych (Treg, MDSC)[2]. **Celem przedstawionego cyklu prac jest poznanie roli immunologicznych receptorów hamujących - CD200R i LAIR1 w regulacji odpowiedzi odpornościowej podczas rozwoju nowotworów i infekcji wirusowych.**

Sukces terapii onkologicznej, polegającej na blokowaniu działania receptorów hamujących PD-1 i CTLA-4 (bądź ich ligandów), pokazał potencjał manipulacji regulacją układu odpornościowego. Wiele wysiłków, zarówno akademickich jak i sektora farmako-medycznego, skupia się na ulepszeniu działania inhibitorów receptorów punktów kontrolnych przez skojarzenie obecnych terapii z innymi lekami [3]. Ponadto bada się możliwości manipulacji innymi receptorami hamującymi np.: SIRP-1 α , VISTA, LAG-3, TIM-3, TIGIT. Należy jednak pamiętać, że istnieje kilkadziesiąt innych receptorów kontrolujących działanie układu odpornościowego, które potencjalnie mogą być celem terapii immunomodulacyjnych, a do których zaliczają się też CD200R i LAIR-1. Poszerzenie wiedzy na temat mechanizmów regulacji działania receptorów CD200R i LAIR-1 może mieć znaczenie kliniczne w terapii i może przyczynić się do stworzenia nowych lub modyfikacji już istniejących protokołów terapeutycznych w leczeniu nowotworów. Ponadto, w wypadku stosowania terapii skierowanej przeciw CD200R, wiedza ta może mieć znaczenie dla jej bezpieczeństwa np. podczas infekcji wirusowych. Jak pokazano w dwóch publikacjach z omawianego cyklu, usunięcie niektórych hamulców odpowiedzi odpornościowej (CD200 - liganda CD200R), może prowadzić do immunopatologii podczas infekcji wirusowej, kiedy odpowiedź odpornościowa nie jest właściwie regulowana. Dlatego też poznanie wszystkich konsekwencji blokowania receptorów hamujących jest tak

ważne dla doboru terapii. Jest to istotne ponieważ podczas pierwszych prób przeciwciał przeciw CTLA-4 i PD-1, dochodziło do poważnych komplikacji, ze zgonami włącznie, spowodowanych masowych wydzielaniem cytokin (ang. cytokine storm).



Rycina 1. Schemat interakcji CD200R i CD200, z zaznaczonymi typami komórek u których występują obydwa białka oraz kaskada sygnałna aktywowana po wzbudzeniu CD200R (obrazek z [4]).

CD200R jest regulatorem immunologicznym, którego wzbudzenie, przez fizjologiczny ligand lub przeciwciało agonistyczne, hamuje i wygasza odpowiedź odpornościową [5]. CD200R jest obecny na powierzchni komórek odpornościowych, głównie pochodzenia szpikowego (Ryc. 1.). Homolog CD200R - białko CD200 jest specyficznym ligandem wiążącym i uruchamiającym działanie receptora CD200R. W przeciwieństwie do CD200R, CD200 jest obecny na powierzchni komórek odpornościowych (np. zaktwowanych makrofagów i limfocytów) i nabłonkowych (np. śródbłonna naczyń krwionośnych, komórek macierzystych mieszków włosowych, komórek nabłonkowych łozyska). Efektem wzbudzenia CD200R jest wyhamowanie odpowiedzi odpornościowej. W zależności od kontekstu immunologicznego, może powodować pozytywne lub negatywne skutki dla zdrowia. Brak ekspresji CD200, i co za tym idzie wzbudzenia CD200R, prowadzi do zwiększonej podatności na rozwój eksperymentalnego zapalenia stawów (ang. collagen-induced arthritis) i eksperymentalnego autoimmunologicznego zapalenia mózgu i rdzenia (ang. experimental autoimmune encephalomyelitis) [6]. Ponadto, brak CD200 prowadzi do zwiększonej podatności na infekcje bakteryjne (*Neisseria meningitidis*) [7] i wirusowe (grypa, koronawirus MHV) [8]. Z drugiej strony niemożność aktywacji CD200R przez CD200, prowadzi do zmniejszonej

podatności rozwoju nowotworów (brodawczaki skóry) [9]. Podobnie do strategii terapeutycznej stosowanej dla receptorów PD-1 i CTLA-4, podjęto także próby wykorzystania przeciwciał blokujących CD200R [10]. Wyniki kliniczne działania anti-CD200R były różne, u pacjentów z B-komórkową przewlekłą białaczką limfatyczną lub szpiczakiem nie wykazano zadowalających efektów klinicznych i badanie zostało wstrzymane. Jednak dane przedkliniczne, również opisane w tym autoreferacie pokazują, że odwrotne podejście może być efektywne terapeutycznie [11]. Wykorzystanie przeciwciała wzbudzającego działanie CD200R, spowodowało efekt terapeutyczny w kombinacji z agonistą receptora TLR7 w mysim modelu nowotworowym. Białko powierzchniowe LAIR-1 jest immunologicznym receptorem kolagenów i białek posiadających motyw kolagenowy np. SP-D. Podobnie jak w wypadku CD200R, związanie LAIR-1 ze specyficznym ligandem powoduje aktywację szlaku sygnałowego i zmniejszenie aktywacji komórek odpornościowych [12]. Funkcja LAIR-1 została opisana w hamowaniu aktywności cytotoksycznej limfocytów T i komórek NK jak również w regulacji aktywności neutrofilii. Co istotne, hamowanie działania aktywności cytotoksycznej komórek efektorowych, ma również znaczenie w kontekście odpowiedzi przeciwnowotworowej. Nadekspresja kolagenów jest częsta w nowotworach litych, a dostępność potencjalnych ligandów dla LAIR-1 jest powszechna [13]. Zablokowanie wzbudzenia działania hamującego LAIR-1 mogłoby więc zwiększyć efektywność działania efektorowych komórek przeciwnowotworowych.

Publikacja 1 – “Lack of CD200 Enhances Pathological T Cell Responses during Influenza Infection.”

W pierwszej publikacji z cyklu zbadałem efekt całkowitego usunięcia ekspresji CD200, a co za tym idzie niemożności wzbudzenia CD200R, podczas infekcji wirusem grypy u myszy. Wykazałem, że myszy szczepu *Cd200^{-/-}*, rozwijają cięższe objawy chorobowe w porównaniu do kontroli, tj. gwałtowny spadek masy ciała, zwiększony naciek komórek zapalnych. Ponadto doszło u nich do zwiększonego uszkodzenia śródbłonna w płucach, nieszczelności bariery w płucach, zwiększenia ilości białka w płynie pochodzącym z płukania oskrzeli i pęcherzyków (bronchoalveolar lavage). Pomimo powyższych komplikacji, myszy *Cd200^{-/-}* rozwijały normalną odpowiedź komórkową i humoralną, jak również kontrolowały ilość wirusa z podobną kinetyką jak myszy kontrolne. Powyższe wyniki sugerowały, że zastrzone objawy chorobowe były wynikiem przeciwwirusowej odpowiedzi odpornościowej, przy braku regulacji przez CD200R. Hipoteza ta została zweryfikowana przez terapeutyczne usunięcie limfocytów T, za pomocą przeciwciał deplecyjnych. Znaczna, lecz niecałkowita deplecja limfocytów T spowodowała drastyczny wzrost ilości wirusowego RNA i opóźniła czas usunięcia wirusa grypy, jednocześnie całkowicie powstrzymany został rozwój symptomów chorobowych np. spadek masy ciała. Wyniki te wskazują, że limfocyty T są niezbędne do kontroli infekcji wirusowej, jednak ich działanie prowadzi jednocześnie do wystąpienia objawów chorobowych i

immunopatologii. Interakcja CD200-CD200R, nieobecna u myszy *Cd200^{-/-}*, kontroluje aktywność limfocytów T i zapobiega ich zbyt dużej aktywności, która może prowadzić do poważnych objawów chorobowych podczas odpowiedzi przeciwwirusowej.

Publikacja 4 – “CD200 Receptor Controls Sex-Specific TLR7 Responses to Viral Infection.”

W kolejnej pracy badałem czy ścieżka sygnałna CD200-CD200R może także kontrolować odpowiedź na inne infekcje wirusowe. W tym celu wykorzystano model infekcji koronawirusem mysiej żółtaczką (MHV - ang. mouse hepatitis corona virus). Wirus ten był zmodyfikowany i posiadał dodatkowy gen lucyferazy, co umożliwiało przyżyciowy pomiar poziomu wirusa za pomocą pomiaru bioluminescencji. Zaobserwowano, że myszy *Cd200^{-/-}* szybciej usuwały wirusa, co było skorelowane także z wyższym stężeniem IFN typu I, a także z większą ilością agregatów komórek jednojądrzastych w wątrobie. Co istotne, ww. efekty były bardziej wyraźne u samic niezależnie od szczepu (miały niższy poziom wirusa, wyższe stężenie IFN typu I, więcej ognisk zapalnych w wątrobie), natomiast samice *Cd200^{-/-}* miały najbardziej skrajne wartości ww. parametrów.

Produkcja IFN typu I jest regulowana przez ścieżkę sygnałną zależną od TLR7, myszy pozbawione receptora IFN typu I, mają upośledzoną odpowiedź na MHV [14]. Dlatego też zbadano czy wzbudzenie CD200R hamuje ścieżkę TLR7. Podanie syntetycznego agonisty TLR7, spowodowało zwiększoną produkcję IFN typu I, zwłaszcza u samic *Cd200^{-/-}*. Aby poznać mechanizm tej regulacji zbadano aktywność ścieżki TLR7 w komórkowym układzie reporterowym. Wykazano, że wzbudzenie CD200R za pomocą przeciwciał agonistycznego, hamuje aktywację ścieżki TLR7. W drugim modelu wirusowym, infekcji wirusem grypy, potwierdzono wcześniejsze obserwacje z publikacji [15], CD200-CD200R nie miało wpływu na tempo usuwania wirusa. Tym razem jednak porównano także wpływ płci na odpowiedź przeciwwirusową. Okazało się, że podobnie jak w wypadku infekcji MHV, samice wcześniej usuwają wirusa grypy w porównaniu z samcami. Natomiast, u myszy *Cd200^{-/-}* (zwłaszcza u samic) występuje zwiększony naciek neutrofilowy do płuc.

Podsumowując, zarówno ścieżka sygnałna CD200-CD200R jak i różnice determinowane przez płć wpływają na przebieg odpowiedzi przeciwwirusowej. Wyniki te mogą mieć znaczenie dla bezpieczeństwa terapii w wypadku wykorzystania CD200-CD200R jako celu molekularnego (np. terapii przeciwciałami monoklonalnymi), ponieważ różnice płci w kombinacji z hamowaniem CD200R mogą prowadzić do patologicznej odpowiedzi odpornościowej podczas infekcji wirusowej.

Kolejne publikacje dotyczyły regulacji odpowiedzi przeciwnowotworowej przez CD200R lub LAIR-1:

Publikacja 2 – “Tumor-expressed collagens can modulate immune cell function through the inhibitory collagen receptor LAIR-1.”

W momencie rozpoczęcia badań ujętych w publikacji nr 2, LAIR-1 był już znanym receptorem hamującym, jednak identyfikacja jego ligandów funkcjonalnych – kolagenów była odkryciem stosunkowo niedawnym[16]. Dlatego też w pracy tej postawiłem pytanie czy kolageny produkowane i prezentowane przez komórki nowotworowe wzbudzają receptor i doprowadzą do zahamowania działania efektorowych komórek cytotoksycznych. W pierwszym etapie, zbadano zdolność adhezji dwóch typów komórek: komórek z nadekspresją LAIR-1 i komórek nowotworowych z panelu 11-tu linii. Zastosowanie kompletywnego inhibitora LAIR-1 (ludzkiego rozpuszczalnego białka LAIR-1-Fc), zablokowało interakcję LAIR-1 z ligandami na badanych komórkach nowotworowych. Zaobserwowano wiązanie komórek z LAIR-1 i zidentyfikowano linie o największej efektywności adhezji m.in. A431, HT29, bEnd.3, SK-BR3. Stworzono też linię K562 z nadekspresją błonowego kolagenu typu XVII. Komórki K562 naturalnie nie posiadają tego białka na swojej powierzchni, więc linia macierzysta posłużyła jako kontrolna negatywna. Komórki te i kilka linii nowotworowych wykorzystano do zbadania efektywności adhezji do komórek z ekspresją mysiego wariantu LAIR-1. Pokazano, że komórki K562-coll-XVII i A431 wiążą się do komórek mLAIR-1⁺ z najwyższą efektywnością. Natomiast enzymatyczne usunięcie kolagenów z błony, za pomocą kolagenazy, spowodowało znaczący spadek wiązania ww. komórek. Jeszcze wyraźniejszy efekt zablokowania tej interakcji spowodowało wyciszenie ekspresji P4H β , podjednostki dioxxygenazy prolin-prokolagenu, enzymu która fizjologicznie zapewnia właściwą konformację potrójnej helisy kolagenów. Kolejnym krokiem było zbadanie czy komórki nowotworowe wzbudzają ścieżkę sygnałną zależną od LAIR-1. W tym celu wykorzystano linie reporterowe z mysim lub ludzkim LAIR-1, które po wzbudzeniu powoduje aktywację promotora NFAT i ekspresję GFP. Pokazano, że linie bEnd.3, L-929, LS174, BxPC-2 i A431 najefektywniej wzbudzają mysie (bardziej aktywny) LAIR-1, natomiast bEnd.3 i BxPC-3 najefektywniej wzbudzały komórki z ludzkim wariantem tego białka. Znaczna część tego sygnału pochodziła z macierzy zewnątrzkomórkowej produkowanej przez komórki nowotworowe, zwłaszcza z linii L-929, A431 BxPC-3. Finalnym eksperymentem funkcjonalnym było zbadanie efektywności wzbudzenia LAIR-1 na komórkach cytotoksycznych z jednojądrzastych komórek krwi. Pokazano, że zarówno przeciwciała agonistyczne (anty-LAIR-1), jak i ekspresja kolagenu XVII powodowały zahamowanie aktywności cytotoksycznej w stosunku do komórek nowotworowych pozbawionych MHC-II.

Podsumowując, wyniki powyższej publikacji wskazują, że kolageny produkowane przez komórki nowotworowe są funkcjonalnym ligandem receptora LAIR-1 i są zdolne do zahamowania działania komórek efektorowych posiadających ten receptor.

Publikacja 3 – “CD200-CD200R signaling suppresses anti-tumor responses independently of CD200 expression on the tumor.”

W kolejnym projekcie postanowiłem zbadać wpływ ścieżki sygnałnej CD200-CD200R na rozwój nowotworów. W tym celu zastosowano klasyczny model karcynogenezy chemicznej z protokołem DMBA/TPA, który prowadzi do powstawania brodawczaków, niezłośliwych nowotworów skóry. Zaobserwowano, że myszy *Cd200*^{-/-} rozwijały mniejszą liczbę brodawczaków, a ich średnia wielkość była mniejsza. Nieoczekiwanie stwierdzono, że w tkance nowotworowej myszy kontrolnych, praktycznie nie występowała ekspresja białka CD200, w przeciwieństwie do zdrowej przylegającej tkanki. Co sugerowało, że oddziaływanie CD200 na CD200R możliwe było poza nowotworem, natomiast efekt immunologiczny nie był lokalny i obejmował cały organizm. Ponadto zaobserwowano, że w trakcie 20-tygodniowego protokołu karcynogeny, jeszcze przed wystąpieniem makroskopowych brodawczaków, myszy *Cd200*^{-/-} rozwijały przejściowy fenotyp skórny, charakteryzujący się bardzo suchą skórą i brakiem owłosienia. Co mogło sugerować zwiększony stan zapalny podczas chronicznej indukcji zapalenia z wykorzystaniem TPA. Następnie, zbadano zdolność badanych szczepów do indukcji nosowej tolerancji immunologicznej. W modelu indukowanym białkiem OVA, u myszy *Cd200*^{-/-} stwierdzono obniżoną zdolność do indukcji tolerancji immunologicznej. Brak zdolności rozwoju tolerancji na nowe antygeny, w tym neoantygeny nowotworowe może powodować efektywniejszą odpowiedź przeciwnowotworową, zarazem większą odporność na karcynogenezę. W celu scharakteryzowania aktywacji układu odpornościowego w trakcie karcynogenezy, zbadano produkcję dwóch cytokin prozapalnych IL-1 β i IL-6 w komórkach dendrytycznych pochodzących z węzłów chłonnych drenujących chłonkę ze skóry (tkanki poddawanej karcynogenezie). Stwierdzono podwyższony poziom ekspresji obydwóch cytokin w komórkach pochodzących od myszy *Cd200*^{-/-}. Tolerancja immunologiczna i zapalenie są w znacznym stopniu regulowane przez limfocyty regulatorowe Treg, charakteryzujące się ekspresją czynnika transkrypcyjnego FoxP3. Posługując się pierwotnymi komórkami i cytometrią przepływową, zbadano ilość Treg w węzłach chłonnych podczas karcynogenezy. U myszy *Cd200*^{-/-} i kontroli stwierdzono podobną ilość komórek Treg we wszystkich analizowanych typach węzłów. Natomiast, w jednym z węzłów (pachowym), zaobserwowano znacząco podwyższony odsetek limfocytów T (CD4⁺) produkujących prozapalną cytokinę IL-17. Nieoczekiwanie, zaobserwowano że frakcja podwójnie-pozytywnych limfocytów FoxP3⁺IL-17⁺ jest znacząco powiększona u

mysz *Cd200*^{-/-} we wszystkich czterech typach węzłów chłonnych. Posługując się całkowicie komplementarnymi technikami: immunofluorescencji i mikroskopii konfokalnej oszacowano częstość występowania ww. rodzajów komórek. We wszystkich badanych typach węzłów chłonnych populacja komórek Th17 była istotnie zwiększona u myszy *Cd200*^{-/-}, natomiast populacja komórek FoxP3⁺RORγ⁺ była jeszcze bardziej istotnie zwiększona. Ta samą analizę zastosowano dla tkanki nowotworowej, jednak nie udało się zaobserwować różnic w częstości występowania ww. populacji bądź efektorowych limfocytów CD8⁺. Podsumowując, wykazano że ścieżka sygnałna CD200R hamuje wzrost chemicznie-indukowanych guzów niezależnie od obecności CD200 na komórkach nowotworowych. Ta obserwacja może mieć znacznie w doborze populacji poddawanej potencjalnej terapii celującej w CD200R/CD200.

Publikacja 5 – “Antitumor Activity of TLR7 Is Potentiated by CD200R Antibody Leading to Changes in the Tumor Microenvironment.”

Kolejny mój projekt dotyczył terapii syngenicznych mysich nowotworów. Zastosowano doguzowe podawanie syntetycznego agonisty receptora TLR7 (R848). TLR7 jest normalnie aktywowany przez jednoniciowy RNA wirusowy, czego konsekwencją jest między innymi produkcja i wydzielanie IFNów typu I oraz aktywacja zapalna [17]. W terapii podanie R848 prowadziło do znaczącej redukcji wielkości mysiego nowotworu jelita (CT26). Co ciekawe stwierdzono, że lokalne (doguzowe) podawanie R848 powoduje obniżenie ekspresji CD200R, ale tylko w komórkach zrębu nowotworu. W śledzeniu i węzłach chłonnych brak było tego efektu. Analizując populacje komórek mikrośrodowiska nowotworu stwierdzono, że największy spadek CD200R jest obserwowany w populacji wewnątrznowotworowych makrofagów. Ekspresja CD200 była hamowana już na poziomie RNA, co udało się potwierdzić w hodowli makrofagów szpikowych. Stymulacja TLR4, TLR7 lub TLR9 prowadziła do bardzo znacznego spadku poziomu białka na tych komórkach. Następnie, połączono terapię R848 z agonistycznym przeciwciałem anti-CD200R. Terapia skojarzona doprowadziła do dalszego zmniejszenia wielkości nowotworów CT26, w porównaniu do wariantu z monoterapią R848. Podawanie samego przeciwciała anti-CD200R, lub przeciwciała kontrolnego, nie przynosiło istotnych zmian. Co istotne, u niektórych myszy leczonych R848 lub R848/anti-CD200R doszło do całkowitych wyleczeń, a wyleczone myszy były odporne na ponową implantację tego samego nowotworu. Dowodzi to, że u myszy wyleczonych nastąpił rozwój efektywnej przeciwnowotworowej odpowiedzi nabytej, zwieńczonej pamięcią immunologiczną. Jednakże początkowy efekt hamowania wielkości guza przez R848 nie był zależny od odpowiedzi nabytej, ponieważ u myszy z wrodzonym brakiem limfocytów, również następowało zahamowanie wzrostu guza przez R848, potęgowane przez kombinację z anti-CD200R. Zbadano wpływ R848 na wydzielanie cytokin zapalnych i stwierdzono zwiększone

wydzielanie IL-6, które było niezależne od podawania anty-CD200R. Bardzo wyraźny był natomiast wzrost odsetka monocytów we krwi obwodowej z ok. 15% do 70% wszystkich jednojądrzastych komórek po lokalnym podaniu R848. Analizując skład komórkowy mikrośrodowiska nowotworu, zaobserwowano bardzo znaczące zmniejszenie odsetka monocytów (Ly6C⁺MHC-II⁻) i nieodróżnicowanych komórek szpikowych Ly6C⁺MHC-II⁺, przy jednoczesnym wzroście odsetka bardziej dojrzałych makrofagów Ly6C⁻MHC-II⁻. Powyższe obserwacje, były najwyraźniejsze w wariancie terapii skojarzonej. W celu weryfikacji czy ww. komórki pochodzenia szpikowego (CD11b⁺) są odpowiedzialne za zahamowanie wzrostu nowotworu, wyizolowano populacje wewnątrzguzowych komórek szpikowych z guzów podanych monoterapii R848, kombinacji R848/anty-CD200R i kontrolnych. Następnie tak wysortowane komórki zostały przeszczepione do naiwnych biorców razem z komórkami nowotworowymi. Zaobserwowano, że po transferze komórkowym guzy rosły wolniej kiedy komórki szpikowe poddane zostały ww. terapii, a zwłaszcza kombinacji R848/anty-CD200R. Podobny trend zahamowania wzrostu guza zaobserwowano dokonując transferu makrofagów szpikowych stymulowanych *in vivo* R848/anty-CD200R. Podsumowując, stymulacja TLR7, a zwłaszcza w obecności anty-CD200R, powoduje zmianę w składzie komórkowym mikrośrodowiska nowotworu i zmniejszenie wielkości guza. Szpikowe komórki z mikrośrodowiska nowotworu są odpowiedzialne za przeciwnowotworowy efekt terapii celującej w TLR7 i CD200R.

Publikacja 6. – “The pro-tumor effect of CD200 expression is not mimicked by agonistic CD200R antibodies.”

Kolejna moja publikacja dotyczyła zastosowania przeciwciał anty-CD200R w leczeniu różnych nowotworów u myszy. Przetestowano działanie ww. przeciwciał w trzech modelach syngenicznych nowotworów (EMT6, LLC i B16F10). Analizując trzy typy nowotworów (sutka, płuc i czerniaka) nie zaobserwowano żadnego efektu przeciwnowotworowego anty-CD200R. Podawana dawka była wystarczająca by wyznakować komórki z receptorem CD200R w guzie (zmniejszenia dostępności białka CD200R dla znakowanego przeciwciała przed analizą cytometryczną). Podawanie anty-CD200R miało niewielki, choć istotny statystycznie, wpływ na skład populacji komórek szpikowych w mikrośrodowisku guza. Jednak efekt podawania anty-CD200R był odmienny w każdym z analizowanych nowotworów. Podawanie agonistycznego przeciwciała anty-CD200R w monoterapii nie spowodowało pozytywnych efektów. Aby zweryfikować efekt działania ścieżki sygnałnej CD200-CD200R sięgnięto po narzędzie genetyczne i kolejny raz wykorzystano myszy *Cd200^{-/-}* oraz dzięki kontrole z normalną ekspresją CD200.

Potwierdzono wcześniejsze obserwacje, że myszy *Cd200^{-/-}* mają zmniejszony wzrost podskórnie implantowanego czerniaka B16F10 [18]. Aby zbadać wpływ ilości i lokalizacji białka CD200, nadeksprimowano CD200 w komórkach B16F10 z dodatkową ekspresją lucyferazy. Komórki te były dożylnie podawane myszom *Cd200^{-/-}* i dzikim kontrolom. Rozwój czerniaka w ogniskach przerzutowych monitorowano za pomocą pomiaru luminescencji. Stwierdzono, że najmniejsze guzy występowały u myszy *Cd200^{-/-}* z B16F10-luc, nowotwory B16F10-luc-CD200 miały wyższy poziom luminescencji, który nie był istotnie różny od myszy dzikich z czerniakiem lub od wariantu bez dodatkowej ekspresji CD200. Podsumowując, całkowity brak ekspresji CD200, spowalnia wzrost mysiego syngenicznego czerniaka, jednak jakakolwiek ekspresja CD200, na komórkach nowotworu lub endogennych komórkach zrębu, będzie powodować szybszy wzrost nowotworu. Dodatkowa ekspresja ponad endogenne białko CD200 nie powoduje dalszego istotnego zwiększenia guza. Podawanie przeciwciała agonistycznego anti-CD200R jest niewystarczające aby spowodować zachowanie wzrostu nowotworu.

Publikacja 7. (artykuł przeglądowy) – “CD200R signaling in tumor tolerance and inflammation: A tricky balance.”

Po opublikowaniu pracy w *Oncogene* w 2012 (Rygiel et al. 2012) zostało skierowane do nas zaproszenie od edytora czasopisma „*Current Opinion in Immunology*”, w celu przeglądu i podsumowania wyników badań dotyczących działania ścieżki sygnałnej CD200-CD200R i jej potencjału terapeutycznego. Razem z Linde Meyaard dokonaliśmy tego analizy jeszcze w czasie kiedy trwało jedyne, jak do tej pory, badanie kliniczne (z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych) celujących w CD200. Badanie to miało na celu zablokowanie CD200 u pacjentów z przewlekłą białaczką B-komórkową. Przeciwciało blokujące CD200 miało uniemożliwić wzbudzenie CD200R i doprowadzić do zwiększonej aktywacji odpowiedzi odpornościowej przeciw komórkom nowotworu. Wyniki pokazały bezpieczeństwo ww. terapii, jednak badanie zostało przerwane na późniejszym etapie z uwagi na brak efektu terapeutycznego.

W omawianej publikacji przedyskutowaliśmy następujące zagadnienia:

- Model regulacji tolerancji immunologicznej przez ścieżkę CD200-CD200R
- Mechanizm bezpośredniego i pośredniego hamowania odpowiedzi przeciwnowotworowej przez CD200R
- Dwojaki efekt CD200-CD200R na rozwój nowotworu, a także jego zmianę w wypadku terapii blokującej

Podsumowanie i znaczenie.

Za najważniejsze osiągnięcia wynikające z badań przedstawionych w moim cyklu prac uważam:

1. Wykazanie, że CD200R kontroluje negatywne efekty adoptowanej odpowiedzi przeciwwirusowej, która może prowadzić do immunopatologii (*publikacja nr 1, Rygiel et al. 2009*).
2. Zaobserwowanie, że zarówno ścieżka sygnałna CD200-CD200R jak i różnice determinowane przez płeć wpływają na moc odpowiedzi przeciwwirusowej (*publikacja nr 4, Karnam et al. 2012*).
3. Stwierdzenie, że CD200R może bezpośrednio hamować ścieżkę sygnałną zależną od TLR7 (*publikacja nr 4, Karnam et al. 2012*).
4. Udowodnienie, że kolageny produkowane przez komórki nowotworowe są funkcjonalnymi agonistami LAIR-1, które mogą hamować odpowiedź cytotoksyczną komórek efektorowych (*publikacja nr 2, Rygiel et al. 2011*).
5. Wykazanie, że CD200 może hamować odpowiedź przeciwnowotworową niezależnie od tego czy CD200 jest obecny na komórkach nowotworowych (*publikacja nr 3, Rygiel et al. 2012*).
6. Stwierdzenie, że ścieżka sygnałna CD200-CD200R reguluje zdolność do indukcji tolerancji immunologicznej (*publikacja nr 3, Rygiel et al. 2012*).
7. Zaobserwowanie, że ścieżka sygnałna CD200-CD200R reguluje różnicowanie limfocytów T w komórki o aktywacji Th17 (*publikacja nr 3, Rygiel et al. 2012*).
8. Wykazanie, że stymulacja TLR7, w obecności anty-CD200R, powoduje zmniejszenie wielkości guza przez zmianę w składzie komórkowych mikrośrodowiska nowotworu (*publikacja nr 5, Pilch et al. 2018*).
9. Stwierdzenie, że efekt przeciwnowotworowej terapii celowanej (TLR7/CD200R) jest zależny od wewnątrznowotworowych komórek szpikowych (*publikacja nr 5, Pilch et al. 2018*).
10. Wykazanie w kilku modelach nowotworowych, że monoterapia przeciwciałami anty-CD200R nie wpływa na wielkość nowotworu (*publikacja nr 6, Pilch et al. 2019*).

Literatura

1. Chaplin DD. Overview of the Immune Response. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125: S3-23. doi:10.1016/j.jaci.2009.12.980
2. Mazarella L, Duso BA, Trapani D, Belli C, D'Amico P, Ferraro E, et al. The evolving landscape of “next-generation” immune checkpoint inhibitors: A review. *Eur J Cancer.* 2019;117: 14–31. doi:10.1016/j.ejca.2019.04.035
3. Thallinger C, Füreder T, Preusser M, Heller G, Müllauer L, Höller C, et al. Review of cancer treatment with immune checkpoint inhibitors : Current concepts, expectations, limitations and pitfalls. *Wien Klin Wochenschr.* 2018;130: 85–91. doi:10.1007/s00508-017-1285-9
4. Rygiel TP, Meyaard L. CD200R signaling in tumor tolerance and inflammation: A tricky balance. *Curr Opin Immunol.* 2012;24: 233–238. doi:10.1016/j.coi.2012.01.002
5. Vaine CA, Soberman RJ. The CD200-CD200R1 inhibitory signaling pathway: immune regulation and host-pathogen interactions. *Adv Immunol.* 2014;121: 191–211. doi:10.1016/B978-0-12-800100-4.00005-2
6. Hoek RM, Ruuls SR, Murphy CA, Wright GJ, Goddard R, Zurawski SM, et al. Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science.* 2000;290: 1768–1771.
7. Mukhopadhyay S, Plüddemann A, Hoe JC, Williams KJ, Varin A, Makepeace K, et al. Immune Inhibitory Ligand CD200 Induction by TLRs and NLRs Limits Macrophage Activation to Protect the Host from Meningococcal Septicemia. *Cell Host & Microbe.* 2010;8: 236–247. doi:10.1016/j.chom.2010.08.005
8. Karnam G, Rygiel TP, Raaben M, Grinwis GCM, Coenjaerts FE, Rensing ME, et al. CD200 receptor controls sex-specific TLR7 responses to viral infection. *PLoS Pathog.* 2012;8: e1002710. doi:10.1371/journal.ppat.1002710
9. Rygiel TP, Karnam G, Goverse G, van der Marel APJ, Greuter MJ, van Schaarenburg RA, et al. CD200-CD200R signaling suppresses anti-tumor responses independently of CD200 expression on the tumor. *Oncogene.* 2012;31: 2979–2988. doi:10.1038/onc.2011.477
10. Ngwa C, Liu F. CD200-CD200R signaling and diseases: a potential therapeutic target? *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 2019;11: 297–309.
11. Pilch Z, Tonecka K, Braniewska A, Sas Z, Skorzynski M, Boon L, et al. Antitumor Activity of TLR7 Is Potentiated by CD200R Antibody Leading to Changes in the Tumor Microenvironment. *Cancer Immunol Res.* 2018;6: 930–940. doi:10.1158/2326-6066.CIR-17-0454
12. Rygiel TP, Stolte EH, de Ruiter T, van de Weijer ML, Meyaard L. Tumor-expressed collagens can modulate immune cell function through the inhibitory collagen receptor LAIR-1. *Mol Immunol.* 2011;49: 402–406. doi:10.1016/j.molimm.2011.09.006

13. Xu S, Xu H, Wang W, Li S, Li H, Li T, et al. The role of collagen in cancer: from bench to bedside. *J Transl Med.* 2019;17: 309. doi:10.1186/s12967-019-2058-1
14. Cervantes-Barragán L, Kalinke U, Züst R, König M, Reizis B, López-Macías C, et al. Type I IFN-mediated protection of macrophages and dendritic cells secures control of murine coronavirus infection. *J Immunol.* 2009;182: 1099–1106. doi:10.4049/jimmunol.182.2.1099
15. Rygiel TP, Rijkers ESK, de Ruiter T, Stolte EH, van der Valk M, Rimmelzwaan GF, et al. Lack of CD200 enhances pathological T cell responses during influenza infection. *J Immunol.* 2009;183: 1990–1996. doi:10.4049/jimmunol.0900252
16. Lebbink RJ, de Ruiter T, Adelmeijer J, Brenkman AB, van Helvoort JM, Koch M, et al. Collagens are functional, high affinity ligands for the inhibitory immune receptor LAIR-1. *J Exp Med.* 2006;203: 1419–1425. doi:10.1084/jem.20052554
17. Chi H, Li C, Zhao FS, Zhang L, Ng TB, Jin G, et al. Anti-tumor Activity of Toll-Like Receptor 7 Agonists. *Front Pharmacol.* 2017;8. doi:10.3389/fphar.2017.00304
18. Talebian F, Liu J-Q, Liu Z, Khattabi M, He Y, Ganju R, et al. Melanoma cell expression of CD200 inhibits tumor formation and lung metastasis via inhibition of myeloid cell functions. *PLoS ONE.* 2012;7: e31442. doi:10.1371/journal.pone.0031442

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

Podczas studiów odbyłem półroczny staż (w ramach programu Erasmus) na Uniwersytecie Amsterdamskim. To dzięki temu doświadczeniu postanowiłem związać moją karierę zawodową z nauką. Bezpośrednio po zakończeniu studiów magisterskich na Uniwersytecie Warszawskim (rok 2002), rozpocząłem projekt doktorski w Netherlads Cancer Institute - jednym z dwóch najbardziej prestiżowych holenderskich instytutów badawczych. Mój projekt dotyczył roli białka Tiam1, aktywatora GTPazy Rac1, w nowotworzeniu i biologii komórki. Do roku 2007 pracowałem w NKI, a owocem tego okresu jest pięć publikacji naukowych w takich czasopismach jak Journal of Cell Biology, Journal of Biological Chemistry czy Journal of Cell Science. W roku 2009 uzyskałem tytuł doktora nauk medycznych na Uniwersytecie Amsterdamskim (UvA). W latach 2007-2011 pracowałem jako post-dock na Uniwersytecie Medycznym w Utrechcie. Zajmowałem się regulacją odpowiedzi odpornościowej podczas infekcji wirusowych i rozwoju nowotworów. Efektem tego okresu mojej kariery jest pięć publikacji w takich czasopismach jak: Journal of Immunology, Oncogene, PLOS Pathogens. Wtedy właśnie ukształtował się kierunek moich badań, który dominował w ostatnich latach po moim powrocie do Polski i rozpoczęciu niezależnej kariery naukowej. Wciąż utrzymuję aktywną współpracę z naukowcami z Holandii, która przekłada się na współautorstwo we wspólnych publikacjach.

Od 2012 pracuję w Zakładzie Immunologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, gdzie kieruję grupą badawczą która obecnie składa się z 1 post-doka, 2 doktorantów, technika oraz studenta. Udało mi się pozyskać pięć grantów naukowych (Homing Plus, luventusPlus, Sonata, Opus i TeamTech), na łączną kwotę ponad 6 mln PLN. Współpracujemy z wieloma polskimi i zagranicznymi jednostkami naukowymi i firmami biotechnologicznymi. Pierwszym moim grantem naukowym, który umożliwił mi powrót do Polski i założenie grupy badawczej, był Homing Plus, finansowany przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej, otrzymałem w 2012 roku. Od tego czasu rozpoczęłam samodzielną pracę naukową kierując grupą badawczą w Zakładzie Immunologii. Prowadzone przeze mnie badania były i są obecnie finansowane w ramach realizacji czterech grantów, których jestem kierownikiem (Homing Plus, Sonata, Opus i TeamTech).

Badania mojej grupy skupiają się wokół regulacji odpowiedzi odpornościowej i rozwoju nowych terapii przeciwnowotworowych. Badamy nie tylko działanie potencjał terapeutyczny receptorów hamujących. W jednym z projektów, badamy skład komórkowy i aktywacje komórek odpornościowych mikrośrodowiska nowotworu. Zmiana aktywacji patologicznie-zaktywowanych monocytów i makrofagów

może zahamować wzrost nowotworu i umożliwić rozwój adoptowanej odpowiedzi przeciwnowotworowej. Prozapalna aktywacja wewnątrznowotworowych komórek szpikowych jest celem mojego kolejnego projektu, gdzie ww. mechanizm jest badany jako strategia terapeutyczna. Kolejnym projektem, który prowadzę jest wykorzystanie makrofagów jako komórkowego nośnika leków przeciwnowotworowych. Podczas wzrostu nowotworów makrofagi aktywnie naciekają nowotwór i ten mechanizm wykorzystujemy aby zwiększyć dawkę związku aktywnego w guzie podając dożylnie makrofagi wypełnione białkami nośnikowymi związanymi z lekiem. W tkance nowotworowej następuje przekazywanie leku sąsiednim komórkom nowotworu. Powyższy projekt, TeamTech - finansowany przez FNP, jest realizowany w konsorcjum pomiędzy Warszawskim Uniwersytetem Medycznym i firmą Cellis.

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

Od rozpoczęcia pracy na WUM jestem czynnie zaangażowany w działalność dydaktyczną. Prowadzę seminaria oraz wykłady z immunologii ze studentami Wydziału Lekarskiego, oraz Wydziału Farmaceutycznego WUM. Bardzo ważnym aspektem mojej pracy jest promowanie młodych naukowców – studentów, doktorantów i młodych post-doków. Do tej pory, sprawowałem opiekę naukową nad czterema magistrantami (UW, WUM). Byłem także promotorem pomocniczym w dwóch przewodach doktorskich. Obecnie pełnię rolę promotora pomocniczego w przewodach doktorskich mgr Agaty Braniewskiej i mgr Zuzanny Sas. W ramach działalności popularyzatorskiej występowałem w Radio dla Ciebie i Jedynka Polskie Radio, udzieliłem też kilku wywiadów m.in. dla Pulsu Biznesu i portalu internetowego biotechnologia.pl.

7. Inne informacje, dotyczące kariery zawodowej wnioskodawcy.

W latach 2014-2020 byłem zapraszany do recenzji grantów oraz brałem udział w pracach panelów ekspertów: Narodowego Centrum Nauki (dwukrotnie, konkursy: Opus, Sonata, Preludium) i Fundacji na rzecz Nauki Polskiej, „Interdisciplinary Panel of Experts” – Program Team Tech. Ponadto byłem zapraszany do recenzowania publikacji oryginalnych w następujących czasopismach: PLOS Pathogens, Cancer Letter, Science Translational Medicine, The American Journal of Reproductive Immunology oraz Carcinogenesis.

W ostatnich latach brałem też udział w badaniach realizowanych we współpracy z dwoma polskimi firmami biotechnologicznymi: Oncoarendi i Selvita. Obydwie firmy realizują badania w programach immunoonkologicznych, w związku z czym poszukują współpracy w tym zakresie, zwłaszcza doradztwa merytorycznego oraz podwykonawstwa.

Od 2012 r, kiedy rozpocząłem pracę na WUM, moim celem było utworzenie zwierzętarni eksperymentalnej o podwyższonym standardzie czystości, gdzie można by prowadzić badania regulacji układu odpornościowego bez ryzyka niekontrolowanych infekcji patogennych lub komensalnych. Dzięki mojemu znacznemu zaangażowaniu, udało się nam w 2015 r. uruchomić zwierzętarnię o podwyższonym statusie czystości - SPF (ang. Specific Pathogen Free). Zainteresowanie eksperymentami *in vivo*, zwłaszcza onkologicznymi, wiąże łącznie i obecnie realizujemy rozbudowę ww. zwierzętarni i jej przekształcenia w niezależną jednostkę organizacyjną wewnątrz WUM.

Adiunkt w Zakładzie Immunologii
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Dr n. med. Tomasz Rygiel

.....

Podpis