



Ocena

**dorobku naukowego, dydaktycznego i organizacyjnego, oraz osiągnięcia naukowego
z tytułu pracy „Biochemiczne, strukturalne i komórkowe aspekty oddziaływania
przeciwciała 14G2a z gangliozydem GD2 i peptydami naśladującymi ten glikosfingolipid
w modelu neuroblastoma” dr Ireny Horwacik, w związku z postępowaniem o nadanie
stopnia doktora habilitowanego**

**Podstawowe informacje o kandydatce. Przebieg kariery naukowej, ogólna tematyka
badań, staże naukowe, uczestnictwo w projektach grantowych, nagrody.**

Habilitantka, dr Irena Horwacik, (nazwisko panięskie Kiszka), jest absolwentką Uniwersytetu Jagiellońskiego. Studia na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi (kierunek biologia, specjalność biologia molekularna) ukończyła z wyróżnieniem w 1998 roku. Pracę magisterską z tytułu „*Oddziaływanie jonu tris(2,2'-bipirydyna)-rutenu(II) z komórkami zwierzęcymi i roślinnymi*” wykonywała pod kierunkiem dr Jerzego Dobruckiego. W czasie studiów, w 1997 roku odbyła półroczny staż naukowy na Uniwersytecie w Manchester (Division of Cell Immunology and Development) finansowany ze stypendium UE w ramach programu TEMPUS. W czasie pobytu prowadziła badanie naukowe, które zaowocowały współautorstwem w pracy opublikowanej w 2000 roku w doskonałym czasopiśmie: „Biology of Reproduction” (IF = 3,6).

Tuż po ukończeniu studiów rozpoczęła studia doktoranckie (UJ), odbywając w czasie ich trwania dwa roczne staże naukowe w Filadelfii; pierwszy (1998-1999) w Thomas Jefferson University (Department of Microbiology and Immunology) i drugi (1999-2000) w Temple University (Center for Neurovirology and Cancer Biology). Oprócz wymienionych powyżej dr Irena Horwacik odbyła w późniejszym czasie (2007) półroczny staż naukowy w Giannina Gaslini Scientific Institute, (Laboratory of Oncology) w Genui w ramach projektu finansowanego z szóstego programu ramowego UE. Od rozpoczęcia studiów doktoranckich dr Irena Horwacik prowadziła - zarówno w ośrodkach zagranicznych jak i w jednostce macierzystej - badania z zakresu immunologii i biologii molekularnej nowotworów. Wyniki badań prowadzonych między innymi w czasie pobytu w placówkach uniwersyteckich w Filadelfii stały się podstawą rozprawy doktorskiej przygotowanej przez mgr Horwacik w języku angielskim z tytułu „*Approaches to broaden CTL responses and protection against challenge with recombinant vaccinia virus expressing homologous and heterologous HIV envelope glycoproteins by vaccination with DNA and viral vectors*”. Promotorem pracy była prof. dr hab. Hanna Rokita. Po obronie pracy doktorskiej w 2002 roku dr Irena Horwacik została zatrudniona na etacie asystenckim w macierzystym wydziale. Obecnie pracuje w Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii jako adiunkt.

CENTRUM ONKOLOGII – INSTYTUT IM. MARII SKŁODOWSKIEJ-CURIE ODDZIAŁ W GLIWICACH

44-101 GLIWICE, UL. WYBRZEŻE ARMII KRAJOWEJ 15

Centrala Tel.: +48 32 278 86 66

Dyrekcja Tel.: +48 32 278 96 18

E-mail: onkologia@io.gliwice.pl NIP: 5250008057

Centrala Fax: +48 32 231 35 12

Dyrekcja Fax: +48 32 230 78 07

Url: www.io.gliwice.pl

REGON: 000288366-00028

Łącznie z pracami wyodrębnionymi jako dzieło w postępowaniu habilitacyjnym, w dorobku publikacyjnym dr Ireny Horwacik znajduje się 21 (17 opublikowanych po doktoracie) pełnotekstowych, oryginalnych prac doświadczalnych. W 9 z nich jest pierwszym autorem. Większość (14 publikacji), to prace opublikowane w czasopismach anglojęzycznych uznawanych za renomowane, mających IF powyżej 3. Ponadto dr Irena Horwacik jest jedynym autorem dwóch prac przeglądowych opublikowanych w polskich czasopismach oraz pierwszym autorem (drugim jest prof. Hanna Rokita) pracy przeglądowej opublikowanej (na zaproszenie) w renomowanym czasopiśmie anglojęzycznym „Apoptosis” (IF = 3.6). Sumaryczny współczynnik wpływu czasopism, w których zostały opublikowane prace dr Ireny Horwacik wynosi około 70. Liczba cytowań (bez autocytowań) wynosiła w momencie składania wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego 299 (obecnie 312), a indeks Hirscha wynosi 9. W dorobku naukowym Habilitantki znajduje się także 18 ustnych wystąpień na zjazdach naukowych (w tym 8 na zaproszenie organizatorów), w większości wygłoszonych w języku angielskim. Wyniki badań, w których uczestniczyła dr Irena Horwacik prezentowane były także w postaci plakatów, których łączna liczba na zjazdach krajowych i zagranicznych wynosiła 46, w tym w 28 przypadkach było to uczestnictwo aktywne. Powyższe dane wskazują, że dorobek naukowy Habilitantki jest obszerny i wartościowy.

Za wysoką jakość prowadzonych badań, oraz osiągnięcia dydaktyczne dr Irena Horwacik była trzykrotnie uhonorowana nagrodą rektora UJ, a Fundacja na Rzecz Nauki Polskiej przyznała jej stypendium konferencyjne. W pozyskiwaniu funduszy na badania naukowe dr Irena Horwacik wykazała się dużą skutecznością. Oprócz wieloletniego grantu (finansowanego z MNiSW), którego była kierownikiem i głównym wykonawcą, kierowała także pięcioma projektami finansowanymi z funduszy Uniwersytetu. Była również głównym wykonawcą w kilku projektach finansowanych z funduszy krajowych (NCN, MNiSW i KBN), oraz w dużym projekcie finansowanym z funduszy UE w ramach 6 programu ramowego.

Tematyka prac badawczych wykonanych po doktoracie i niewchodzących w cykl prac będących podstawą postępowania habilitacyjnego.

Po zakończeniu przewodu doktorskiego badania dr Ireny Horwacik skupiały się przede wszystkim na tematyce dotyczącej immunoterapii nerwiaka zarodkowego (neuroblastoma). Jest to jeden z wiodących kierunków badawczych zespołu w którym pracuje Habilitantka. Oprócz prac będących postawą do habilitacji, i których jest pierwszym autorem, dr Irena Horwacik była współautorką sześciu innych publikacji poświęconych charakteryzowaniu oddziaływań, pomiędzy przeciwciałem anti-GD2, które oddziałując z gangliozydem GD2 obecnym w znacznej ilości na powierzchni komórek neuroblastomy indukuje procesy prowadzące do eliminacji komórek nowotworu.

Badania, w których uczestniczyła dr Irena Horwacik, były w ich początkowej fazie ukierunkowane na próbę wyodrębnienia z polipeptydowej biblioteki fagowej polipeptydów, o właściwościach immunogennych podobnych do właściwości gangliozydu GD2. Badania zaowocowały scharakteryzowaniem jednego peptydu (oznaczonego #47) o pożądanych cechach i reagującego z surowicą chorych na neuroblastomę. W wyniku modyfikacji sekwencji aminokwasów dokonanej na podstawie modelowania komputerowego uzyskano polipeptyd, który użyty do immunizacji myszy generował powstawanie przeciwciał IgG rozpoznających GD2 na powierzchni komórek neuroblastomy i czerniaka wywołując efekt cytotoksyczny zależny od komplementu (wyniki badań opublikowano w 2005 roku. *Cancer Research* 65, 3410-3418, IF = 7.6).

Jednym z ważnych z klinicznego punktu widzenia zagadnień w kontekście terapeutycznego stosowania przeciwciał any-GD2, było wyjaśnianie w jakim stopniu oddziaływanie przeciwciała z antygenem może indukować mechanizm eliminowania komórek

neuroblastomy bez angażowania układu immunologicznego. Świetnie zaprojektowane badania *in vitro* wykazały, że stosowane przeciwciało anti-GD2 jest szybko internalizowane po rozpoznaniu powierzchniowego antygeny na badanych komórkach neuroblastoma uruchamiając ścieżkę proapoptotyczną. Szczególnie ważnymi obserwacjami, które stały się podstawą do szerzej zakrojonych badań było wykazanie, że przeciwciało anti-GD2 hamuje oddziaływanie komórek neuroblastomy z fibronektyną, oraz, że wzmacnia cytotoksyczność niektórych cytostatyków stosowanych rutynowo w chemioterapii nowotworów (wyniki badań opublikowano w 2009 roku. *Cancer Letters* 281, 171-182; IF = 3,741).

Dr Horwacik uczestniczyła także w badaniach, których celem było opracowanie metody ilościowego oznaczania stężenia gangliozydu GD2 w surowicy chorych na neuroblastomę. Istotą pomysłu było zastosowanie metody HPLC do wykrywania produktów trawienia gangliozydów wyznakowanych fluorescencyjnie. W porównaniu z dotychczas stosowanymi metodami oznaczeń użycie wysokosprawnej chromatografii cieczerwowej umożliwiło wykrywanie GD2, (a także innych gangliozydów) obecnego w surowicy w stężeniach pikomolowych, przy pobraniu jedynie 40 µl próbki (wyniki badań opublikowano w 2009 roku. *Acta Biochimica Polonica* 56, 423-431; IF = 1,262).

Kolejne trzy prace poświęcono charakteryzowaniu zmianom aktywności proteomu i transkryptomu w komórkach neuroblastomy w odpowiedzi na przeciwciało anti-GD2. Badania macierzowe, zastosowane do analizy zmian aktywności licznych kinaz, skierowały uwagę badaczy na ścieżkę sygnałową PI3K/Akt/mTOR. Jak wykazano, badane przeciwciało hamowało aktywność niektórych elementów tej ścieżki, a efekt cytotoksyczny przeciwciała można było zwiększyć stosując dodatkowo inhibitory Akt, mTOR i PI3K. Badania mikromacierzowe zastosowano także do porównania zmian aktywności genów w komórkach neuroblastomy, w których efekt cytotoksyczny wywoływano działaniem bądź przeciwciała anti-GD2 bądź doksorubicyny. Analiza ontologiczna genów o zmienionej ekspresji wykazała, że w obu przypadkach modulacji ulegają geny związane ze znacząco różnymi procesami komórkowymi. Jedną z najważniejszych obserwacji było wykrycie, że pod wpływem przeciwciała anti-GD2 wzrasta poziom ekspresji genu *PHLDA1* kodującego białko wykazujące między innymi właściwości proapoptotyczne. W kolejnej pracy, w której badano efekt wytłumienia ekspresji genu *PHLDA1* w komórkach neuroblastomy metodą interferencji RNA potwierdzono proapoptotyczne właściwości badanego białka, zauważając także, że białko to może ograniczać powstawania autofagosomów. Wykazano także, że wytłumieniu ekspresji genu *PHLDA1* towarzyszy wzrost poziomu kinazy Aurora A, a więc zachodzi efekt przeciwny niż w komórkach traktowanych przeciwciałem anti-GD2. Omówione badania opublikowano w latach 2015 i 2016 w następujących czasopismach: *International Journal of Oncology*, 47, 1143-1159, IF = 3,018; *International Journal of Oncology*, 49, 823-837, IF = 3,079; *Acta Biochimica Polonica*, 62, 423-433, IF = 1,187). Udział w publikacjach niewchodzących w cykl prac będących podstawą postępowania habilitacyjnego, a dotyczących immunoterapii neuroblastomy habilitantka ocenia na 30-60%, poza jedną w której deklarowany udział wyniósł 5%. Szereg obserwacji opisanych w omawianych powyżej pracach stało się przesłankami do podjęcia przez dr Irenę Horwacik poszerzonych badań, których wyniki zostały przedstawione jako osiągnięcie naukowe uprawniające do wszczęcia postępowania habilitacyjnego.

Oprócz prac koncentrujących się na powyższej tematyce dr Irena Horwacik uczestniczyła także w badaniach właściwości białka kodowanego przez gen *MCPIP1*. Charakteryzowanie właściwości tego wielofunkcyjnego białka o ważnej roli regulacyjnej w procesie zapalnym jest także jednym z wiodących kierunków badawczych Zakładu, w którym pracuje Habilitantka. W szczególności badania, w których uczestniczyła dotyczyły charakteryzowania czynników regulujących ekspresję genu, oraz oceny stopnia ekspresji genu w komórkach neuroblastomy. Szczególnie ważnymi wynikami tych badań było wykazanie, że

wymuszony wzrost poziomu białka MCIP1 może wpływać negatywnie na przeżywalność i proliferację komórek neuroblastomy. Badania dotyczące MCPIP1 przedstawiono w trzech publikacjach, a swój udział tych pracach dr Irena Horwacik szacuje na około 10%. Dr Irena Horwacik uczestniczyła także w kilku innych projektach badawczych, które ze względu na brak lub nieznaczne powiązanie z problematyką biologii komórek neuroblastomy oraz immunoterapii tego nowotwory, nie będą tu omawiane.

Podsumowanie i ocena najważniejszych wyników badań przedstawionych w cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowego.

Osiągnięcie naukowe zatytułowane „*Biochemiczne, strukturalne i komórkowe aspekty oddziaływania przeciwciała 14G2a z gangliozydem GD2 i peptydami naśladującymi ten glikosfingolipid w modelu neuroblastooma*” przedstawione przez dr Irenę Horwacik jako podstawa do ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego, to pięć pełnotekstowych, oryginalnych prac doświadczalnych oraz jedna praca przeglądowa ściśle powiązanych tematycznie. Prace ukazały się drukiem, po uzyskaniu przez Habilitantkę stopnia doktora, w czasopismach o znaczącym współczynniku oddziaływania (*Int. J. Mol. Med.*, IF = 1,847 (dwie prace); *Mol. Cell Proteomics*, IF = 5,912; *Cancer Lett.*, IF = 5,016; *Int. J. Oncol.*, IF = 3,079; *Apoptosis*, 3,592]. We wszystkich publikacjach Habilitantka jest pierwszym autorem, ponadto, w pięciu jest autorem korespondencyjnym. Załączona dokumentacja zawiera deklaracje Habilitantki o procentowym udziale w przygotowaniu każdej publikacji, który w odniesieniu do cyklu publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego oznaczonych numerami 1-6 wynosił odpowiednio 75%, 80%, 55%, 45%, 95%, 95%. Deklaracje zawierają bardzo szczegółowe dane dotyczące udziału Habilitantki w opracowaniu koncepcji pracy, wykonywaniu badań, zastosowanych metod badawczych, przygotowywaniu manuskryptu etc. i nie stoją w sprzeczności z deklarowanym udziałem wyrażonym w oświadczeniach współautorów. Dane zawarte w oświadczeniach nie pozostawiają wątpliwości, że udział dr Ireny Horwacik w przygotowaniu cyklu publikacji stanowiącego osiągnięcie naukowe był wiodący. Wymieniony cykl publikacji przedstawia wyniki badań oddziaływań molekularnych gangliozydu GD2, oraz polipeptydów imitujących GD2 z przeciwciałami anti-GD2 mającymi lub mogącymi mieć znaczenie w terapii tego nowotworu. Poniżej zamieszczam skrótowy opis wyników badań Habilitantki podkreślając najważniejsze obserwacje mające walor nowości i wysoką wartość naukową.

Praca #1. [Horwacik I, Czaplicki D, Talarek K, Kowalczyk A, Bolesta E, Kozbor D, Rokita H. (2007). *Selection of novel peptide mimics of the GD2 ganglioside from a constrained phage-displayed peptide library. Int. J. Mol. Med.* 19, 829-839; IF = 1,847]

Celem badań opublikowanych w najwcześniejszej pracy z załączonego cyklu było otrzymanie peptydów o właściwościach immunogennych zbliżonych do gangliozydu GD2, zatem rozpoznawanych przez przeciwciało anti-GD2 (konkretnie 14G2a). Posługując się metodą ekspresji 12-aminokwasowych peptydów w bibliotece fagowej i wykonaniu selekcji uzyskano wyodrębniono fagi eksprymujące 5 peptydów o oczekiwanych właściwościach, a mianowicie dostatecznie silnie wiązanych przez przeciwciało anti-GD2. Ustalono sekwencję aa badanych polipeptydów, wykazując, że są one znacząco odmienne, oraz udowodniono, że czynnikiem kluczowym dla wydajnego oddziaływania z przeciwciałem jest usztywnienie ich struktury poprzez mostek disiarczkowego tworzony pomiędzy resztami cysteiny znajdującymi się w przewidywanych przy projektowaniu peptydów pozycjach. Ponieważ otrzymane peptydy konkurowały z GD2 o miejsce wiązania z przeciwciałem anti-GD2 (14G2a), zatem wykazano, że są one w istocie peptydami imitującymi ten gangliozyd. Tym samym wykazano, że otrzymane peptydy mogą być, o ile okażą się dostatecznie i swoiście immunogenne,

wykorzystane do otrzymywania nowych przeciwciał anti-GD2, być może o zwiększonej skuteczności terapeutycznej i zmniejszonej toksyczności ogólnej.

Praca #2. Horwacik I, Kurciński M, Bzowska M, Kowalczyk AK, Czaplicki D, Koliński A, Rokita H. (2011). *Analysis and optimization of interactions between peptides mimicking the GD2 ganglioside and the monoclonal antibody 14G2a. Int. J. Mol. Med.* 28, 47-57. IF = 1,573]

Naturalnym następstwem badań opisanych powyższej, było ustalenie czy gangliozyd GD2 i peptydy imitujące GD2 oddziałują z tym samym miejscem na cząsteczce przeciwciała anti-GD2. Tym zagadnieniom poświęcona jest druga praca z załączonego cyklu. Stosując metody biochemiczne i modelowanie sprecyzowano miejsca oddziaływania wszystkich badanych peptydów z paratopem przeciwciała anti-GD2. Poczyniono także interesująca obserwacja, a mianowicie, że wydłużenie peptydów poprzez dodanie do końca karboksylowego 5-aa sekwencji pochodzącej z białka otoczki wirusa wzmacnia wiązanie zmodyfikowanych peptydów z badanym przeciwciałem. W przypadku wybranego peptydu (oznaczonego #94) wykonano szereg jego wariantów strukturalnych (*site-specific mutagenesis*) i łącznie z badaniami funkcjonalnymi zidentyfikowano aminokwasy konieczne do efektywnego wiązania tego peptydu z przeciwciałem. Wyniki badań mają nadzwyczaj ważne znaczenie dla wyszukiwania w peptydowych bibliotekach fagowych immunogennych peptydów imitujących gangliozyd GD2, które będąc silniej immunogenne niż GD2 mogłyby być wykorzystane do generowania nowego, klinicznie użytecznego panelu przeciwciał anti-GD2.

Praca #3. Horwacik I, Golik P, Grudnik P, Kolinski M, Zdzalik M, Rokita H, Dubin G. (2015). *Structural basis of GD2 ganglioside and mimetic peptide recognition by 14G2a antibody. Mol. Cell Proteomics* 14, 2577-2590; IF = 5,912.

W trzeciej pracy cyklu, wysoce zaawansowanej metodycznie pracy analitycznej, opisano wyniki badań krystalograficznych, których celem było ustalenie na poziomie atomowym mechanizmu rozpoznawania antygenów przez przeciwciała anti-GD2. Aby wykonać badanie wykryto kompleksy fragmentów Fab-14G2a z dwoma peptydami wyodrębnionymi z biblioteki fagowej (wydłużonymi poprzez dodanie do końca karboksylowego 5aa sekwencji pochodzącej z białka otoczki wirusa) oraz z fragmentem oligosacharydowym gangliozydu GD2. Kryształy poddano analizie rentgenowskiej i wykazano, że istnieją zasadnicze różnice w mechanizmie oddziaływania paratopu przeciwciała z antygenami peptydowymi i antygenem oligosacharydowym. W przypadku fragmentu cukrowego dochodzi do znacznej zmiany w strukturze przestrzennej paratopu (mechanizm indukowanego dopasowywania się), natomiast rozpoznanie pomiędzy peptydami i ich miejscem wiązania na przeciwciele anti GD2 ma cechy oddziaływania na zasadzie „klucz-zamek”. Druga strategia analityczna zastosowana w pracy to zbadanie oddziaływań pomiędzy rekombinowanymi, otrzymywanymi w systemie bakteryjnym fragmentów scFv przeciwciała 14D2a, oraz jego wariantów mutacyjnych z oczyszczonym gangliozydem GD2. Badania te doprowadziły do wskazania zamian aminokwasowych zwiększających siłę oddziaływań pomiędzy ligandem i przeciwciałem, oraz wskazanie na poziomie molekularnym istoty mimikry molekularnej pozwalającej rozpoznawać przez przeciwciała anti-GD2 peptydy i reszty wielocukrowe, jako zamienniki, co może mieć nadzwyczaj ważne konsekwencje dla projektowania przeciwciał użytecznych klinicznie.

Praca #4. Horwacik I, Durbas M, Boratyn E., Węgrzyn P., Rokita H. (2013). *Targeting GD2 ganglioside and aurora A kinase as a dual strategy leading to cell death in cultures of human neuroblastoma cells. Cancer Lett.* 341, 248-264. IF =5,016.

Czwarta praca w załączonym cyklu poświęcona jest badaniu mechanizmu cytotoksycznego działania przeciwciała anti-GD2 w odniesieniu do komórek neuroblastomy. Habilitantka prowadziła badania na panelu linii neuroblastoma i czerniaka charakteryzujących

się zróżnicowanym poziomem ekspresji GD2. Wiadomo, że przeciwciała anti-GD2 mogą indukować śmierć komórek neuroblastomy poprzez aktywację ADCC (*antibody-dependent cell cytotoxicity*), aktywację ścieżki dopełniacza bądź indukując bezpośrednio sygnał proapoptotyczny. Jak wykazała Habilitantka, w wybranym układzie doświadczalnym indukowanie procesu prowadzącego do śmierci komórek neuroblastomy przez przeciwciała anti-GD2 zachodziło bez angażowania układu immunologicznego. Wykazała ponadto, że przeciwciała anti-GD2 powoduje obniżenie poziomu kinazy Aurora A nie wpływając na gęstość powierzchniowego rozmieszczenia gangliozydu GD2. Obserwacja ta sugerowała, że możliwe jest zwiększanie efektu terapeutycznego poprzez zastosowanie leczenia skojarzonego, a mianowicie użycie przeciwciała anti-GD2 wraz z inhibitorem kinazy Aurora A. Koncepcja ta znalazła doświadczalne potwierdzenie poprzez wykazanie, że zaproponowana strategia wywołuje synergistyczny efekt cytotoksyczny w stosunku do komórek neuroblastomy.

Praca #5. Horwacik I, Rokita H. (2017). *Modulation of interactions of neuroblastoma cell lines with extracellular matrix proteins affects their sensitivity to treatment with the anti-GD2 ganglioside antibody 14G2a. Int. J. Oncol.* 50, 1899-1914.

Badania opisane w piątej pracy cyklu inspirowane były wcześniejszymi obserwacjami wskazującymi, że wielkość efektu cytotoksycznego przeciwciała anti-GD2 wobec komórek neuroblastomy może być modulowany poprzez sygnały przenoszone w wyniku oddziaływania integryn znajdujących się w błonie komórek neuroblastomy z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej. W celu głębszego poznania tego efektu habilitantka prowadziła badania na kilku liniach neuroblastomy różniących się wrażliwością na działanie przeciwciała anti-GD2 oraz różniących się poziomem ekspresji powierzchniowej wybranych integryn $\alpha 4$, $\beta 1$, $\alpha V\beta 3$ i $\alpha V\beta 5$. Stosując swoiste inhibitory integryn wykazała, że zmniejszanie stopnia adhezji komórek neuroblastomy do białek macierzy zewnątrzkomórkowej, takich jak fibronektyna czy kolagen typu IV, może zwiększać efektywność terapeutyczną przeciwciała 14G2a, w wyniku nasilania sygnału proapoptotycznego. Badania wykazały zatem, że możliwe jest poszerzenie panelu czynników zwiększających efektywność leczenia neuroblastomy.

Praca #6. Horwacik I, Rokita H. (2015). *Targeting of tumor-associated gangliosides with antibodies affects signaling pathways and leads to cell death including apoptosis. Apoptosis.* 20, 679-688.

Publikacja jest artykułem przeglądowym opisującym właściwości gangliozydów, w szczególności ich rolę w procesie nowotworzenia. Praca zawiera obszerne dane o zastosowaniu przeciwciał rozpoznających gangliozydy w terapii przeciwnowotworowej w przypadkach gdy gęstość tych związków na powierzchni komórek nowotworowych jest znaczna. W pracy zamieszczone są także odniesienia do badań własnych habilitantki. Lektura pracy pozwala na głębsze zrozumienie istoty i celu badań opisanych w cyklu publikacji doświadczalnych przedstawionych jako osiągnięcie naukowe w związku z postępowaniem habilitacyjnym

Osiągnięcia dydaktyczne i organizacyjne, udział w projektach badawczych. Ocena działalności dydaktycznej i organizacyjnej

Z racji zatrudnienia na Uniwersytecie, do podstawowych obowiązków dr Ireny Horwacik, oprócz uczestniczenia w badaniach naukowych, należało i nadal należy działalność dydaktyczna. W ramach tej działalności prowadziła i nadal prowadzi szereg wykładów, seminariów, ćwiczeń i konwersatoriów (niektóre w języku angielskim), których tematyka obejmuje biochemię, wirusologię, biologię molekularną (w tym biologię molekularną nowotworów), genetykę molekularną, oraz inżynierię genetyczną. Oprócz wykładów dla studentów UJ dr Irena Horwacik prowadziła wykłady dla studentów uczestniczących w kursach organizowanych w Paryżu w ramach współpracy pomiędzy Wydziałem Biotechnologii UJ i

paryskimi instytucjami uniwersyteckimi. Do aktywności dydaktycznej należy zaliczyć także okresowe prowadzenie wykładów dla szkół, dla słuchaczy studiów podyplomowych, oraz dla zainteresowanych gości w czasie wydziałowych dni otwartych. Dr Irena Horwacik opiekowała się 6 studentami przygotowującymi prace licencjackie, 4 studentami wykonującymi pracę magisterską, a także studentami zagranicznymi. Dwukrotnie powierzono Jej także funkcję promotora pomocniczego w przewodach doktorskich. Do aktywności dydaktyczno-organizacyjnej należy zaliczyć także uczestniczenie dr Ireny Horwacik w zespole rekrutującym studentów do projektu HOMING, w opracowywaniu procedur BHP dotyczących pracy z materiałem biologicznym, oraz współuczestniczenie w opracowywaniu treści zajęć z języka angielskiego dla studentów biotechnologii. W kadencji 2005-2008 była członkiem senatu. Jak już wspominałem powyżej dr Irenę Horwacik cechuje duża skuteczność w pozyskiwaniu środków finansowych na badania naukowe.

Podsumowanie najważniejszych wyników badań przedstawionych w publikacjach stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego.

W celu pełniejszej oceny wartości pracy habilitacyjnej dr Ireny Horwacik istotne jest krótkie przedstawienie podstawowych informacji o problemach związanych z leczeniem nerwiaka zarodkowego. Neuroblastoma, jest najczęstszym pozaczaszkowym guzem litym u dzieci; 90% przypadków tego nowotworu diagnozowanych jest do 5 roku życia. Umiejscowienie guzów może być różnorodne, a obraz kliniczny choroby złożony. Schemat leczenia zależy od szeregu czynników, głównie od zaawansowania *choroby* (ang. *staging*), oraz cech biologicznych guza i rutynowo obejmuje standardowe dla onkologii metody, jak chirurgia, chemioterapia wielolekowa i radioterapia, a w stadiach zaawansowanych kompleksowe leczenie skojarzone. W przypadkach o najwyższym stopniu ryzyka (stan ten w momencie diagnozy dotyczy 50-60% chorych) rokowania są złe, a stosowanie standardowych protokołów terapeutycznych mało skuteczne, dając szansę na 5 letnie przeżycie jedynie około 40-20% (w zależności od opracowania) dzieci obciążonych tym nowotworem. Nadzieja na zwiększenie skuteczności leczenia pojawiła się wraz z opracowaniem przeciwciał swoiście rozpoznających obecny na komórkach neuroblastomy gangliozyd GD2. Według danych z 2017 roku przeciwciało anti-GD2 pod nazwą Dinutuximab zostało dopuszczone do obrotu na terenie Ameryki Północnej, a przeciwciało oznaczone Dinutuximab-beta na terenie UE. Ponadto kilka przeciwciał znajduje się w I lub II fazie badań klinicznych. Problem jaki aktualnie ujawnił się i prawdopodobnie będzie narastał, to niedostateczna produkcja przeciwciał, co uniemożliwia dostęp do leku wszystkim potrzebującym. Ponadto, mimo iż immunoterapia dinutuximabem znacząco zwiększa wyleczalność, to leczeniu towarzyszą bardzo poważne reakcje uboczne. Stąd też istnieje konieczność uzyskiwania nowych przeciwciał anti-GD2 z nadzieją wyselekcjonowania leku o wysokiej skuteczności i niskiej toksyczności systemowej.

Powyższe uwagi, mam nadzieję, bardzo wyraźnie podkreślają celowość i wagę prowadzonych przez Habilitantkę badań, których wyniki przedstawiła jako osiągnięcie we wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego. Kończąc ocenę, chciałbym jeszcze raz podkreślić najważniejsze wyniki prac Habilitantki, a mianowicie:

- Opracowanie procedur przesiewania peptydowych bibliotek fagowych w celu uzyskiwania peptydów imitujących gangliozyd GD2 w tym znaczeniu, że mogą one konkurować z GD2 o miejsce wiązania z przeciwciałem anti-GD2.
- Zastosowanie modelowania komputerowego w celu wypracowanie strategii modulowania immunogenności polipeptydów imitujących gangliozyd GD2 oraz ustalenie podstawowych cech strukturalnych polipeptydów imitujących gangliozyd

- GD2 warunkujących ich skuteczne zastosowanie do otrzymywania nowych przeciwciał oddziałujących z gangliozydem GD2.
- Wykazanie, że oddziaływania przeciwciała anti-GD-2 z glikanem cząsteczki gangliozydu GD2 i z polipeptydami imitującymi GD2, zachodzą poprzez odmienny mechanizm. W przypadku fragmentu cukrowego funkcjonuje tu mechanizm indukowanego dopasowywania się regionów oddziaływania, natomiast rozpoznanie pomiędzy peptydami i ich miejscem wiązania na przeciwciele anti-GD2 ma cechy oddziaływania na zasadzie „klucz-zamek”.
 - Szczegółowe scharakteryzowanie niezależnego od układu immunologicznego mechanizmu eliminowania komórek neuroblastomy przez badane przeciwciała anti-GD2. Prowadząc rozległe badania molekularne habilitantka wykazała, że rozpoznanie antygeny przez przeciwciała anti-GD2 indukuje proces apoptozy. Wykazała jednocześnie, że skuteczność eliminowania komórek neuroblastomy przez przeciwciała można zwiększyć poprzez jednoczesne stosowanie czynników farmakologicznych blokujących np. aktywność kinazy Aurora A lub zmniejszających stopień adhezji komórek neuroblastomy do białek macierzy zewnątrzkomórkowej.

Wyniki badań przedstawione przez dr Horwacik, mają moim zdaniem wysoką wartość merytoryczną i mogą być przydatne do otrzymywania przeciwciał terapeutycznych o zwiększonej skuteczności i mniejszej toksyczności systemowej niż stosowane dotychczas w leczeniu neuroblastomy. Mogą także przyczynić się do opracowania nowych strategii skojarzonego leczenia tego nowotworu. Oryginalność i wysoka merytoryczna jakość badań prowadzone przez Habilitantkę plasują Ją, wraz z zespołem z którym współpracuje, w gronie rozpoznawalnych, najbardziej metodycznie zaawansowanych badaczy o międzynarodowej renomie i najpoważniejszych osiągnięciach w zakresie badań biologii nerwiaka zarodkowego, o czym świadczą także przedstawione powyżej dane bibliometryczne.

Na podstawie analizy dotychczasowej działalności naukowej, dydaktycznej i organizacyjnej Habilitantki wyrażam przekonanie, że jest Ona wysoce kompetentnym, w pełni ukształtowanym samodzielnym i dojrzałym pracownikiem nauki, potrafiącym nie tylko trafnie formułować cele badawcze i samodzielnie prowadzić badania naukowe, ale także zdobywać fundusze na działalność badawczą oraz organizować współpracę krajową i międzynarodową. Głęboka wiedza w zakresie Swojej specjalności oraz znajomość licznych, w tym wysoce specjalistycznych metod badawczych, bez wątpienia czyni z dr Ireny Horwacik pracownika nauki, który może także kompetentnie i z pasją kształtować wiedzę studentów poprzez rozmaite formy działalności dydaktycznej. Podsumowując ocenę, wyrażam przekonanie, że dr Irena Horwacik spełnia wymagania stawiane ubiegającym się o nadanie stopnia doktora habilitowanego. Jednocześnie jestem przekonany, że kariera naukowa dr Ireny Horwacik, już jako formalnie samodzielnego pracownika nauki, będzie rozwijać się równie błyskotliwie jak dotychczas.

Gliwice, 9 marca 2018 roku.


Prof. dr hab. Zdzisław Krawczyk