Załącznik 2a

Dr Irena Horwacik
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytet Jagielloński

Autoreferat - opis dorobku i osiągnięć naukowych

Kraków, 2017

1. Imię i nazwisko: Irena Horwacik (z domu Kiszka)

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

13.12.2002 **Stopień naukowy doktora nauk biologicznych, w zakresie biochemii**
Dyplom z Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, z Wydziału Biotechnologii, stopień nadany uchwałą Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii z dnia 17.09.2002 **(z wyróżnieniem)**
Tytuł rozprawy doktorskiej: 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.
Promotor pracy: prof. dr. hab Hanna Rokita
Recenzenci: prof. dr hab. Andrzej Mackiewicz, prof. dr hab. Stanisław Szala

15.06.1998 **Tytuł zawodowy magistra biologii, studia wyższe magisterskie na kierunku biologia, w zakresie biologii molekularnej**
Dyplom ukończenia studiów z Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, z Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi **(z wyróżnieniem)**
Tytuł pracy magisterskiej: Oddziaływanie jonu tris (2,2'-bipirydyna) rutenu (II) z komórkami zwierzęcymi i roślinnymi.
Promotor pracy: dr Jerzy Dobrucki
Recenzenci: prof. dr hab. Zygmunt Wasylewski, prof. dr hab. Stanisław Łukiewicz

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

Obecnie (od 2008) Adiunkt na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ (WBBiB UJ) w Pracowni Genetyki Molekularnej i Wirusologii (PGMiW), Kraków

2002-2008 Asystent na Wydziale Biotechnologii / Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ, w PGMiW, Kraków

1999-2000 Research Scholar, Center for Neurovirology and Cancer Biology, Temple University, Filadelfia, USA

1998-1999 Research Scholar, Department of Microbiology and Immunology, Thomas Jefferson University, Filadelfia, USA

1996-1997 Technik w Zakładzie Biofizyki Instytutu Biologii Molekularnej, Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UJ, 1/2 etatu, Kraków

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311)

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

„Biochemiczne, strukturalne i komórkowe aspekty oddziaływania przeciwciała 14G2a z gangliozydem GD2 i peptydami naśladującymi ten glikosfingolipid w modelu neuroblastoma".

4.2. Autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa

Publikacja 1:
Horwacik I[#], Czaplicki D, Talarek K, Kowalczyk A, Bolesta E, Kozbor D, Rokita H. Selection of novel peptide mimics of the GD2 ganglioside from a constrained phage-displayed peptide library. International Journal of Molecular Medicine, 2007, numer 19(5), strony: 829-839, Spandidos Publications Ltd.
[#]autor korespondencyjny
$IF_{2007} = 1,847$
Punktacja $MNiSW_{2016} = 20$
Liczba cytowań = 5 (w tym 1 autocytacja)

Publikacja 2:
Horwacik I[#], Kurciński M, Bzowska M, Kowalczyk AK, Czaplicki D, Koliński A, Rokita H. Analysis and optimization of interactions between peptides mimicking the GD2 ganglioside and the monoclonal antibody 14G2a. International Journal of Molecular Medicine, **2011**, numer 28(1), strony: 47-57, doi: 10.3892/ijmm.2011.655, Spandidos Publications Ltd.
[#]autor korespondencyjny
$IF_{2011} = 1,573$
Punktacja $MNiSW_{2016} = 20$
Liczba cytowań = 9 (w tym 2 autocytacje)

Publikacja 3:
Horwacik I[#], Golik P, Grudnik P, Koliński M, Zdzalik M, Rokita H, Dubin G. Structural basis of GD2 ganglioside and mimetic peptide recognition by 14G2a antibody. Molecular & Cellular Proteomics, **2015**, numer 14(10), strony: 2577-2590, doi: 10.1074/mcp.M115.052720, The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.
[#]autor korespondencyjny
$IF_{2015} = 5,912$
Punktacja $MNiSW_{2016} = 40$
Liczba cytowań = 5 (w tym 1 autocytacja)

Publikacja 4:
Horwacik I, Durbas M, Boratyn E, Węgrzyn P, Rokita H. Targeting GD2 ganglioside and aurora A kinase as a dual strategy leading to cell death in cultures of human neuroblastoma cells. Cancer Letters, **2013**, numer 341(2), strony: 248-264, doi: 10.1016/j.canlet.2013.08.018, Elsevier Ireland, Ltd.

IF_{2013} = 5,016
Punktacja $MNiSW_{2016}$ = 35
Liczba cytowań = 15 (w tym 8 autocytacji)

Publikacja 5: √
Horwacik I[#], Rokita H. Modulation of interactions of neuroblastoma cell lines with extracellular matrix proteins affects their sensitivity to treatment with the anti-GD2 ganglioside antibody 14G2a. International Journal of Oncology, **2017**, numer 50(5), strony: 1899-1914. doi: 10.3892/ijo.2017.3959, Spandidos Publications Ltd.
[#]autor korespondencyjny
IF_{2016} = 3,079
Punktacja $MNiSW_{2016}$ = 25
Liczba cytowań = 0

Publikacja 6: √
Horwacik I[#], Rokita H. Targeting of tumor-associated gangliosides with antibodies affects signaling pathways and leads to cell death including apoptosis. Apoptosis, **2015**, numer 20(5), strony: 679-688, doi: 10.1007/s10495-015-1103-7, Springer Science+Business Media New York.
[#]autor korespondencyjny
IF_{2015} = 3,592
Punktacja $MNiSW_{2016}$ = 30
Liczba cytowań = 6 (w tym 2 autocytacje)

Wartości współczynników oddziaływania (IF, *ang.* impact factor) dla czasopism, w których ukazały się artykuły z moim współautorstwem omówione w autoreferacie, podałam za bazą Journal of Citation Reports (JCR) - dla roku, w którym się one ukazały lub dla roku 2016 r. w przypadku artykułów opublikowanych w 2017 r., gdyż dane za obecny rok nie są jeszcze dostępne. Liczba punktów Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w 2016 r. ($MNiSW_{2016}$) dla tych czasopism została podana na podstawie załączników do komunikatu MNiSW z dnia 9.12.2016 (http://www.nauka.gov.pl/aktualnosci-ministerstwo/najnowsza-lista-punktowanych-czasopism-na-2016-rok.html). Liczbę cytowań dla wspomnianych w autoreferacie publikacji, których jestem współautorem, podałam za Web of Science (odczytane 3.10.2017, **AUTHOR:** Horwacik I *OR* **AUTHOR:** Kiszka I).

W sumie IF dla czasopism, w których zostały opublikowane wyżej wymienione **publikacje 1 - 6** wynosi **21,019**. Sumaryczna liczba punktów $MNiSW_{2016}$ dla tych czasopism wynosi **170**. Sumaryczna liczba cytacji dla tych publikacji wynosi **40** (w tym 14 autocytacji).

Oświadczenia o moim indywidualnym wkładzie w powstanie tych publikacji znajdują się w Załączniku 3. Oświadczenia pozostałych współautorów wyżej wymienionych **publikacji 1-6**, określające indywidualny wkład każdego z nich w ich powstanie, znajdują się w Załączniku 4 (co najmniej czterech w przypadku publikacji, które mają więcej niż pięciu

współautorów). **Publikacje 1-6** wyróżniono w poniższym tekście autoreferatu pogrubioną czcionką.

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

4.3.1. Cel badań

Od roku akademickiego 2002/2003 prowadzę badania naukowe i zajęcia dydaktyczne, najpierw jako asystent, a obecnie jako adiunkt w Pracowni Genetyki Molekularnej i Wirusologii na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. W tym okresie moje zainteresowania naukowe skupiały się głównie na analizie wybranych aspektów oddziaływania antygen-przeciwciało, z wykorzystaniem mysiego monoklonalnego przeciwciała 14G2a, które wiąże gangliozyd GD2 (GD2). Ten antygen glikosfingolipidowy jest markerem nowotworu dziecięcego neuroblastoma i ważnym celem w leczeniu tej choroby. Powyższe badania prowadzone były z wykorzystaniem modeli *in vitro* - ludzkich linii komórkowych neuroblastoma. **Spośród szeregu anglojęzycznych publikacji z tej tematyki, których jestem współautorem, utworzyłam cykl 6 publikacji powiązanych tematycznie i stanowiących osiągnięcie naukowe przedstawione do oceny w moim postępowaniu habilitacyjnym. Cykl ten składa się z 5 publikacji doświadczalnych i 1 publikacji przeglądowej, przedstawionych pod wspólnym tytułem: „Biochemiczne, strukturalne i komórkowe aspekty oddziaływania przeciwciała 14G2a z gangliozydem GD2 i peptydami naśladującymi ten glikosfingolipid w modelu neuroblastoma". W tych wszystkich publikacjach jestem pierwszym autorem, w większości z nich także autorem korespondencyjnym, co potwierdza moją wiodącą i kluczową rolę w ich powstaniu.**

Głównymi celami naukowymi prac zaliczonych do osiągnięcia były:

1. Izolacja peptydów wiążących przeciwciało 14G2a z wykorzystaniem bakteriofagowej biblioteki LX-8, prezentującej 12-aminokwasowe peptydy w kontekście białka p8. Charakterystyka wyizolowanych peptydów pod kątem ich zdolności do naśladowania GD2 (mimikry molekularnej), a także dla wybranych peptydów optymalizacja ich wiązania się z przeciwciałem 14G2a (**publikacja 1** i **2**).
2. Poznanie strukturalnych uwarunkowań odpowiedzialnych za specyficzność oddziaływania antygen-przeciwciało na podstawie analizy struktur krystalicznych Fab (*ang.* Fragment antigen binding) przeciwciała 14G2a z dwoma mimikami peptydowymi GD2, także z częścią

cukrową tego glikosfingolipidu. Optymalizacja wiązania się przeciwciała 14G2 z GD2 (**publikacja 3**).

3. Analiza zjawiska bezpośredniej cytotoksyczności przeciwciała 14G2a w stosunku do komórek neuroblastoma, na których obecny jest GD2, również z wykorzystaniem peptydów naśladujących ten antygen. Ocena możliwości zastosowania inhibitorów kinazy białkowej Aurora A i wybranych kompleksów integryn, a także kwasu 13-*cis* retinowego do wzmocnienia obserwowanej cytotoksyczności przeciwciała 14G2a. Analiza wybranych szlaków biochemicznej sygnalizacji w stosowanym modelu (**publikacje 4** i **5**).

4. Przegląd literatury dotyczącej mechanizmów wzbudzenia śmierci komórkowej przez przeciwciała monoklonalne wiążące gangliozydy na komórkach nowotworowych (**publikacja 6**).

4.3.2. Wprowadzenie do tematyki badań

Neuroblastoma (nerwiak zarodkowy współczulny) jest nowotworem złośliwym rozwijającym się z prymitywnych komórek nerwowych (neuroblastów) - wywodzących się z cewy nerwowej i tworzących struktury współczulnego układu nerwowego (Ratner *et al.*, 2016). Pod względem częstości występowania u dzieci nowotwór ten zajmuje trzecie miejsce po białaczkach i nowotworach centralnego układu nerwowego, a więc jest to najczęstszy pozaczaszkowy guz lity. W populacji rocznie diagnozuje się około 9 przypadków tego nowotworu na milion dzieci poniżej 15 roku życia (Kufe *et al.*, 2003). Co więcej, zapadalność na neuroblastoma wykazuje wyraźną zależność od wieku dziecka. Zatem jest to najczęstszy nowotwór w grupie niemowląt, około 18 miesięcy wynosi wartość mediany wieku w momencie diagnozy neuroblastoma, a zdecydowana większość przypadków tej choroby jest diagnozowana u dzieci do piątego roku życia (Shohet i Foster, 2017). Warto podkreślić, że wiek pacjenta w momencie diagnozy jest także jednym z ważnych czynników prognostycznych, gdyż złe rokowania mają pacjenci w wieku 18 miesięcy (i powyżej). Innymi czynnikami prognozy przebiegu leczenia są stopnień zaawansowania choroby, cechy histopatologiczne guza (stopień jego zróżnicowania), ploidalność komórek, a także obecność mutacji, takich jak amplifikacja onkogenu *MYCN* (diagnozowana u około 20% pacjentów), delecja krótkiego ramienia chromosomu 1 czy naddatek długiego ramienia chromosomu 11 (Cohn *et al.*, 2009).

Neuroblastoma została określona jako „kliniczna enigma" (Brodeur *et al.*, 2003). W przeciwieństwie do częstego agresywnego przebiegu u dzieci choroby wysokiego ryzyka, przykładowo pacjenci z neuroblastoma bez amplifikacji *MYCN* i bez naddatku 11q w stopniu

MS (z przerzutami do skóry, wątroby, i/lub nieznacznym rozsiewem do szpiku kostnego, wg. sytemu klasyfikacji INGS, *ang.* International Neuroblastoma Risk Group) mają bardzo dobre rokowania. W części przypadków dzieci z neuroblastoma w stopniu MS leczenie może być ograniczone do minimum, gdyż choroba w tej grupie może ulec regresji mimo rozsianego charakteru (Cohn *et al.*, 2009; Ratner *et al.*, 2016). Natomiast standardowe leczenie pacjentów z chorobą wysokiego ryzyka jest złożone, bardzo intensywne i obejmuje wielolekową chemioterapię, radioterapię, zabiegi chirurgiczne, autologiczny przeszczep szpiku kostnego, a dalej leczenie z wykorzystaniem kwasu 13-*cis* retinowego i przeciwciał wiążących GD2. Pomimo takiego leczenia dzieci z neuroblastoma wysokiego ryzyka tylko <50% pacjentów przeżyje 5 lat bez zdarzeń niepożądanych (Yu *et al.*, 2010). Dodatkowo należy podkreślić, że leczenie pacjentów z neuroblastoma wysokiego ryzyka oporną na leczenie, a także pacjentów ze wznową jest ogromnym wyzwaniem dla lekarzy i często kończy się niepowodzeniem (Cole i Maris, 2012). Statystyki zapadalności na neuroblastoma w Polsce nie są optymistyczne. Na ten typ nowotworu zapada rocznie w Polsce około 70-80 dzieci, a co ważne choroba diagnozowana jest głównie w stopniu zaawansowanym (Balwierz, 2004).

Heterogenność neuroblastoma jest bezspornym faktem. Różnorodność klinicznego przebiegu tej choroby ma swoje podstawy w biologii komórek nowotworowych, wykazujących szereg różnic w stosunku do komórek prawidłowych (Borriello *et al.*, 2016). Poznanie właściwości biologicznych danego typu nowotworu umożliwia jego diagnozowanie i leczenie. Uzasadnia to konieczność prowadzenia dalszych badań, w celu charakterystyki cząsteczek biochemicznych i ścieżek sygnałowych warunkujących los komórek neuroblastoma, w tym z jednej strony odpowiedzialnych za ich agresywny fenotyp (zdolność do przerzutowania czy oporność na leczenie), a z drugiej zdolność do różnicowania czy spontanicznej regresji.

W tym kontekście ważną grupą związków są antygeny cukrowe powiązane z nowotworami (TACA, *ang.* tumor-associated carbohydrate antigen). Bada się wpływ zmienionej glikozylacji, towarzyszącej transformacji nowotworowej, na fenotyp komórek nowotworowych, w tym ich zdolność do proliferacji, przeżycia, adhezji do białek macierzy zewnątrzkomórkowej, przerzutownia czy oddziaływania z komórkami układu odpornościowego, jak również szlaki biochemiczne zaangażowane w te procesy (Yu *et al.*, 2011). Istotnymi przykładami takich związków są gangliozydy GD2, GD3, GM2, które gromadzą się w zewnętrznej błonie komórkowej (Krengel i Bousquet, 2014). Gangliozydy należą do glikosfingolipidów zawierających w części cukrowej jedną lub więcej cząsteczek

kwasu sjalowego. Co więcej, części cukrowe tych antygenów mogą ulegać dodatkowym modyfikacjom, prowadzącym do powstania antygenów specyficznie nowotworowych, a nieobecnych na prawidłowych komórkach pacjenta. Należą do nich opisane w literaturze modyfikacje kwasu sjalowego w tym obecność *O*-acetylowanych czy *N*-glikolilowanych pochodnych gangliozydów (Fleurence *et al.*, 2017, Vazquez *et al.*, 2000).

W kontekście neuroblastoma ważnym obiektem badań jest GD2. Jest on gromadzony na powierzchni komórek tego nowotworu w zwiększonej ilości w stosunku do ograniczonego występowania na komórkach prawidłowych, takich jak komórki centralnego układu nerwowego, nerwy obwodowe, melanocyty skóry czy mezenchymalne komórki macierzyste (Daniotti *et al.*, 2013). Podobnie jak inne gangliozydy, związek ten ma amfipatyczną budowę - część lipidowa (ceramid) występuje w warstwie lipidowej błony, a część oligosacharydowa [GalNAcβ4(Neu5Acα8Neu5Acα3)Galβ4Glc] jest eksponowana na zewnątrz i składa się z glukozy, galaktozy, *N*-acetyloglukozoaminy, i dwóch cząsteczek kwasu sjalowego (Chester, 1997). GD2 jest markerem umożliwiającym jednoznaczną diagnozę neuroblastoma, a w czasie leczenia pacjentów służy do wykrywania rzadkich komórek nowotworowych w szpiku, krwi obwodowej czy preparatach obwodowych komórek macierzystych krwi (Beiske *et al.*, 2009). Co ważne, ten antygen jest celem w zwalczaniu nerwiaka zarodkowego współczulnego z wykorzystaniem immunoterapii (Yu *et al.*, 2010). Na podkreślenie zasługuje również fakt, że GD2 ma znaczenie nie tylko w biologii neuroblastoma, ale także występuje na komórkach innych typów nowotworów, m.in. melanoma, osteosarcoma, astrocytoma czy drobnokomórkowego raka płuc (Daniotti *et al.*, 2013). Jego obecność wykazano także na komórkach macierzystych raka piersi (Battula *et al.*, 2012).

Do detekcji gangliozydów obecnych na komórkach nowotworowych dostępnych jest szereg przeciwciał monoklonalnych. Warto zaznaczyć, że te białka i ich fragmenty stosowane są także w walce z nowotworami z wykorzystaniem biernych i czynnych terapii. Gangliozydy zajmują istotne miejsce w badaniach przeciwnowotworowych. Aż 4 związki z tej grupy, tj. gangliozydy GD2, GD3, fukozylo-GM1 i GM3, znalazły się w rankingu antygenów o kluczowym znaczeniu dla immunoterapii nowotworów, który został opracowany przez Narodowy Instytut Badań na Rakiem w Stanach Zjednoczonych Ameryki (*ang.* National Cancer Institute). Co więcej, GD2 znalazł się na ważnym 12 miejscu pośród sklasyfikowanych 75 antygenów (Cheever *et al.*, 2009).

W literaturze naukowej możemy znaleźć szereg przykładów badań na terapiami, które angażującą układ odpornościowy pacjenta do walki z komórkami nowotworowymi, na których obecne są gangliozydy (Daniotti *et al.*, 2013). W 2015 roku Agencja do Spraw

Leków i Żywności w Stanach Zjednoczonych (*ang.* Food and Drug Administration) zatwierdziła ludzko-mysie chimerowe przeciwciało wiążące gangliozyd GD2 - ch14.18 (Dinutuximab, Unituxin^{TM}). Lek ten jest używany w połączeniu z interleukiną-2, czynnikiem stymulującym tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF, *ang.* granulocyte and macrophage colony stimulating factor) i izotretinoiną (kwasem 13-*cis* retinowym) do leczenia minimalnej choroby resztkowej u pacjentów z neuroblastoma wysokiego ryzyka, którzy chociaż częściowo odpowiedzieli na standardową terapię (Yu *et al.*, 2010). Przeciwciała te alarmują układ odpornościowy pacjenta aktywując kaskadę dopełniacza (CDC, *ang.* complement-dependent cytotoxicity) i cytotoksyczność komórkową zależną od przeciwciał (ADCC, *ang.* antibody dependent cell-mediated cytotoxicity) do walki z komórkami nowotworowymi. Warto podkreślić, że GD2 jest pierwszym TACA, dla którego zatwierdzono celowaną immunoterapię przeciwnowotworową z użyciem przeciwciał monoklonalnych.

Osobną grupę badań stanowią prace nad czynnymi terapiami do wzbudzenia odpowiedzi odpornościowej u pacjentów, której celem są gangliozydy. W celu przełamania niskiej immunogenności gangliozydów, które będąc glikolipidami są zaliczane do antygenów grasiczoniezależnych, stosuje sie koniugaty gangliozydów z białkami nośnikowymi (np. KLH, *ang.* Keyhole Limpet Hemocyanin), a także antygeny zastępcze tj. przeciwciała przeciwidiotypowe czy peptydy mimetyczne. Badania te znajdują się na różnym poziomie zaawansowania przedklinicznego i klinicznego (Kieber-Emmons *et al.*, 2014). W tym kontekście należy wspomnieć, że obecność u pacjentów z neuroblastoma sieci ludzkich przeciwciał przeciwidiotypowych, w tym przeciwciał wiążących GD2 wzbudzonych u pacjentów po terapii przeciwciałem 3F8 wiążącym się z GD2, koreluje z ich przeżyciem (Cheung *et al.*, 2000). Innym podejściem jest wykorzystanie fragmentów przeciwciał wiążących GD2 do projektowania chimerowych receptorów antygenowych (CAR, *ang.* chimeric antigenic receptors, Fleurence *et al.*, 2017).

Fundamentem dla rozwoju terapii przeciwnowotworowych są badania podstawowe, a w przypadku omówionych poniżej pięciu artykułów doświadczalnych, wchodzących w skład mojego osiągnięcia naukowego, ich celem było poszerzenie wiedzy dotyczącej oddziaływania przeciwciało-antygen z wykorzystaniem mysiego, monoklonalnego przeciwciała 14G2a - wiążącego się z GD2 i ludzkich linii neuroblastoma. W tym kontekście analizowano m.in. zjawisko mimikry molekularnej i ścieżki przekazu sygnału prowadzące do śmierci komórek neuroblastoma. Podkreślić należy, że części wiążące antygen przeciwciał ch14.18 i 14G2a są identyczne (Gillies *et al.*, 1989). Fakt ten czynni przeciwciało 14G2a bardzo cennym narzędziem badawczym w

sytuacji, gdy dostęp do używanych w klinice przeciwciał może być utrudniony ze względu na kwestie formalne czy wysokie koszty zakupu.

4.3.3. Analiza mimikry molekularnej gangliozydu GD2 przez peptydy wyizolowane z bakteriofagowej biblioteki peptydowej LX-8

Od roku 1985, w którym w czasopiśmie „Science" ukazała się pionierska praca George'a P. Smitha wprowadzająca metodę prezentacji fagowej (*ang.* phage display, Smith, 1985), liczne prace naukowe udowodniły bezsprzeczną przydatność tej techniki do badania oddziaływania pomiędzy ligandami i receptorami. Co więcej, szereg leków zostało odkrytych z wykorzystaniem tej techniki, w tym do walki z rakiem np. Lupron czy Zoladex (Hamzeh-Mivehroud *et al.*, 2013). Metoda ta opiera się o bakteriofaga nitkowatego (rodzaj *Inovirus*), nazwanego tak ze względu na nitkowaty kształt kapsydu białkowego, uformowanego wokół kolistej, jednoniciowej cząsteczki genomowego DNA. Do tej grupy należą wirusy np. M13, f1, fd, które zakażają komórki bakterii *Escherichia coli* posiadające plazmid płciowy F. Kapsyd zbudowany jest z pięciu białek, spośród których pVIII jest najliczniej reprezentowane – w liczbie około 3000 kopii. Dodatkowo na przeciwległych końcach kapsydu znajduje się odpowiednio po pięć kopii białek pIII, pVI i pVII, pIX. Po wniknięciu do komórki genom ulega replikacji. Powstają także wszystkie białka wirusowe, do których należą, oprócz wymienionych powyżej białek kapsydu, białka pII, pV i pX – zaangażowane w replikację wirusowego DNA, a także białka pI, pIV i pXI – uczestniczące w procesie formowania się potomnych cząstek wirusowych. Bardzo ciekawy jest proces „składania" (*ang.* assembly), który odbywa się przez białkowy kanał, utworzony w poprzek osłonki bakteryjnej z białek pI, pXI i pIV. Tworzenie nowych cząstek wirusowych rozpoczyna się od uformowana kompleksu białek pVII i pIX wokół sygnału pakującego w wirusowym DNA. Dalej dochodzi do zastępowania oddziałujących z wirusowym DNA dimerów biała pV przez białko pVIII, a przed opuszczeniem komórki proces ten kończy się dodaniem białek pIII i pVI (Hamzeh-Mivehroud *et al.*, 2013).

Poznanie cyklu życiowego wirusów z rodziny *Inoviridae* dało podwaliny dla techniki fagowej prezentacji. Zaowocowało to wektorami, które pozwalają dzięki inżynierii genetycznej na uzyskanie na powierzchni bakteriofagów obcych dla wirusa peptydów, białek czy ich fragmentów, jako białek fuzyjnych z białkami kapsydu. Mogą one być dostępne w formie zbiorów sekwencji - bibliotek, które w przypadku peptydów różnią się chociażby sekwencją i długością peptydu, użytym do prezentacji białkiem wirusowego kapsydu (głównie wykorzystuje się białko pIII i pVIII) czy liczbą peptydów przypadającą na kapsyd

wirusowy. Są one bardzo cennym narzędziem badawczym, pozwalającym na badania oddziaływań pomiędzy cząsteczkami, w tym np. mapowanie epitopów, poszukiwanie agonistów i antagonistów receptorów, identyfikację ligandów dla receptorów sierocych, produkcję i optymalizację wiązania się fragmentów przeciwciał monoklonalnych z antygenami (również ludzkich), poszukiwanie peptydów naśladujących inne związki chemiczne (wspomniane już peptydy mimetyczne) czy badania nad szczepionkami (Smith i Petrenko, 1997).

W celu „wyłowienia" takich ligandów z bibliotek peptydowych, przeszukuje się je w procesie określanym w języku angielskim, jako „panning" głównie w oparciu o powinowactwo (*ang.* affinity purification) do użytego receptora, którym często jest przeciwciało. Niezwiązane bakteriofagi odpłukuje się, a te zatrzymane dzięki oddziaływaniu z receptorem są namnażane i poddawane kolejnym rundom przeszukiwania. Celem tego procesu jest uzyskanie puli bakteriofagów, wzbogaconej w stosunku do biblioteki wyjściowej w cząstki wirusowe o żądanych przez badacza właściwościach. Z takiej puli dalej izoluje się poszczególne klony fagowe. Sekwencje aminokwasowe prezentowanych peptydów ustala się po sekwencjonowaniu DNA, które znajduje się w kapsydzie wirusowym.

W badaniach naszego zespołu wykorzystano bakteriofagową bibliotekę LX-8, opartą o wektor f88-4 i kodującą 12-aminokwasowe peptydy, prezentowane w kontekście białka pVIII na mozaikowych cząstkach wirusowych. Sekwencje peptydów w tej bibliotece nie były w pełni przypadkowe, gdyż jej twórcy w pozycjach aminokwasowych 2 i 11 zaprojektowali cysteinę, co usztywniło strukturę peptydów dzięki obecności mostka disiarczkowego (Bonnycastle *et al.*, 1996). Celem badań była izolacja i charakterystyka peptydów mimetycznych gangliozydu GD2, a wyniki z doświadczeń zostały opublikowane w 2007 r. w czasopiśmie „International Journal of Molecular Medicine" (**Horwacik *et al.*, 2007**; **publikacja 1**). Badania prowadzone były przez nasz zespół we współpracy z grupą dr Danuty Kozbor z Roswell Park Cancer Institute (Buffalo, USA). Do wyłowienia peptydów użyto jako receptor biotynylowane przeciwciało 14G2a i dwie metody. W trakcie tzw. „przeszukiwania w fazie stałej" receptor ten związany był w dołkach mikropłytek opłaszczonych streptawidyną. Podczas, gdy w trakcie tzw. „przeszukiwania w fazie ciekłej" receptor ten, użyty w różnych stężeniach, najpierw oddziaływał z klonami bakteriofagowymi, a następnie kompleksy bakteriofag-przeciwciało wyłapywane były w dołkach opłaszczonych streptawidyną. Wstępnym wynikiem przeszukiwania było 55 klonów bakteriofagowych, dla których metodą immunoblottingu potwierdzono ich wiązania się z receptorem. Ostatecznie wytypowano zestaw 39 klonów do sekwencjonowania po kolejnej weryfikacji ich wiązania

się z przeciwciałem 14G2a - tym razem z użyciem ELISA. Sekwencjonowanie DNA tych klonów ujawniło 5 peptydów. Co interesujące ich sekwencje w znacznym stopniu różniły sie między sobą. Przykładowo sekwencje peptydów #85 (VCNPLTGALLCS) i #65 (SCQSTRMDPNCW) nie mają, oprócz wspomnianych wyżej cystein, żadnych wspólnych aminokwasów na odpowiadających sobie pozycjach. Natomiast peptydy #85 i #8 (NCDLLTGPMLCV) mają w pozycjach 5-7 wspólną sekwencję LTG, a w pozycji 10 leucynę (L). Porównując peptydy 8#, #65 i #94 (RCNPNMEPPRCF) wskazać można na obecność proliny (P) w pozycji 8 i/lub 9. Dodatkowo na C-końcach peptydów #65 i #94 występują aminokwasy aromatyczne, odpowiednio tryptofan (W) i fenyloalanina (F). Wreszcie kolejnym przykładem jest obecność strukturalnie podobnych asparaginy (N) lub glutaminy (Q) w pozycji 3 w peptydach #85, #94 i #65 (**Horwacik *et al.*, 2007**; **publikacja 1**).

Warto wspomnieć, że dla wszystkich wyizolowanych sekwencji potwierdzono rolę wiązania disiarczkowego, jako niezbędnego do oddziaływania z przeciwciałem 14G2a. Zatem z użyciem ELISA, po redukcji tego wiązania z użyciem ditiotreitolu, a także w obecności N-etylomaleimidu, nie obserwowano wiązania się bakteriofagów z receptorem. W celu ustalenia czy wyłowione peptydy są mimikami GD2 zastosowano testy współzawodnictwa pomiędzy peptydami i tym glikosfingolipidem o wiązanie się z przeciwciałem 14G2a. Wykorzystano komórki ludzkiej linii neuroblastoma IMR-32, która wykazuje wysoki poziom GD2 w błonie komórkowej. Pomiary wykonano metodą cytometrii przepływowej, gdyż komórki tej linii bardzo słabo przyczepiają się do podłoża. Wykazano, że wyizolowane klony fagowe naśladują GD2, ponieważ są w stanie konkurować z nim o wiązanie się z przeciwciałem 14G2a. Co ważne właściwości takie posiadają nie tylko peptydy prezentowane, jako składniki fagowych kapsydów, ale także wszystkie wyłowione peptydy w formie syntetycznej. W przypadku 4 peptydów (#8, #65, #85, #94) zmierzono podobne wartości IC50 (stężenia peptydów, które hamowały wiązanie receptora z naturalnym ligandem o połowę w stosowanym modelu). Wartości te pozostawały w zakresie ok. 14 - 20 μM (**Horwacik *et al.*, 2007**; **publikacja 1**).

Kolejny artykuł z tej tematyki został opublikowany przez nasz zespół w 2011 r. także w czasopiśmie „International Journal of Molecular Medicine" (**Horwacik *et al.*, 2011**; **publikacja 2**). Zebrano w niem wyniki doświadczeń badających zależności pomiędzy strukturą peptydów (wynikającą z ich określonej sekwencji), a ich aktywnością tj. zdolnością do molekularnej mimikry gangliozydu GD2. Badania prowadzono głównie dzięki uzyskanemu przez habilitantkę finansowaniu z MNiSW (2006-2010, projekt N302 034 32/3063). Wykazano, że mimo różnic w sekwencjach peptydy #65, #94, #85 oddziałują w

podobnym miejscu w paratopie przeciwciała 14G2a, gdyż wzajemnie blokują swe wiązanie z tym receptorem. W badaniach wykorzystano także 2 dodatkowe mysie monoklonalne przeciwciała rozpoznające GD2 tj. ME361-S2a i 126. W ELISA z użyciem peptydów prezentowanych na bakteriofagach wykazano, że powyższe 3 peptydy wiążą się tylko z przeciwciałem 14G2a (spośród tych użytych). Sugeruje to, że peptydy te naśladują szczególny epitop GD2, a co więcej ich reaktywność (właściwości mimetyczne) jest ograniczona tylko do przeciwciała 14G2a zastosowanego do przeszukiwania biblioteki fagowej LX-8 (**Horwacik *et al.*, 2011**; **publikacja 2**).

Na podstawie danych literaturowych wiadomo, że zarówno rodzaj użytej biblioteki, jak i sposób przeszukiwania mają wpływ na liczbę i właściwości wyłowionych peptydów, w tym na to czy będą miały one pożądane przez nas cechy np. wysoki stopień powinowactwa do receptora (Smith i Petrenko, 1997). Ze względu na swoje ograniczenia technika fagowej ekspresji nie musi ujawnić wszystkich, w tym najlepiej wiążących się sekwencji, dlatego w dalszych etapach badano zależność pomiędzy sekwencją aminokwasową czy strukturą przestrzenną, a właściwościami peptydów. W wyniku badań stwierdzono, że chociaż syntetyczne peptydy #64, #85, #94 wiążą się z przeciwciałem 14G2a, ich właściwości mimetyczne znacząco wzrosły przez dodanie do końca C tych peptydów sąsiadującej sekwencji białka pVIII (tj. AAEGD) (**Horwacik *et al.*, 2011**; **publikacja 2**).

Analizując związki pomiędzy sekwencją peptydu mimetycznego #94 (RCNPNMEPPRCF), a jego zdolnością do oddziaływania z receptorem (tj. przeciwciałem 14G2a), zaprojektowano 24 analogi, które zawierały podstawienia aminokwasów o różnych łańcuchach bocznych, a także delecje i insercje w sekwencji peptydu. Następnie użyto ich w teście współzawodnictwa (opisanym powyżej). Przeprowadzony „skaning alaninowy", w którym poszczególne aminokwasy w łańcuchu peptydu zastąpiono przez małą alaninę (A) wykazał, że wszystkie takie podstawienia za wyjątkiem R-10/A prowadzą do istotnego obniżenia zdolności peptydów do współzawodnictwa z GD2 o wiązanie się z przeciwciałem 14G2a. Szczegółowo przebadano role 4 aminokwasów, tj. N-3 (przez podstawienia N/Q, N/D), M-6 (z użyciem podstawień M/F, M/L), E-7 (z użyciem podstawień E/Q, E/D, E/N), F-12 (z użyciem podstawień F/Y, F/W), w wiązaniu się peptydu #94 z receptorem. Zarówno N-3 i E-7 nie tolerowały zmian dotyczących ładunku i długości łańcuchów bocznych, bowiem wszystkie analogi z podstawieniami w tych pozycjach zupełnie utraciły właściwości mimetyczne. Na koniec warto wspomnieć, że chociaż podstawienie F-12/Y obniżyło zdolność peptydu do wiązania się z przeciwciałem 14G2a, to peptyd #94 z podstawieniem F-12/W wykazywał istotne statystycznie dwukrotne zmniejszenie wartości IC50. Co więcej,

zaprojektowany peptyd #94-12-F/W-AAEGD (RCNPNMEPPRCWAAEGD) w testach współzawodnictwa, wykazywał prawie 18-krotny spadek wartości IC50 w stosunku do wyjściowego peptydu #94. Wreszcie dla syntetycznego peptydu #94 potwierdzono wnioski o krytycznej roli struktury przestrzennej, stabilizowanej mostkiem disiarczkowym pomiędzy C-2 i C-11 w obserwowanej molekularnej mimikrze gangliozydu GD2 (**Horwacik *et al.*, 2011**; **publikacja 2**).

Dodatkowo w omawianej pracy zamieszczono wyniki modelowania komputerowego Fab przeciwciała 14G2a z peptydami mimetycznymi w ramach współpracy z prof. dr hab. Andrzejem Kolińskim i dr Mateuszem Kurcińskim z Pracowni Teorii Biopolimerów Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Należy podkreślić, że badania *in silico* dały wyniki zgodne z badaniami *in vitro*, co czyni te modele cennymi naukowo i użytecznymi do dalszych badań (**Horwacik *et al.*, 2011**; **publikacja 2**).

Podsumowując, wykonane w naszym zespole prace badawcze opisane w **publikacjach 1** i **2** zaowocowały wyizolowaniem 5 peptydów wiążących się z przeciwciałem 14G2a, a także scharakteryzowaniem zdolności naśladowania GD2 przez te peptydy z użyciem linii komórek neuroblastoma. Zgromadzono szczegółowe informacje dotyczące zależności pomiędzy sekwencją aminokwasową, strukturą przestrzenną, a zdolnością peptydu #94 do naśladowania tego glikosfingolipidu. Wreszcie uzyskano w sumie 5 sekwencji silniej wiążących się z przeciwciałem 14G2a, z których 2 zostały wykorzystane w dalszych badaniach - opisanych w publikacjach wchodzących w skład osiągnięcia naukowego habilitantki, tj. **publikacji 3** (**Horwacik *et al.*, 2015c**) i **publikacji 5** (**Horwacik i Rokita, 2017**).

4.3.4. Analiza strukturalnych uwarunkowań odpowiedzialnych za oddziaływanie przeciwciała 14G2a z gangliozydem GD2 i jego dwoma peptydami mimetycznymi

W publikacji z 2015 r., która ukazała się w czasopiśmie „Molecular & Cellular Proteomics" (**Horwacik *et al.*, 2015c**; **publikacja 3**) m.in. pogłębiono badania dotyczące molekularnej mimikry GD2 przez peptydy wyłowione z fagowej biblioteki. Do analizy strukturalnych uwarunkowań mimikry, tym razem na poziomie atomowym, wykorzystano krystalografię rentgenowską. Badania te prowadzone były w ramach współpracy z zespołem już obecnie dr hab. Grzegorza Dubina z WBBiB UJ i dr Michałem Kolińskim z Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie.

Praca jest bardzo obszerna. Do głównych osiągnięć zespołu badawczego zaliczyłabym uzyskanie danych z czterech struktur krystalicznych Fab przeciwciała 14G2a (Fab-14G2a), w tym 3 kompleksów Fab z ligandami - odpowiednio peptydami #94-12-F/W-AAEGD, #85-AAEGD (VCNPLTGALLCSAAEGD) i częścią cukrową gangliozydu GD2, a także dla porównania pustego receptora. Fab uzyskano po trawieniu przeciwciała 14G2a papainą, a dalej oddzieleniu ich od pozostałych niestrawionych przeciwciał i fragmentów Fc (*ang.* Fragment, crystallizable) z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa z użyciem białka A i sączenia molekularnego. Dostępność tych 4 struktur, pozwoliła na wnikliwe poznanie i porównanie oddziaływań molekularnych warunkujących wiązanie się receptora z każdym z ligandów (**Horwacik *et al.*, 2015c**; **publikacja 3**). Na podkreślenie zasługuje fakt, że publikacja zawiera pierwszy opublikowany kompleks fragmentu przeciwciała z częścią cukrową gangliozydu. Inne dostępne struktury Fab takich przeciwciał, tj. ME36.1 - wiążącego gangliozydy GD2 i GD3, 3F8 - wiążącego gangliozyd GD2, R24 - wiążącego gangliozyd GD3 czy wreszcie 14F7 i chP3 - wiążących gangliozyd NeuGc-GM3, są puste (numery PDB powyższych, jak i tych zdeponowanych przez nasz zespół struktur zostały zebrane w publikacji Soliman *et al.*, 2017). W tym miejscu warto jeszcze raz zaznaczyć, że miejsce wiążące antygen 14G2a, a także przeciwciała ch14.18 jest takie samo. Podkreśla to kluczowe znaczenie prowadzonych przez nasz zespół badań podstawowych w uzupełnieniu charakterystyki tego zatwierdzonego przez FDA leku. Podobnie, według mojej wiedzy, nie opublikowano struktur krystalicznych innych dostępnych w literaturze peptydów naśladujących gangliozydy w kompleksach z przeciwciałami, z którymi się wiążą. Wreszcie liczba publikacji opisująca struktury krystaliczne kompleksów Fab odpowiednio z ligandami naturalnymi będącymi antygenami cukrowymi i ich peptydami mimetycznymi jest bardzo ograniczona (Vayas *et al.*, 2003; Tapryar *et al.*, 2013).

Omawiając mechanizm wiązania się przeciwciała 14G2a z częścią cukrową GD2, warto pokreślić, że w miejscu wiążącym antygen dochodzi do zmian konformacji łańcucha lekkiego i ciężkiego, a także w układzie cząsteczek wody, która wypełnia kieszeń wiążącą antygen. W strukturze pustego Fab kieszeń ta ma szerokość 25 Å, a w strukturze kompleksu tylko 21 Å. W oddziaływanie z Fab zaangażowane są obie cząsteczki kwasu sjalowego, *N*-acetylogalaktozoamina, a także w mniejszym stopniu galaktoza, podczas gdy łącząca się z tą ostatnią glukoza w ogóle nie jest zaangażowana w oddziaływanie z przeciwciałem 14G2a. Zapewnia to swoistość wiązania się 14G2a do GD2 w stosunku do innych gangliozydów np. strukturalnie zbliżonych GD3 czy GD1b. Podstawą dla oddziaływania pomiędzy GD2, a aminokwasami przeciwciała są wiązania wodorowe, w postaci szerokiej sieci angażującej

zarówno bezpośrednio ligand i receptor, a także co ciekawe, cząsteczki wody. Takie cząsteczki kompensują brak wzajemnej komplementarności w strukturze kompleksu, gdyż GD2 nie wypełnia całej kieszeni wiążącej. Co więcej, wiązania wodorowe z udziałem cząsteczek wody obecne są w obrębie samego ligandu i usztywniają jego strukturę (**Horwacik *et al.*, 2015c; publikacja 3**).

Wykonanie symulacji *in silico* i ich późniejsza doświadczalna weryfikacja - z wykorzystaniem jako modeli scFv (*ang.* single chain Fragment variable), uzyskanych w systemie bakteryjnym, pozwoliły na przetestowanie kilku podstawień aminokwasowych, w celu potwierdzenie roli konkretnych oddziaływań molekularnych we wiązaniu się GD2 z przeciwciałem 14G2a. Uzyskane zmutowane scFv przebadano pod kątem ich wiązania się z oczyszczonym gangliozydem GD2 (z użyciem ELISA) i z tym antygenem obecnym na powierzchni linii komórek neuroblastoma CHP-134 czy NXS2 (z użyciem cytometrii przepływowej). Stwierdzono, że utworzone wiązania wodorowe mają bardzo kooperatywny charakter, gdyż podstawienia pojedynczych aminokwasów przez alaninę w obrębie lekkiego (L, *ang.* light, $_{L}$S-96/A) i ciężkiego (H, *ang.* heavy, $_{H}$N-33/A i $_{H}$N-35/A) łańcucha doprowadziły do całkowitego zaniku oddziaływania ligand-receptor. Co więcej sprawdzono 5 podstawień, które zostały zaprojektowane by poprawić badane oddziaływanie GD2 z 14G2a. Podstawienie $_{L}$H-31/N (mające poprawić oddziaływanie z *N*-actetyloglukozoaminą) doprowadziło do zaniku oddziaływania, podstawienie $_{H}$A-50/K (mające poprawić oddziaływanie z kwasem sjalowym, który związany jest z galaktozą) znacząco je osłabiło. Podstawienia $_{L}$H-54/R (mające bezpośrednio zaangażować tę część receptora w oddziaływanie z pominięciem wody) i $_{H}$S-59/K (mające poprawić oddziaływanie z kwasem sjalowym, który związany jest z galaktozą) nie miały znaczącego wpływu na siłę oddziaływania. Wreszcie, jako jedyne podstawienie $_{H}$E-101/K (mające doprowadzić do bezpośredniego oddziaływania ten aminokwas w receptorze z zewnętrznym kwasem sjalowym z GD2) pozwoliło na istotne polepszenie oddziaływania GD2 z fragmentem scFv (**Horwacik *et al.*, 2015c; publikacja 3**). Ten wynik może mieć znaczenie dla dalszego rozwoju badań klinicznych, choć obserwowana poprawa charakteru badanego oddziaływania wymaga potwierdzenia po wprowadzeniu tej substytucji do zatwierdzonego przeciwciała ch14.18. Dodatkowo, takie scFv-14G2a ($_{H}$E-101/K) mogą także należć zastosowanie, jako nośniki leków cytostatycznych (Shen *et al.*, 2016).

Porównanie sposobu oddziaływania Fab-14G2a z częścią cukrową i z każdym z dwóch badanych peptydów mimetycznych uwidacznia szereg istotnych różnic pomimo ogólnego podobieństwa, które wynika z kształtu kieszeni wiążącej antygen. Należy

podkreślić, że w przypadku kompleksu Fab-część cukrowa GD2 widoczne jest „indukowane dopasowanie się" (*ang.* induced fit mechanism) łańcuchów przeciwciała, prowadzące do zamknięcia się kieszeni wiążącej antygen wokół GD2. Natomiast w przypadku dwóch struktur Fab z peptydami mimetycznymi oddziaływanie opiera się o mechanizm „zamka i klucza" (*ang.* key and lock). Kolejne różnice w sposobie oddziaływania pomiędzy Fab i peptydami ujawniają się po przeanalizowaniu oddziaływań ligand-receptor na poziomie atomowym. Należy podkreślić, że w oddziaływaniu pomiędzy Fab i peptydami również pośredniczą wiązania wodorowe, w tym także z udziałem cząsteczek wody (szczególnie w przypadku kompleksu Fab-peptyd #94-12-F/W-AAEGD), ale mają one jednak inny układ. Co więcej znaczący udział mają oddziaływania hydrofobowe np. dominujące dla aminokwasów powyżej E-7 w sekwencji peptydu #94-12-F/W-AAEGD w kompleksie z Fab. Dodatkowo w obu peptydach związanych z receptorem obecne są mostki disiarczkowe. Na podstawie uzyskanych wyników należy stwierdzić brak mimikry „strukturalnej", opierającej się o podobny układ grup chemicznych, pomiędzy ligandem właściwym (GD2) i tymi dwoma peptydami mimetycznymi w oddziaływaniu z przeciwciałem 14G2a (**Horwacik *et al.*, 2015c**; **publikacja 3**).

Podsumowując, wyniki uzyskane w **publikacji 3** opisują sposób oddziaływania przeciwciała 14G2a z GD2 i dwoma peptydami mimetycznymi tego TACA. Należy stwierdzić, że opisane badania pozostają w zgodności z charakterystyką zjawiska molekularnej mimikry zmieszczoną w już powyżej omówionych dwóch pracach (**publikacjach 1** i **2** zaliczonych do osiągnięcia). Obserwowana mimikra ma raczej charakter „funkcjonalny", opierający się o alternatywne oddziaływania peptydów z przeciwciałem 14G2a i jest powiązana z tym konkretnym przeciwciałem. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż przeprowadzone badania w znaczący sposób poszerzają zrozumienie zjawiska naśladowania antygenów cukrowych przez peptydy.

Ma to znaczenie ze względu na fakt, że takie peptydy mogą mieć różne zastosowanie, w tym do produkcji szczepionek, gdzie są używane jako antygeny zastępcze dla słabo immunogennych cukrów (Kieber-Emmons *et al.*, 2014). W przypadku naszych peptydów wyizolowanych z biblioteki LX-8 przy pomocy przeciwciała 14G2a zgromadzona wiedza o powiązaniach pomiędzy strukturą peptydów, a ich właściwościami może posłużyć do dalszej optymalizacji mimikry w oparciu o dane uzyskane z 3 struktur kompleksów, tj. Fab-14G2a z peptydami i częścią cukrową GD2. Wyniki takiego podejścia do projektowania peptydów mimetycznych z wykorzystaniem wiedzy o strukturze przeciwciała i metod bioinformatycznych są już znane w literaturze. Zoptymalizowany w ten sposób peptyd

naśladujący GD2 jest obecnie testowany w badaniach klinicznych (Kieber-Emmons *et al.*, 2014; Makhoul *et al.*, 2015). W tym kontekście próby podjęte w naszym zespole zakończyły się sukcesem w przypadku podstawienia $_{H}$E-101/K dla scFv-14G2a. Potwierdzeniem istotnego znaczenia dla środowiska naukowego badań opisanych w **publikacji 3** (**Horwacik *et al.*, 2015c**) był wybór na okładkę czasopisma „Molecular & Cellular Proteomics" ryciny z artykułu naszego zespołu. Dodatkowo Soliman i współautorzy w swojej pracy, odnosząc się m.in. do omówionej powyżej **publikacji 3** zaproponowali, że poznanie strukturalnych uwarunkowań oddziaływania przeciwciał z TACA może pomóc w lepszym zrozumieniu skutków oddziaływania przeciwciał z komórkami nowotworowymi. W szczególności wpływu przeciwciał na strukturę błony komórek, w której znajdują się rozpoznawane przez nie antygeny, procesy internalizacji tych antygenów czy przekaz sygnału prowadzący do śmierci komórek na drodze apoptozy czy onkozy (Soliman *et al.*, 2017). Warto o tym wspomnieć przechodząc do omawiania wyników zamieszczonych w publikacjach **Horwacik *et al.* z 2013 r. (publikacja 4)** i **Horwacik i Rokita z 2017 r. (publikacja 5)**, zawierających opis badań nad bezpośrednią cytotoksycznością przeciwciał 14G2a w stosunku do komórek nowotworowych. Chociaż wyizolowane peptydy mogą wymagać dalszej optymalizacji zależnie od ich docelowej aplikacji, ich obecne właściwości pozwoliły na zastosowanie jednego z nich w badaniach wpływu przeciwciał 14G2a na komórki neuroblastoma **(publikacja 5)**.

4.3.5. Analiza zjawiska bezpośredniej cytotoksyczności przeciwciała 14G2a w stosunku do komórek neuroblastoma, wykazujących ekspresję gangliozydu GD2

Funkcje gangliozydów w komórkach interesują badaczy od kilku dekad. Wiadomo, że w komórkach układu nerwowego, które są bogate w gangliozydy, są one ważnym składnikiem tratw lipidowych. Związki te są zaangażowane w regulację przekazu sygnału, m.in. w procesach przeżycia, wzrostu i proliferacji, ruchliwości, adhezji komórek, ale także w czasie oddziaływań pomiędzy komórkami. Gangliozydy odgrywają również rolę w procesach chorobowych, takich jak nowotwory, choroby neurodegeneracyjne, autoimmunologiczne czy gangliozydozy (Yu *et al.*, 2011).

Jak już wspomniałam, w czasie transformacji nowotworowej zarówno skład, jak i ilość gangliozydów ulegają wyraźnym zmianom, a to ma wpływ na cechy fenotypowe komórek nowotworowych. W neuroblastoma dostępne dane literaturowe wskazują na powiązania pomiędzy składem gangliozydów i stopniem agresywności komórek, co przekłada się na kliniczny obraz choroby (Hettmer *et al.*, 2003). Opisana została rola GD2 w adhezji

komórek neuroblastoma do białek macierzy zewnątrzkomórkowej (Cheresh *et al.*, 1986). Co ciekawe szereg eksperymentów dowodzi, że wiązanie się przeciwciał do gangliozydów na komórkach różnych linii nowotworowych hamuje ich żywotność i to bez udziału mechanizmów układu odpornościowego takich jak CDC i ADCC (**Horwacik i Rokita, 2015**; **publikacja 6**). Podkreśla to rolę tych związków w przekazie sygnału w komórkach w tym, co ważne dla leczenia chorób nowotworowych, również tych regulujących śmierć na drodze apoptozy czy onkozy. Dlatego w kontekście charakterystyki oddziaływania gangliozydu GD2 z przeciwciałem 14G2a, w pracach **Horwacik *et al.* z 2013 r. (publikacja 4) i Horwacik i Rokita z 2017 r. (publikacja 5)** zawarto badania zjawiska bezpośredniej cytotoksyczności przeciwciał w stosunku do komórek neuroblastoma.

W 2013 r. w czasopiśmie „Cancer Letters" opublikowane zostały wyniki doświadczeń charakteryzujące wpływ przeciwciał 14G2a na przeżywalność komórek kilku linii neuroblastoma (**Horwacik *et al.*, 2013**; **publikacja 4**). Należy podkreślić, że dostępność do badań panelu linii neuroblastoma (IMR-32, CHP-134, LA-N-1, LA-N-5, HTLA-230, Kelly), ludzkiej linii melanoma HT-144 - wszystkich z wysoką zawartością gangliozydu GD2, a także ludzkiej linii neuroblastoma SK-N-SH, na której brak jest gangliozydu GD2, pozwoliła na istotne poszerzenie opublikowanych już w 2009 r. wyników, a uzyskanych na linii IMR-32 (Kowalczyk *et al.*, 2009). Zatem zebrano dane doświadczalne pokazujące, że linie CHP-134, LA-N-1, LA-N-5, HTLA-230, obok badanych komórek IMR-32, również wykazują obniżenie żywotności w obecności przeciwciała 14G2a (w przebadanym zakresie stężeń 10-80 μg/ml). W przypadku 5 linii, tj. IMR-32, CHP-134, LA-N-5, HTLA-230, Kelly obserwowany efekt spadku żywotności był istotnie statystycznie zależny od dawki przeciwciał. Wartości IC50 (stężenia przeciwciał 14G2a prowadzące do spadku żywotności o połowę w stosunku do komórek kontrolnych) dla tych 5 linii komórkowych pozostawały w zakresie od 64 (±1) - 249 (±39) μg/ml. Dla komórek CHP-134 i IMR-32 ten obserwowany efekt był także istotnie statystycznie zależny od czasu inkubacji z przeciwciałem (w zakresie 24-72 godzin). Analizując mechanizm śmierci tylko w przypadku komórek IMR-32 wykazano istotną (około 2-krotną) aktywację kaspazy-3 i -7. Wykazano także, że komórki linii melanoma HT-144 były niewrażliwe na przeciwciało 14G2a mimo wysokiej zawartości GD2. Świadczy to o tym, że obecność GD2 nie jest jedynym niezbędnym czynnikiem warunkującym cytotoksyczność przeciwciał w stosunku do komórek nowotworowych. Doświadczenia kontrolne wykazały, że linia SK-N-SH, która nie ma GD2, nie wykazuje obniżenia żywotności w obecności tego przeciwciała. Wreszcie, zmian żywotności komórek nie obserwowano w przypadku

zastosowania przeciwciała kontrolnego, tj. mysiego, monoklonalnego przeciwciała PK136 (IgG2a, które nie wiąże się z GD2) (**Horwacik *et al.*, 2013**).

W badaniach dotyczących bezpośredniej cytotoksyczności przeciwciała 14G2a zastosowano także jeden z dwóch peptydów mimetycznych - #94-12-F/W-AAEGD, dla których uzyskano struktury krystaliczne z Fab przeciwciała 14G2a (**Horwacik *et al.*, 2015c**; **publikacja 3**). Wyniki tych doświadczeń opisano w publikacji I. Horwacik i H. Rokity, która ukazała się w czasopiśmie „International Journal of Oncology" (**Horwacik i Rokita, 2017**; **publikacja 5**). Zatem w badanym modelach komórek IMR-32 i CHP-134 traktowanych przeciwciałem 14G2a (w stężeniu 20 μg/ml, przez 72 godz.) użycie tego peptydu (np. w stężeniu 200 μM) pozwoliło na zablokowanie efektu cytotoksycznego tego przeciwciała. Co więcej nie obserwowano zmian morfologii, takich jak zaokrąglanie się, tworzenie agregatów, odczepianie się od podłoża komórek IMR-32 i CHP-134, co jest charakterystyczne dla komórek tych linii traktowanych przeciwciałem 14G2a. Należy dodać, że użycie peptydu kontrolnego o identycznym składzie aminokwasowym, ale o przypadkowej sekwencji, nie miało wpływu na efekt cytotoksyczny przeciwciał. Dodatkowo, oba peptydy nie wpływały na żywotność komórek w hodowli (**Horwacik i Rokita, 2017**).

Podsumowując omówione w tej części wyniki z **publikacji 4** i **5** można stwierdzić, że w badanych modelach scharakteryzowano zjawisko bezpośredniej cytotoksyczności przeciwciała 14G2a. Zastosowanie jednego z naszych peptydów mimetycznych w tych eksperymentach przyniosło potwierdzenie, że obserwowane zmiany mają charakter swoisty i co ważne wymagają wiązania się przeciwciała z GD2. Zatem wyniki te uzupełniają zgromadzone już dane uzyskane przy użyciu przeciwciała kontrolnego PK136.

4.3.6. Ocena możliwości zastosowania inhibitora kinazy Aurora A, inhibitorów wybranych kompleksów integryn i kwasu 13-*cis* retinowego do wzmocnienia obserwowanej cytotoksyczności przeciwciała 14G2a

Nowotwory cechują się heterogennością, co ma wpływ na skuteczność terapii. Dlatego ważnym podejściem w badaniach przeciwnowotworowych jest poszukiwanie nowych kombinacji leków - w tym leków celowanych i immunoterapii (Gotwals *et al.*, 2017). Również w przypadku neuroblastoma zgromadzona wiedza dotycząca biologii komórek tego nowotworu, w tym ich oddziaływania z mikrośrodwiskiem daje nadzieję na poszerzenie oręża leków dostępnych do walki z chorobą wysokiego ryzyka. Ma to odzwierciedlenie w obecnie prowadzonych badaniach klinicznych oceniających skuteczność, m.in. drobnocząsteczkowych związków hamujących biochemiczne ścieżki przekazu sygnału (Borriello *et al.*, 2016, Cheung

i Dyer, 2013) czy takich, w których przeciwciała rozpoznające GD2 są łączne z innymi lekami takim jak lenalidomid - aby aktywować komórki NK (NCT01711554, za https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01711554).

Publikacja 4 (Horwacik *et al.*, 2013) jest obszerna. W komórkach traktowanych przeciwciałem 14G2a nasz zespół określił czasowy profil zmian poziomu szeregu białek pod wpływem tego przeciwciała, w tym co ważne trzech białek o kluczowej roli w biologii komórek neuroblastoma. Jednym z nich jest kinaza Aurora A, a pozostałymi dwa czynniki transkrypcyjne i partnerzy tej kinazy - MYCN i P53 (Tang *et al.*, 2017). Ma to znaczenie, gdyż z wyjątkiem linii SK-N-SH, pozostałe użyte w badaniach linie neuroblastoma charakteryzuje amplifikacja onkogenu *MYCN*. Pod wpływem przeciwciał wykazano spadek całkowitego komórkowego poziomu Aurora A i ufosforylowanej na T-288 formy Aurora A (modyfikacja ta jest powiązana z aktywacją tej kinazy), spadek poziomu białka MYCN we frakcjach jądrowych, a z drugiej strony wzrost poziomu białka supresorowego P53 (w tej frakcji komórkowej). Kolejnym ciekawym wynikiem z tej pracy był przyrost poziomu białka PHLDA1 (*ang.* plekstrin homology-like domain family A, member 1) w komórkach IMR-32 traktowanych przeciwciałem 14G2a (**Horwacik *et al.*, 2013**; **publikacja 4**). W artykule Johnson *et al.* w 2011 r. wykazano, że białko to jest jeszcze jednym partnerem białka Aurora A i jest kierowane na szlak degradacji po uprzedniej fosforylacji na S-98 przez tą kinazę w komórkach linii raka piersi MDA-MB-231 (Johson *et al.*, 2011). Dodatkowo warto zaznaczyć, że zmianom białka PHLDA1, w komórkach IMR-32 traktowanych przeciwciałem 14G2a, towarzyszyła jądrowa akumulacja czynnika transkrypcyjnego HSF-1 - aktywującego ekspresję genu *PHLDA1*, a także spadek poziomu białek HSP40 i HSP70 - regulujących pro-apoptotyczne właściwości PHLDA1 (Hayashida *et al.*, 2006). Na podstawie uzyskanych wyników w komórkach IMR-32 traktowanych badanym przeciwciałem zaproponowano pro-apoptotyczną rolę PHLDA1 (**Horwacik *et al.*, 2013**).

Dostępne w literaturze naukowej wyniki badań wskazują na diagnostyczną rolę kinazy Aurora A jako czynnika złego rokowana w neuroblastoma (Maris *et al.*, 2009). Badania molekularne wykazały z jednej strony jej stabilizującą rolę w stosunku do białka MYCN (Otto *et al.*, 2009), a z drugiej destabilizującą w stosunku do P53 (Katayama *et al.*, 2004). Fakty te mają odzwierciedlenie w testach klinicznych inhibitorów kinazy Aurora A u pacjentów z neuroblastoma (DuBois *et al.*, 2016). Stąd w omawianej publikacji **Horwacik *et al.* z 2013 r.** znalazły się wyniki doświadczeń, w których porównana została żywotność komórek neuroblastoma traktowanych inhibitorem kinazy Aurora A MK-5108 - samodzielnie i w kombinacji z przeciwciałem 14G2a. W badaniach wykazano, że linie IMR-32, CHP-134,

LA-N-1, LA-N-5, HTLA-230 i Kelly są wrażliwe na działanie tego inhibitora, zależnie od jego stężenia. Wyznaczono wartości IC50 - najmniejszą uzyskano dla komórek CHP-134 (ok. 0.16 μM), a największą dla komórek LA-N-1 (ok. 6 μM). Łączne efekty przeciwciała 14G2a i inhibitora były najlepiej widoczne dla linii CHP-134, IMR-32 i LA-N-5, które jednocześnie były najbardziej wrażliwe na testowany inhibitor. Powyższy układ doświadczalny, porównano z modelem, w którym komórki traktowane były kwasem 13-*cis* retinowym, samodzielnie i w kombinacji z badanym przeciwciałem. Wykazano, że dla czterech linii neuroblastoma (IMR-32, CHP-134, LA-N-1, HTLA-230) dodatek przeciwciała 14G2a uczulał komórki na działanie kwasu 13-*cis* retinowego. Co więcej, inhibitor Aurora A nie wpływał na poziom GD2 na powierzchni badanych komórek, co ma znaczenie dla zastosowania tego związku razem z przeciwciałem 14G2a (**Horwacik *et al.*, 2013**; **publikacja 4**).

W hodowlach komórek IMR-32 i LA-N-1, a w mniejszym stopniu CHP-134 i LA-N-5 po potraktowaniu ich przeciwciałem 14G2a obniżeniu poziomu komórkowego ATP towarzyszą zmiany morfologii komórek, ich agregacja, brak kontaktu lub luźny kontakt z podłożem (**Horwacik *et al.*, 2013; publikacja 4**). W pracy autorstwa Kowalczyk *et al.* z 2009 r. nasz zespół wykazał, że przeciwciało 14G2a hamuje wiązanie się komórek IMR-32 do fibronektyny (Kowalczyk *et al.*, 2009). Dlatego w niedawno opublikowanym artykule **I. Horwacik i H. Rokity z 2017 r.** (**publikacja 5**) w czasopiśmie „International Journal of Oncology" scharakteryzowano wpływ integryn i wybranych inhibitorów tych białek na bezpośrednią cytotoksyczność przeciwciała 14G2a w stosunku do komórek neuroblastoma. Wykazano, że brak kontaktu z podłożem komórek badanych linii neuroblastoma obniża w nich poziom komórkowego ATP. Natomiast obecność białek macierzy komórkowej, takich jak fibronektyna czy kolagen typu IV na płytkach hodowlanych, pozwoliła na zmierzenie wzrostu tego związku w hodowlach w porównaniu do standardowych polistyrenowych płytek użytych do hodowli. Dodatkowo badania przyniosły także informację, że obecność kolagenu typu IV w dołkach czyni komórki LA-N-1 mniej wrażliwymi na traktowanie przeciwciałem 14G2a. Testy adhezji komórkowej i cytometrii przepływowej z użyciem przeciwciał swoistych w stosunku do szeregu integryn, m.in. α4, β1, αVβ3, αVβ5 wykazały, m.in. obecność integryny β1 na powierzchni komórek IMR-32, CHP-134, LA-N-5, Kelly, a w hodowlach IMR-32 najwyższy procent komórek wykazujących obecność α4 (ok. 30%). Populacja komórek Kelly wykazywała najwyższą liczbę komórek z kompleksem αVβ5 (ok. 60%), wreszcie w hodowlach CHP-134, LA-N-5, Kelly wykryto komórki posiadające

kompleksy αVβ3 (ok. kilka procent). Pozwoliło to na zastosowanie inhibitorów wybranych kompleksów integryn, m.in. α4β1 (BIO 1211) i αVβ3/αVβ5 (cilengitide, SB273005) - osobno i w połączeniu z przeciwciałem 14G2a w testach adhezji komórkowej i żywotności. Badania wykazały, że obecność kompleksów integryn α4β1 na komórkach IMR-32 hodowanych na fibronektynie, a także integryn αVβ3, αVβ5 na komórkach CHP-134, LA-N-5, Kelly hodowanych na witronektynie, czyni te komórki wrażliwymi na odpowiednie inhibitory, co przekłada się na zmniejszenie ich przyczepiania się do białek macierzy zewnątrzkomórkowej czy zmiany morfologii komórek (IMR-32, LAN-5, Kelly). Co ważniejsze w komórkach IMR-32 traktowanych BIO 1211, a także LA-N-5, Kelly traktowanych SB273005 w połączeniu z przeciwciałem 14G2a zmierzono największy spadek żywotności w porównaniu do obu czynników stosowanych oddzielnie. Dodatkowo w przypadku hodowli komórek LA-N-5 i Kelly traktowanych SB273005 wykazano największy wzrost aktywności kaspay-3 i -7 także w przypadku komórek traktowanych oboma związkami. Pozwala to stwierdzić, że badane integryny odgrywają rolę w obserwowanej wrażliwości wybranych linii komórek neuroblastoma na przeciwciało 14G2a (**Horwacik i Rokita, 2017**; **publikacja 5**). Wpisuje się to w badania Young *et al.* z 2015 r., które przypisały integrynie α4 znaczenie czynnika złego rokowania powodzenia leczenia u pacjentów z nowotworem bez amplifikacji onkogenu *MYCN* (Young *et al.*, 2015). Co więcej, dane literaturowe donoszą, że kompleksy integryn αVβ3 są obecne na komórkach macierzystych raka, podczas gdy kompleks integryn α4β1 jest zaangażowany w proces przerzutowania do szpiku kostnego (Seguin *et al.*, 2015).

Podsumowując, badania zamieszczone w **publikacjach 4** i **5** pozwoliły na lepsze zrozumienie wpływu przeciwciał wiążących się z GD2 na szlaki przekazu sygnału regulujące śmierć komórek, w tym na drodze apoptozy. Przetestowano kombinacje związków o znaczeniu terapeutycznym w stosowanych modelach *in vitro*, tj. przeciwciała 14G2a w połączeniu z inhibitorem Aurora A MK-5108, kwasem 13-*cis* retinowym i wspomnianymi wyżej inhibitorami kompleksów integryn.

Co ciekawe w 2015 r. Cochonneau i współautorzy wykazali w swoim artykule, że przeciwciała 8B6, rozpoznające *O*-acetylowany GD2 na komórkach neuroblastoma IMR-5, hamują wzrost guzów u myszy NOD/SCID bez udziału mechanizmów CDC i ADCC (Cochonneau *et al.*, 2015). Dlatego nasze badania powinny być kontynuowane z użyciem modeli zwierzęcych. Dodatkowo wiadomo, że taką bezpośrednią cytotoksyczność w stosunku do komórek nowotworowych posiadają naturalnie występujące przeciwciała u pacjentów z

neuroblastoma (David *et al.*, 1999), przeciwciała wzbudzone u pacjentów po szczepieniach antygenami zastępczymi - przeciwciałem przeciw-idiotypowym E110 (Hernandez *et al.*, 2011) czy peptydem mimetycznym P10s (Makhoul *et al.*, 2015). **Te dane łączą wszystkie omówione powyżej publikacje 1-5 zaliczone do osiągnięcia w spójną całość.** Zatem pogłębienie wiedzy o oddziaływaniu GD2 z przeciwciałem 14G2a zarówno na poziomie strukturalnym, jak i skutków tego oddziaływania na poziomie komórkowym, w tym z wykorzystaniem naszych peptydów mimetycznych, ma ważne znaczenie dla badań przeciwnowotworowych.

Podsumowując główne wyniki zamieszczone w **publikacjach** doświadczalnych **1-5** zaliczonych do mojego osiągnięcia naukowego należy podkreślić, że:

1. Z bakteriofagowej biblioteki LX-8 wyizolowano peptydy wiążące się z przeciwciałem 14G2a i udowodniono ich zdolność do naśladowania GD2. Dodatkowo modyfikacje sekwencji 3 z tych peptydów dały 5 nowych peptydów silniej wiążących się z badanym przeciwciałem (**publikacja 1** i **2**).
2. Na podstawie 3 struktur krystalicznych kompleksów Fab-14G2a z ligandami, tj. z dwoma mimikami peptydowymi GD2, a także z częścią cukrową GD2, i dla porównania struktury pustego Fab, poznano molekularne uwarunkowania specyficznego oddziaływania tego przeciwciała z GD2, a także opisano różnice w sposobie wiązania się naturalnego liganda i jego dwóch peptydów mimetycznych. Z wykorzystaniem narzędzi bioinformatycznych i modeli scFv zoptymalizowano wiązanie się GD2 do miejsca wiążącego antygen (**publikacja 3**).
3. Scharakteryzowano zjawisko bezpośredniej cytotoksyczności przeciwciała 14G2a w stosunku do komórek ludzkich linii neuroblastoma, na których obecny jest GD2, w tym również z wykorzystaniem jednego peptydu mimetycznego (**publikacje 4** i **5**).
4. Wykazano, że dla wybranych linii komórek neuroblastoma inhibitory kinazy Aurora A (MK-5108) i wybranych kompleksów integryn (α4β1 - BIO 1211, αVβ3/αVβ5 - cilengitide i SB273005), a także kwas 13-*cis* retinowy wzmacniają obserwowaną cytotoksyczność. Zanalizowano wybrane białka i szlaki biochemicznej sygnalizacji w stosowanym modelu (**publikacje 4** i **5**).

W ścisłym związku z wspomnianymi już **publikacjami 4** i **5** pozostaje praca przeglądowa z 2015 r. autorstwa I. Horwacik i H. Rokity, która ukazała się w czasopiśmie „Apoptosis" (na zaproszenie w specjalnym numerze pt. „The role of sphingolipids and lipid rafts in determining cell fate"). Zawiera ona omówienie budowy i funkcji gangliozydów, z uwzględnieniem roli gangliozydów w komórkach nowotworowych, ale także liczne przykłady

przeciwciał wiążących gangliozydy, które wykazują bezpośrednią cytotoksyczność w stosunku do komórek nowotworowych, a także charakterystykę rodzaju wzbudzanej śmierci i zaangażowanych szlaków przekazu sygnału (**Horwacik i Rokita, 2015**; **publikacja 6**).

Omówione powyżej badania są kontynuowane. Komórki nowotworowe w organizmie pacjenta nie przyjmują rozpłaszczonego kształtu obserwowanego na standardowych płytkach polistyrenowych używanych do hodowli. Dlatego w moich dalszych badaniach planuję wykorzystanie trójwymiarowych hodowli komórkowych (3D), m.in. z wykorzystaniem płytek o niskiej przyczepności, polimerowych rusztowań czy białek macierzy zewnątrzkomórkowej, aby lepiej odzwierciedlić oddziaływania, z którymi mamy do czynienia w guzach. Badania pokazały, że białko YAP ulega aktywacji we wznowach neuroblastoma (Schramm *et al.*, 2015). Dlatego z wykorzystaniem zaplanowanych modeli 3D badane będą szlaki przekazu sygnału w komórkach traktowanych przeciwciałem 14G2a, a w szczególności ścieżka Hippo, której składnikiem jest YAP. Na badania te uzyskałam już wydziałowe dofinansowanie w ramach projektu KNOW (Krajowy Naukowy Ośrodek Wiodący, 2014-2018).

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Pozostałe publikacje, w moim dorobku, do celów niniejszego autoreferatu podzielić można na kilka obszarów tematycznych. Publikacje doświadczalne, które ukazały się w latach 2005-2017 dotyczą przede wszystkim tematyki związanej z neuroblastoma. Dodatkowo jestem autorem lub pierwszym współautorem jeszcze dwóch publikacji przeglądowych w j. polskim i jednego rozdziału w książce w j. angielskim, dotyczących m.in. roli gangliozydów w nowotworach, immunoterapii neuroblastoma czy mimikry molekularnej. Opis osobnej grupy badań zawierają publikacje z lat 2000-2002, obejmujące prace nad szczepionkami przeciwko zakażeniom HIV-1. Wreszcie, jeden artykuł z 2000 r. zawiera wyniki badań nad regulacją poziomu białek, budujących desmosomy w macicy myszy w okresie przed implantacją. Należy podkreślić, że w sumie pozostały dorobek obejmuje 17 publikacji i 1 rozdział w książce. Spośród nich, wszystkie artykuły doświadczalne (w sumie 15) zostały opublikowane w czasopismach, które znajdują się w rankingu Web of Science i w j. angielskim. Współczynniki oddziaływania (IF, dla roku publikacji lub dla 2016 r. w przypadku publikacji z 2017 r.) dla tych czasopism są w zakresie **1,187 - 7,616**, a sumaryczny współczynnik oddziaływania wynosi **48,285**. Te prace doświadczalne w sumie do tej pory cytowane były **291** razy. Dodatkowo sumaryczna liczba punktów $MNiSW_{2016}$ dla 17 czasopism, w których ukazały się wspomniane wyżej publikacje wynosi **420**. Ogółem chciałbym zaznaczyć, że w tych 15 artykułach doświadczalnych: w 4 jestem pierwszym

autorem/lub zajmuję miejsce na równi z pierwszym autorem, w 4 jestem drugim autorem, a dodatkowo w 2 pracach jestem autorem korespondencyjnym. Co więcej, wyniki 7 prac powstały w zespole PGMiW w ramach współpracy z osobami z innych grup badawczych, a 4 podczas moich pobytów w zagranicznych ośrodkach naukowych. Poniżej zamieściłam zwięzłą charakterystykę uzyskanych wyników.

5.1. Wykorzystanie zjawiska mimikry molekularnej gangliozydu GD2 w aktywnej immunoterapii

Aktywna immunoterapia, której celem są gangliozydy musi pokonać ograniczenia związane z niską immunogennością tych TACA, gdyż są one antygenami grasiczoniezależnymi - wzbudzają jedynie słabą odpowiedź odpornościową, głównie w postaci przeciwciał IgM o niskim mianie i powinowactwie (Livingston and Ragupathi, 1997). Dodatkowo, konieczne jest przełamanie tolerancji pacjenta na antygeny własne (np. GD2) przez dobór odpowiedniego schematu szczepień. Jak już wspomniałam, ciekawymi podejściami badawczymi jest zastąpienie gangliozydów, w opracowywanych szczepionkach, przez antygeny zastępcze np. przeciwciała przeciw-idiotypowe czy mimotopy peptydowe.

W tym kontekście, artykuł z 2005 r. z czasopisma „Cancer Research" (IF_{2005} = 7,616; $MNiSW_{2016}$ = 45; praca cytowana 44 razy) zawiera wyniki badań uzyskanych pod kierunkiem wspomnianej już dr Danuty Kozbor z Roswell Park Cancer Institute (Bolesta *et al.*, 2005). Praca zawiera charakterystykę sześciu 15-aminokwasowych peptydów naśladujących GD2, wyłowionych z fagowej biblioteki peptydowej LX-15 przy pomocy przeciwciała 14G2a. Co więcej, zbadano odpowiedź humoralną u myszy po zastosowaniu szczepionki DNA, kodującej sekwencję jednego z peptydów (47LDA) i dwa epitopy dla limfocytów T pomocniczych. Wykazano, że szczepionka taka wzbudzała przeciwciała rozpoznające gangliozyd GD2 w klasie IgG, a ich najwyższy poziom zmierzono po zastosowaniu schematu szczepień łączącego szczepionkę DNA i GD2. Przeciwciała w surowicach od myszy, które otrzymały takie szczepionkami, pośredniczyły w zabijaniu komórek IMR-32 i HT-144 za pośrednictwem dopełniacza. Co ważniejsze, podanie preparatów przeciwciał, uzyskanych z takich surowic, do myszy SCID zahamowało rozwój guzów z komórek melanoma MV3 w porównaniu do zwierząt z grupy, którym podano kontrolne, mysie IgG (Bolesta *et al.*, 2005). Uzyskane wyniki pozwalają lepiej zrozumieć mechanizmy wzbudzania swoistej dla GD2 odpowiedzi przeciwnowotworowej przez mimotopy, w tym wyjaśnić wzajemne związki pomiędzy strukturalnymi uwarunkowaniami obserwowanej mimikry, a funkcjonalną zdolnością peptydów do wzbudzania odpowiedzi swoistej dla tego antygenu.

Warto również wspomnieć, że udział w badaniach nad charakterystyką peptydów naśladujących GD2 i immunoterapią neuroblastoma zaowocował 2 pracami przeglądowymi zamieszczonymi w *Przeglądzie Lekarskim* (Horwacik, 2004; $MNiSW_{2016}$ = 10) i *Postępach Biologii Komórki* (Horwacik, 2005; $MNiSW_{2016}$ = 5), a także przygotowanym na zaproszenie rozdziałem dotyczącym mimikry molekularnej GD2 w książce pt. „Neuroblastoma – Present and Future" (Horwacik i Rokita, 2012).

5.2. Wprowadzenie metody pomiaru zawartości gangliozydu GD2 w surowicach pacjentów z neuroblastoma

Zmiany w glikomie komórek nowotworowych przekładają się na profil gangliozydów w surowicy pacjentów, gdyż te TACA mogą być „zrzucane" (*ang.* shedding) z powierzchni komórek (Valentino *et al.*, 1990).

W 2009 r. w czasopiśmie „Acta Biochimica Polonica" ukazała się publikacja autorstwa Czaplicki *et al.*, a jej tematem była detekcja GD2 w surowicy pacjentów z neuroblastoma (IF_{2009} = 1,262; $MNiSW_{2016}$ = 15; praca cytowana 5 razy). Jest ona efektem współpracy naszego zespołu z grupami prof. dr hab. n. med. Walentyny Balwierz (z Zakładu Onkologii Dziecięcej i Hematologii, Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego Collegium Medicum UJ w Krakowie) i prof. dr hab. Andrzeja Kozika (z Zakładu Biochemii Analitycznej, WBBiB UJ). Zastosowaną metodą była wysokosprawna chromatografia cieczowa. Z jej wykorzystaniem oznaczono zawartość GD2 w 42 próbkach od pacjentów z neuroblastoma, wykazując, że poziom tego glikosfingolipidu spada w czasie leczenia. Zastosowana metoda pomiaru zawartości GD2 jest czuła i ilościowa (Czaplicki *et al.*, 2009).

5.3. Badania nad bezpośrednią cytotoksycznością przeciwciała 14G2a w hodowlach komórek neuroblastoma - pozostałe artykuły

Cztery kolejne prace naszego zespołu, omówione poniżej, dotyczą wprowadzonej już tematyki bezpośredniej cytotoksyczności przeciwciała 14G2a w stosunku do komórek linii neuroblastoma.

Publikacja autorstwa Kowalczyk *et al.* z 2009 r., która ukazała się w czasopiśmie „Cancer Letters" (IF_{2009} = 3,741; $MNiSW_{2016}$ = 35; praca cytowana 25 razy) we współpracy z dr Danutą Kozbor, jest pierwszą z cyklu sześciu artykułów doświadczalnych z tej tematyki w moim dorobku. Zawiera ona badania nad mechanizmem śmierci wzbudzanej przez przeciwciało 14G2a z wykorzystaniem hodowli komórek IMR-32. Stwierdzono, że

przeciwciało to jest internalizowowane po związaniu się do powierzchni komórek. Wykazano, że spadek żywotności komórek traktowanych tym przeciwciałem, ma związek ze wzbudzeniem apoptozy, która jest częściowo hamowana przez inhibitor kaspaz Z-VAD-fmk. Wreszcie doniesiono, że przeciwciało 14G2a użyte w połączeniu z czterema lekami, standardowo stosowanymi w chemioterapii, tj. doksorubicyną, topotekanem, karboplatyną i etopozydem, wzmacnia efekt cytotoksyczny tych leków w stosunku do komórek IMR-32 (Kowalczyk *et al.*, 2009).

Wykorzystanie techniki mikromacierzy pozwoliło naszemu zespołowi na poznanie różnic w transkryptomie dla 3 grup komórek IMR-32, tj. traktowanych przeciwciałem 14G2a, doksorubicyną czy wreszcie oboma czynnikami na raz (po 24 godz., po użyciu przeciwciała w stężeniu 40 μg/ml, a doksorubicyny w stężeniu 15 nM). Badania te zostały opisane w publikacji autorstwa Horwacik *et al.* z 2015 r., która ukazała się w czasopiśmie „Acta Biochimica Polonica" (IF_{2015} = 1,187; $MNiSW_{2016}$ = 15; praca cytowana 2 razy). Wykazano, że 24 transkrypty zmieniały istotnie swój poziom w komórkach IMR-32 traktowanych przeciwciałem 14G2a w tym *PHLDA1*, *JUN* czy *IGFBP4*. W przypadku komórek traktowanych doksorubicyną takich transkryptów było 46. Do ciekawych wyników należy ten wskazujący, że 8 genów, których ekspresja zmieniała się pod wpływem przeciwciała należy do jednej grupy, odpowiedzialnej za regulację metabolizmu RNA. Natomiast, w przypadku komórek traktowanych doksorubicyną geny, które zmieniały swoją ekspresję należały do grup odpowiedzialnych np. za programowaną śmierć komórki, zahamowanie proliferacji czy metabolizm DNA. Badania te pozwoliły na identyfikację genów, których ekspresja zmienia się w komórkach IMR-32 neuroblastoma pod wpływem przeciwciała 14G2a, w tym genów ważnych dla biologii neuroblastoma, takich jak *ID1*, *TLX2* czy *MSX1* (Horwacik *et al.*, 2015a).

Ciekawym podejściem badawczym z publikacji autorstwa Durbas *et al.* z 2015, opublikowanej w czasopiśmie „International Journal of Oncology" (IF_{2015} = 3,018; $MNiSW_{2016}$ = 25; praca cytowana 5 razy) było zastosowanie przez nasz zespól macierzy proteomicznych. Pozwoliło to na analizę czasową zmian poziomu kilkudziesięciu ufosforylowanych białek, w tym receptorowych kinaz tyrozynowych, cytozolowych kinaz tyrozynowych i serynowo-treoninowych czy czynników transkrypcyjnych w komórkach IMR-32 traktowanych przeciwciałem 14G2a. Wykazano wyraźny spadek fosforylacji AKT na S-473 i T-308, co sugeruje zahamowanie aktywności tej kinazy w badanym modelu. Towarzyszyły temu obniżenie poziomu fosforylacji szeregu substratów AKT w tym mTOR (na S-2448). Z obniżeniem poziomu tej ostatniej fosforylacji, hamującej aktywność kinazy

mTOR, dodatkowo korelował spadek fosforylacji dwóch substratów tej kinazy tj. P70 S6 (m.in. na T-389, S-371) i 4EBP-1 (T-37/46). Białka te są zaangażowane w regulację translacji (Durbas *et al.*, 2015). Powyższe wyniki skłoniły nasz zespół do zbadania, czy przeciwciało 14G2a może zwiększyć efekt drobnocząsteczkowych inhibitorów ścieżki przekazu sygnału PI3K/AKT/mTOR, takich jak BEZ-235, SAR245409, LY294002 (inhibitorów PI3K i mTOR) i perifozyny (inhibitora AKT). Wykazano, że komórki linii IMR-32, LA-N-1 i CHP-134 były najbardziej wrażliwe na inhibitor BEZ-235, a obserwowane efekty traktowania oboma czynnikami (tj. inhibitorem i przeciwciałem 14G2a) były zależne zarówno od badanej linii, jak i wrażliwości na użyte związki (Durbas, *et al.*, 2015). Warto podkreślić, że inhibitory ścieżki PI3K/AKT/mTOR są szeroko badane, gdyż aktywność białek tego szlaku ma kluczowe znaczenie dla biologii komórek nowotworowych w tym neuroblastoma. Wykazano także, że inhibitory tej ścieżki obniżają poziom białka MYCN (King *et al.*, 2015).

Ostatnia publikacja z tej tematyki ukazała się w 2016 r. w czasopiśmie „International Journal of Oncology" (IF_{2016} = 3,079; $MNiSW_{2016}$ = 25, cytowana 1 raz). Punktem wyjścia do opisanych w niej doświadczeń był wynik pokazujący wzrost poziomu mRNA i białka genu *PHLDA1* w komórkach IMR-32 traktowanych przeciwciałem 14G2a, co korelowało z indukcją apoptozy (Horwacik *et al.*, 2013). Dlatego nasz zespół przeanalizował, jak na fenotyp komórek linii IMR-32 i wrażliwość tych komórek na przeciwciało 14G2a wpłynie wyciszenie genu *PHLDA1*. Takie wyciszenie skutkowało, np. wzrostem poziomu komórkowego ATP i mitochondrialnego potencjału błonowego czy większą opornością na apoptozę, a na poziomie białek m.in. zmianami fosforylacji AKT, świadczącymi o aktywacji tej kinazy czy wzrostem poziomu kinaz Aurora A i TRKB (Durbas *et al.*, 2016).

Podsumowując, nasze badania pozwoliły na scharakteryzowanie zmian wybranych ścieżek przekazu sygnału pod wpływem przeciwciała 14G2a, a co ważniejsze wskazały na konkretne geny, które stanowią nowe cele badawcze. Badania te pozwoliły także na charakterystykę funkcji białka PHLDA1 komórkach IMR-32. Chociaż wykazanie bezpośredniego oddziaływania PHLDA1 i Aurora A nie było przedmiotem badań, to uzyskane wyniki wskazują na to, że białka te mogą być partnerami w komórkach neuroblastoma i wzajemnie regulować swój poziom. Oprócz powyżej omówionych publikacji, wybrane wyniki z naszych badań były także zaprezentowane podczas szeregu konferencji naukowych w formie wykładów i posterów.

5.4. Wpływ sulforafanu i 3-metyloadeniny na przeżywalność komórek neuroblastoma BE(2)-C

Sulforafan jest aktywną formą glukorafaniny wytwarzaną z użyciem myrozynazy. Związek ten ma szerokie spektrum aktywności w tym przeciwzapalne, przeciwbakteryjne czy przeciwnowotworowe (Kim i Park, 2016). W jeszcze jednej pracy Horwacik *et al.* z 2015 r. z czasopisma „Molecular Medicine Reports" (IF_{2015} = 1,559; $MNiSW_{2016}$ = 20; praca cytowana 2 razy) badano wpływ sulforafanu na przeżycie i śmierć na drodze apoptozy w hodowlach komórek BE(2)-C. Badania prowadzono we współpracy prof. dr hab. Henrykiem Kołoczkiem z Politechniki Krakowskiej im. Tadeusza Kościuszki. Wykazano, że syntetyczny sulforafan hamuje syntezę DNA. Dodatkowo zmierzono obniżenie żywotności badanych komórek, któremu towarzyszyły wzrost aktywności kaspaz i poziomu białka BAX - świadczące o apoptozie, a także proteoliza białka MAP LC3 i przyrost formy MAP LC3B-II - co świadczy o wczesnej autofagii. W tym kontekście użycie inhibitora autofagii 3-metyloadeniny razem z sulforafanem istotnie statystycznie obniżało żywotność komórek w porównaniu do obu związków użytych oddzielnie (Horwacik *et al.*, 2015b).

5.5. Charakterystyka roli genu *MCPIP1* (*ZC3H12A*) w komórkach neuroblastoma

Kolejnym kierunkiem badań, w których uczestniczyłam, było poznanie funkcji nowych genów, ulegających ekspresji pod wpływem cytokin prozapalnych IL-1 i IL-6. Badania te zaowocowały 4 publikacjami z moim współautorstwem. Uczestniczyły w nich, oprócz zespołu PGMiW, grupy dr hab. Anety Kaszy (z Zakładu Biochemii Komórkowej, WBBiB UJ) i prof. dr hab. Jolanty Jury (z Zakładu Biochemii Ogólnej, WBBiB UJ), a także prof. dr hab. Maria Masłowska (z Zakładu Patologii, Pomnik Centrum Zdrowia Dziecka w Warszawie).

Głównym przedmiotem badań było wyjaśnienie roli genu *ZC3H12A* (*MCPIP1*) kodującego białko MCPIP1 (*ang.* monocyte chemoattractant protein-induced protein 1). Jest to białko wielodomenowe - przykładowo zawiera ono domenę palca cynkowego CCCH. Białko to nazwane zostało także regnazą-1, a wśród jego aktywności na podkreślenie zasługuje najlepiej do tej pory przebadana rola RNazy. Zatem jest ono m.in. zaangażowane w ujemną regulację stanu zapalnego (Mao, *et al.*, 2017).

W pracy Kasza *et al.*, która ukazała się w 2010 r. w czasopiśmie „BMC Molecular Biology" (IF_{2010}= 3,188, $MNiSW_{2016}$ = 25; praca cytowana 39 razy), wykazano m.in., że gen *MCPIP1* jest indukowany w makrofagach czy komórkach HepG2 przez interleukinę IL-1β z udziałem czynnika transkrypcyjnego NF-κB i ścieżki MAPK1 (ERK). Nasze badania skupiły

się na analizie regionu od -76 do +60 promotora genu *MCPIP1*. Z wykorzystaniem immunoprecypitacji chromatyny wykazano, że czynniki transkrypcyjne ELK-1 i SRF wiążą się do tego regionu, a traktowanie komórek HepG2 IL-1β prowadzi do fosforylacji ELK-1 (S-383) (Kasza *et al.*, 2010).

W publikacji autorstwa Skalniak *et al.*, która ukazała się w 2014 r. w czasopiśmie „Oncology Reports" (IF_{2014} = 2,301; $MNiSW_{2016}$ = 20; praca cytowana 7 razy) zespół badawczy wykazał m.in. brak ekspresji genu *MCPIP1* w guzach pierwotnych od pacjentów z neuroblastoma - niezależnie od stopnia zaawansowania choroby i poziomu amplifikacji onkogenu *MYCN*. Dodatkowo wykazano, że poziom ekspresji mRNA kodującego MCP-1 i CCR2 (receptora dla MCP-1) w przypadku guzów neuroblastoma w 4 stopniu zaawansowania był statystycznie istotnie niższy w guzach z amplifikacją *MYCN* niż bez tej mutacji. Z użyciem metody qRT-PCR wykazano, że poziom transkryptu kodującego MCPIP-1 był najniższy w komórkach linii neuroblastoma BE(2)-C, IMR-32, HTLA-230 z amplifikacją *MYCN*, a traktowanie tych komórek IL-1β nie podnosiło go, w przeciwieństwie do linii SH-SY-5Y (bez amplifikacji *MYCN*). Ważnym wynikiem było wykazanie, że wymuszona zwiększona produkcja białka MCPIP1 w komórkach BE(2)-C prowadzi do spadku żywotności i proliferacji komórek (Skalniak *et al.*, 2014).

W pracy autorstwa Boratyn *et al.*, która ukazała się w 2016 r. w czasopiśmie „Journal of Cellular Biochemistry" (IF_{2016} = 3,085; $MNiSW_{2016}$ = 25; praca cytowana 4 razy), scharakteryzowano zmiany mRNA i miRNA w komórkach linii neuroblastoma BE(2)-C ze zwiększoną produkcją białka MCPIP1 z wykorzystaniem mikromacierzy i qRT-PCR. Przykładowo poziom transkryptów genów *MBNL2* i *TPX2* przyrastał, a poziom transkryptów genów *SLC44A1* i *CD248* spadał. Wykazano również, że produkcja białka - transportera choliny CTL1 (kodowanego przez gen *SLC44A1* - choline transporter-like protein 1) i transport choliny do komórek ulega zahamowaniu w badanym modelu. Dodatkowo, badania prowadzone w naszym zespole, wskazały również na to, iż poziom miRNA-3613-3p spada w komórkach BE(2)-C ze zwiększonym poziomem MCPIP1, a co więcej rola tego regulatorowego RNA jest przedmiotem dalszych badań w naszej Pracowni (Boratyn *et al.*, 2016).

W pracy Boratyn *et al.* z 2017 r., która ukazała się w także czasopiśmie „Journal of Cellular Biochemistry" (IF_{2016} = 3,085; $MNiSW_{2016}$ = 25; praca cytowana 1 raz), badania naszego zespołu skupiły się na sprawdzeniu wpływu białka MCPIP1 na stabilność MYCN i przekaz sygnału z udziałem ścieżki AKT/mTOR. Co ciekawe, w liniach komórkowych BE(2)-C i Kelly, ze zwiększoną produkcją białka MCPIP-1, zmierzono spadek poziomu

MYCN i zwiększenie się poziomu ufosforylowanego białka MYCN (T-58) - potranslacyjnej modyfikacji tego białka powiązanej z jego degradacją. W komórkach BE(2)-C wykazano także zahamowanie ścieżki AKT/mTOR, a w obu liniach m. in. spadek poziomu białek CDC2, Aurora A, i GSK3β (w formie ufosforylowanej na S-9), które są zaangażowane w regulację stabilności MYCN w komórkach. Dodatkowo pokazano, że w komórkach BE(2)-C zwiększona produkcja MCPIP1 nie prowadzi do aktywacji apoptozy (Boratyn *et al.*, 2017).

Podsumowując, rola białka MCPIP1 nie została jeszcze do końca poznana (Mao *et al.*, 2017). W szczególności nasz zespół badał funkcję tego białka w komórkach neuroblastoma, gdzie gen *MCPIP1* ulega niskiej ekspresji, co sugeruje jego rolę hamującą w procesie nowotworzenia. Dlatego badania pokazujące, że w komórkach neuroblastoma z amplifikacją *MYCN* i ze zwiększoną produkcją MCPIP1, ulega obniżeniu poziom transkryptu i białka genu *MYCN* mają duże znaczenie. Warto podkreślić, że rola MCPIP1 w komórkach rakowych jest obecnie przedmiotem badań i może mieć związek z jego funkcją w regulacji stanu zapalnego.

5.6. Badania nad szczepionkami przeciw zakażeniom HIV-1

Trzy prace z lat 2000-2002 (przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora nauk przyrodniczych), których jestem współautorem, powstały podczas mojego ponad 2-letniego pobytu w zespole dr Danuty Kozbor (Thomas Jefferson University i Temple University, Filadelfia). Badania koncentrowały się na zastosowaniu szczepionek rekombinowanych w terapii zakażeń HIV-1. Zebrane wyniki zostały opublikowane w pracach doświadczalnych w czasopismach „Virology" (Kaneko *et al.*, 2000; IF_{2000} = 3,507; $MNiSW_{2016}$ = 25; praca cytowana 78 razy), „Vaccine" (Wierzbicki *et al.*, 2002; IF_{2002} = 2,811; $MNiSW_{2016}$ = 30; praca cytowana 30 razy) i „Journal of Virology" (Kiszka *et al.*, 2002; IF_{2002} = 5,241; $MNiSW_{2016}$ = 35; praca cytowana 16 razy).

W publikacjach zbadaliśmy szereg czynników, które mają wpływ na odpowiedź odpornościową skierowaną na glikoproteinę otoczkową (gp160) HIV-1, m.in. rodzaj antygenu użytego do szczepień, schemat i drogę immunizacji (np. wykorzystywano szczepionki doustne), zastosowanie szczepionek DNA, wektorów opartych o wirus vaccinia, adjuwantów, nośników (stosowano np. liposomy, ulegające biodegradacji mikrocząsteczki ko-polimeru laktydu i glikolidu) czy wreszcie immunomodulatorów (badano: β-glukan - lentinan czy cytokiny - IL-2/Ig). Humoralna i komórkowa odpowiedź odpornościowa na antygeny HIV-1 była badana z wykorzystaniem modeli mysich (Kaneko *et al.*, 2000; Wierzbicki *et al.*, 2002).

Kolejnym podjętym problemem badawczym było poszerzenie spektrum odpowiedzi odpornościowej skierowanej na walkę z HIV-1 tak, aby była silna i skierowana na wiele

epitopów. Ma to związek z faktem, że jedną z głównych trudności w pracach nad skuteczną szczepionką przeciw HIV-1 jest antygenowa hiperzmienność tych wirusów. Zbadano, poziom i repertuar odpowiedzi limfocytów T cytotoksycznych (CTL) po podaniu szczepionki DNA kodującej gen glikoproteiny otoczkowej (gp160), z którego usunięto fragment kodujący immunodominującą, ale hiperzmienną pętlę V3 (ΔV3), w modelu myszy transgenicznych HLA-A2/K^b. Wykazano, że szczepionka zawierająca zmodyfikowany gen wzbudzała CTL o szerszym repertuarze, a w szczególności większą odpowiedź komórek T skierowaną przeciwko konserwatywnym epitopom prezentowanym w kompleksie z cząsteczkami HLA-A2, w porównaniu do szczepionki DNA kodującej dziki gen gp160 (wt). Co więcej, różnicom tym towarzyszyła większa odporność myszy szczepionych genem kodującym gp160 (ΔV3) na zakażenie rekombinantami wirusa krowianki kodującymi białka gp160 HIV-1 izolatów IIIB i 89.6 (Kiszka *et al.*, 2002).

Na podkreślenie zasługuje bardzo duża liczba cytacji powyższych 3 prac - w sumie 124. Podsumowując, prowadzone badania pozwoliły na poszerzenie wiedzy o schematach szczepień pozwalających na zwiększenie poziomu i poszerzenie zakresu odpowiedzi odpornościowej przeciwko HIV-1.

5.7. Badania nad procesem implantacji u myszy

W 1997 uczestniczyłam w badaniach wspólnie z zespołem dr Grenhama W. Irelanda, w czasie stażu naukowego na University of Manchester (6 miesięcy, w ramach programu TEMPUS-07006). Wyniki tych badania zostały opublikowane w artykule autorstwa Illingworth *et al.* z 2000 r. w czasopiśmie „Biology of Reproduction" (IF_{2000} = 3,605; $MNiSW_{2016}$ = 40; praca 32-krotnie cytowana). Tematyka prowadzonych tam badań dotyczyła procesu implantacji, a w szczególności hormonalnej regulacji ekspresji białek budujących połączenia międzykomórkowe (desmosomy) w nabłonku macicy mysiej. Wykazano obniżenie poziomu mRNA i białka desmoplakiny, a dalej zmian w lokalizacji przestrzennej tego białka w okresie preimplantacji w nabłonku macicy u myszy. Dodatkowo, z użyciem techniki mikroskopii elektronowej wykazano spadek liczby desmosomów w komórkach nabłonka macicy. Zmiany te mogą ułatwiać implantację zarodka (Illingwoth *et al.*, 2000).

6. Podsumowanie

Moje dotychczasowe osiągnięcia naukowo-badawcze można podsumować następująco. Prowadziłam prace doświadczalne od 1996 r. głównie w dziedzinie badań nad biologią komórek nowotworowych i terapii przeciwnowotworowych z wykorzystaniem

modeli neuroblastoma, ale posiadam również w swoim dorobku artykuły doświadczalne z biologii rozrodu czy wirusologii. Odbyłam staże zagraniczne w 4 instytucjach naukowych (w sumie 38 miesięcy): w University of Manchester, Thomas Jefferson University i Temple University w Filadelfii, a także w Gaslini Scientific Institute w Genui. Jestem współautorem 20 doświadczalnych artykułów naukowych i 1 artykułu przeglądowego w j. angielskim, które zostały opublikowane w czasopismach naukowych znajdujących się w rankingu Web of Science. Te prace były cytowane **331** razy (**299** razy bez autocytacji), a mój współczynnik Hirscha (indeks *h*) wynosi **9** (dane odczytane 03.10.2017 r. ze strony Web of Science, **AUTHOR:** Horwacik I *OR* **AUTHOR:** Kiszka I). Sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF) dla czasopism, w których ukazało się wspomniane wyżej 21 prac (dla roku ukazania się publikacji lub 2016 r. w przypadku publikacji z 2017 r.) wynosi **69,304**. Sumaryczna liczba punktów $MNiSW_{2016}$ dla tych czasopism wynosi **575**. Dodatkowo jestem współautorem 1 rozdziału w książce w j. angielskim i autorem 2 artykułów przeglądowych w czasopismach w j. polskim. Zatem po uwzględnieniu tych 2 prac w j. polskim sumaryczna liczba punktów $MNiSW_{2016}$ dla 23 czasopism wynosi **590**.

Jako autor lub pierwszy współautor prezentacji wygłosiłam 18 ustnych wystąpień (wykładów lub krótkich doniesień ustnych). Jestem także współautorem 46 posterów naukowych zaprezentowanych na zjazdach krajowych i zagranicznych. Brałam udział w realizacji 8 wysokonakładowych projektów badawczych w tym w jednym, jako kierownik. Co więcej, jeden z nich był finansowany w ramach 6 Programu Ramowego (FP6-MOBILITY) przez Unię Europejską.

Od 2001 r. prowadzę zajęcia dydaktyczne ze studentami w tym kursy, które koordynuję, a wcześniej samodzielnie przygotowałam, także w j. angielskim. Obejmują one m.in. kursy dotyczące zastosowania peptydowych bibliotek fagowych i genetyki molekularnej nowotworów człowieka, co podkreśla, iż skuteczne łączę naukowe i dydaktyczne obowiązki. Byłam także promotorem 4 prac magisterskich i promotorem pomocniczym w 1 już zakończonym przewodzie doktorskim, a także recenzowałam szereg prac magisterskich. Obecnie jestem promotorem pomocniczym w jednym przewodzie doktorskim (praca w recenzji).

Za osiągnięcia naukowe i dydaktyczne uzyskałam następujące wyróżnienia, m.in. w 2016 r. nagrodę zespołową III stopnia JM Rektora UJ za współautorstwo w cyklu prac naukowych opublikowanych w 2015 r., w 2009 r. nagrodę III stopnia JM Rektora UJ za osiągnięcia dydaktyczne, w 2004 r. stypendium konferencyjne Fundacji na Rzecz Nauki

Polskiej, w 2003 r. nagrodę indywidualną II stopnia JM Rektora UJ za pracę doktorską, a w 2002 r. stypendium Rektorskiego Funduszu Stypendialnego.

7. Literatura

1. Balwierz W. **(2004)** Strategia postępowania w nerwiaku zarodkowym współczulnym. Przegl Lek. 61 Suppl 2:3-8.

2. Battula VL, Shi Y, Evans KW, Wang RY, Spaeth EL, Jacamo RO, Guerra R, Sahin AA, Marini FC, Hortobagyi G, Mani SA, Andreeff M. **(2012)** Ganglioside GD2 identifies breast cancer stem cells and promotes tumorigenesis. J Clin Invest. 122(6):2066-2078. doi: 10.1172/JCI59735

3. Beiske K, Burchill SA, Cheung IY, Hiyama E, Seeger RC, Cohn SL, Pearson AD, Matthay KK International neuroblastoma Risk Group Task Force. **(2009)** Consensus criteria for sensitive detection of minimal neuroblastoma cells in bone marrow, blood and stem cell preparations by immunocytology and QRT-PCR: recommendations by the International Neuroblastoma Risk Group Task Force. Br J Cancer. 100(10):1627-1637. doi: 10.1038/sj.bjc.6605029

4. Bolesta E, Kowalczyk A, Wierzbicki A, Rotkiewicz P, Bambach B, Tsao CY, Horwacik I, Kolinski A, Rokita H, Brecher M, Wang X, Ferrone S, Kozbor D. **(2005)** DNA vaccine expressing the mimotope of GD2 ganglioside induces protective GD2 cross-reactive antibody responses. Cancer Res. 65(8):3410-3418.

5. Bonnycastle LL, Mehroke JS, Rashed M, Gong X, Scott JK. **(1996)** Probing the basis of antibody reactivity with a panel of constrained peptide libraries displayed by filamentous phage. J Mol Biol. 258(5):747-762.

6. Boratyn E, Nowak I, Durbas M, Horwacik I, Sawicka A, Rokita H. **(2017)** MCPIP1 exogenous overexpression inhibits pathways regulating MYCN oncoprotein stability in neuroblastoma. J Cell Biochem. 118(7):1741-1755. doi: 10.1002/jcb.25832

7. Boratyn E, Nowak I, Horwacik I, Durbas M, Mistarz A, Kukla M, Kaczówka P, Łastowska M, Jura J, Rokita H. **(2016)** Monocyte chemoattractant protein-induced protein 1 overexpression modulates transcriptome, including microRNA, in human neuroblastoma cells. J Cell Biochem. 117(3):694-707. doi: 10.1002/jcb.25354

8. Borriello L, Seeger RC, Asgharzadeh S, DeClerck YA. More than the genes, the tumor microenvironment in neuroblastoma. **(2016)** Cancer Lett. 380(1):304-314. doi: 10.1016/j.canlet.2015.11.017

9. Brodeur GM Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. **(2003)** Nat Rev Cancer. 3(3):203-216.

10. Cheever MA, Allison JP, Ferris AS, Finn OJ, Hastings BM, Hecht TT, Mellman I, Prindiville SA, Viner JL, Weiner LM, Matrisian LM. **(2009)** The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. Clin Cancer Res. 15(17):5323-3537. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0737

11. Cheresh DA, Pierschbacher MD, Herzig MA, Mujoo K. **(1986)** Disialogangliosides GD2 and GD3 are involved in the attachment of human melanoma and neuroblastoma cells to extracellular matrix proteins. J Cell Biol. 102(3):688-696.

12. Chester MA. **(1998)** IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature of glycolipids--recommendations 1997. Eur J Biochem. 257(2):293-298.

13. Cheung NK i Dyer MA. Neuroblastoma: developmental biology, cancer genomics and immunotherapy. **(2013)** Nat Rev Cancer. 13(6):397-411. doi: 10.1038/nrc3526.

14. Cheung NK, Guo HF, Heller G, Cheung IY. **(2000)** Induction of Ab3 and Ab3' antibody was associated with long-term survival after anti-G(D2) antibody therapy of stage 4 neuroblastoma. Clin Cancer Res. J6(7):2653-2660.

15. Cochonneau D, Terme M, Michaud A, Dorvillius M, Gautier N, Frikeche J, Alvarez-Rueda N, Bougras G, Aubry J, Paris F, Birklé S. **(2013)** Cell cycle arrest and apoptosis induced by O-acetyl-GD2-specific monoclonal

antibody 8B6 inhibits tumor growth in vitro and in vivo. Cancer Lett. 333(2):194-204. doi: 10.1016/j.canlet.2013.01.032

16. Cohn SL, Pearson AD, London WB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GM, Faldum A, Hero B, Iehara T, Machin D, Mosseri V, Simon T, Garaventa A, Castel V, Matthay KK; INRG Task Force. **(2009)** The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. J Clin Oncol. 27(2):289-297. doi: 10.1200/JCO.2008.16.6785

17. Cole KA i Maris JM. **(2012)** New strategies in refractory and recurrent neuroblastoma: translational opportunities to impact patient outcome. Clin Cancer Res. 18(9):2423-2428. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1409

18. Czaplicki D, Horwacik I, Kowalczyk A, Wieczorek A, Bolek-Marzec K, Balwierz W, Kozik A, Rokita H. **(2009)** New method for quantitative analysis of GD2 ganglioside in plasma of neuroblastoma patients. Acta Biochim Pol. 56(3):423-431.

19. Daniotti JL, Vilcaes AA, Torres Demichelis V, Ruggiero FM, Rodriguez-Walker M. **(2013)** Glycosylation of glycolipids in cancer: basis for development of novel therapeutic approaches. Front Oncol. 3:306. doi: 10.3389/fonc.2013.00306

20. David K, Ollert MW, Vollmert C, Heiligtag S, Eickhoff B, Erttmann R, Bredehorst R, Vogel CW. **(1999)** Human natural immunoglobulin M antibodies induce apoptosis of human neuroblastoma cells by binding to a Mr 260,000 antigen. Cancer Res. 59(15):3768-3775.

21. DuBois SG, Marachelian A, Fox E, Kudgus RA, Reid JM, Groshen S, Malvar J, Bagatell R, Wagner L, Maris JM, Hawkins R, Courtier J, Lai H, Goodarzian F, Shimada H, Czarnecki S, Tsao-Wei D, Matthay KK, Mosse YP. **(2016)** phase i study of the aurora a kinase inhibitor alisertib in combination with irinotecan and temozolomide for patients with relapsed or refractory neuroblastoma: a NANT (new approaches to neuroblastoma therapy) trial. J Clin Oncol. 34(12):1368-1375. doi: 10.1200/JCO.2015.65.4889

22. Durbas M, Horwacik I, Boratyn E, Kamycka E, Rokita H. **(2015)** GD2 ganglioside specific antibody treatment downregulates PI3K/Akt/mTOR signaling network in human neuroblastoma cell lines. Int J Oncol. 47(3):1143-1159. doi: 10.3892/ijo.2015.3070

23. Durbas M, Horwacik I, Boratyn E, Rokita H. **(2016)** Downregulation of the PHLDA1 gene in IMR-32 neuroblastoma cells increases levels of Aurora A, TRKB and affects proteins involved in apoptosis and autophagy pathways. Int J Oncol. 49(2):823-837. doi: 10.3892/ijo.2016.3572

24. Fleurence J, Fougeray S, Bahri M, Cochonneau D, Clémenceau B, Paris F, Heczey A, Birklé S. **(2017)** Targeting O-Acetyl-GD2 Ganglioside for Cancer Immunotherapy. J Immunol Res. 2017:5604891. doi: 10.1155/2017/5604891

25. Gillies SD, Lo KM, Wesolowski J. **(1989)** High-level expression of chimeric antibodies using adapted cDNA variable region cassettes. J Immunol Methods. 125(1-2):191-202.

26. Gotwals P, Cameron S, Cipolletta D, Cremasco V, Crystal A, Hewes B, Mueller B, Quaratino S, Sabatos-Peyton C, Petruzzelli L, Engelman JA, Dranoff G. **(2017)** Prospects for combining targeted and conventional cancer therapy with immunotherapy. Nat Rev Cancer. 17(5):286-301. doi: 10.1038/nrc.2017.17

27. Hamzeh-Mivehroud M, Alizadeh AA, Morris MB, Church WB, Dastmalchi S. **(2017)** Phage display as a technology delivering on the promise of peptide drug discovery. Drug Discov Today. 18(23-24):1144-1157. doi: 10.1016/j.drudis.2013.09.001

28. Hayashida N, Inouye S, Fujimoto M, Tanaka Y, Izu H, Takaki E, Ichikawa H, Rho J, Nakai A. **(2006)** A novel HSF1-mediated death pathway that is suppressed by heat shock proteins. EMBO J. 25(20):4773-4783.

29. Hernández AM, Rodríguez N, González JE, Reyes E, Rondón T, Griñán T, Macías A, Alfonso S, Vázquez AM, Pérez R. **(2011)** Anti-NeuGcGM3 antibodies, actively elicited by idiotypic vaccination in nonsmall cell lung cancer patients, induce tumor cell death by an oncosis-like mechanism. J Immunol. 186(6):3735-3744. doi: 10.4049/jimmunol.1000609

30. Hettmer S, Malott C, Woods W, Ladisch S, Kaucic K. **(2003)** Biological stratification of human neuroblastoma by complex "B" pathway ganglioside expression. Cancer Res. 63(21):7270-7276.

31. Horwacik I i Rokita H. **(2012)** Application of Molecular Mimicry to Target GD2 Ganglioside, Neuroblastoma - Present and Future, Prof. Hiroyuki Shimada (edytor), InTech, doi: 10.5772/30020

32. Horwacik I i Rokita H. (2015) Targeting of tumor-associated gangliosides with antibodies affects signaling pathways and leads to cell death including apoptosis. Apoptosis. 20(5):679-688. doi: 10.1007/s10495-015-1103-7110

33. Horwacik I 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(5):1899-1914. doi: 10.3892/ijo.2017.3959

34. 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(5):829-839.

35. Horwacik I, Durbas M, Boratyn E, Sawicka A, Węgrzyn P, Krzanik S, Górka A, Drożniak J, Augustyniak E, Kowalczyk A, Rokita H. **(2015a)** Analysis of genes involved in response to doxorubicin and a GD2 ganglioside-specific 14G2a monoclonal antibody in IMR-32 human neuroblastoma cells. Acta Biochim Pol. 62(3):423-433. doi: 10.18388/abp.2015_1035

36. 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(2):248-264. doi: 10.1016/j.canlet.2013.08.018

37. Horwacik I, Gaik M, Durbas M, Boratyn E, Zając G, Szychowska K, Szczodrak M, Kołoczek H, Rokita H. **(2015b)** Inhibition of autophagy by 3-methyladenine potentiates sulforaphane-induced cell death of BE(2)-C human neuroblastoma cells. Mol Med Rep. 12(1):535-542. doi: 10.3892/mmr.2015.3377

38. Horwacik I, Golik P, Grudnik P, Kolinski M, Zdżalik M, Rokita H, Dubin G. (2015c) Structural basis of GD2 ganglioside and mimetic peptide recognition by 14G2a antibody. Mol Cell Proteomics. 14(10):2577-2590. doi: 10.1074/mcp.M115.052720

39. 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(1):47-57. doi: 10.3892/ijmm.2011.655

40. Horwacik I. **(2004)** Gangliozydy jako antygeny węglowodanowe związane z nowotworami i możliwość ich zastosowania w immunoterapii chorób nowotworowych. Przegl Lek. 61 Suppl 2:14-9.

41. Horwacik I. **(2005)** Perspektywy zastosowania immunoterapii w leczeniu neuroblastoma. Postępy Biologii Komórki, 32(1), 97-109.

42. Illingworth IM, Kiszka I, Bagley S, Ireland GW, Garrod DR, Kimber SJ. **(2000)** Desmosomes are reduced in the mouse uterine luminal epithelium during the preimplantation period of pregnancy: a mechanism for facilitation of implantation. Biol Reprod. 63(6):1764-1773.

43. Johnson EO, Chang KH, de Pablo Y, Ghosh S, Mehta R, Badve S, Shah K. **(2011)** PHLDA1 is a crucial negative regulator and effector of Aurora A kinase in breast cancer. J Cell Sci. 124(Pt 16):2711-2722. doi: 10.1242/jcs.084970

44. Kaneko H, Bednarek I, Wierzbicki A, Kiszka I, Dmochowski M, Wasik TJ, Kaneko Y, Kozbor D. **(2000)** Oral DNA vaccination promotes mucosal and systemic immune responses to HIV envelope glycoprotein. Virology. 267(1):8-16.

45. Kasza A, Wyrzykowska P, Horwacik I, Tymoszuk P, Mizgalska D, Palmer K, Rokita H, Sharrocks AD, Jura J. **(2010)** Transcription factors Elk-1 and SRF are engaged in IL1 dependent regulation of ZC3H12A expression. BMC Mol Biol. 11:14. doi: 10.1186/1471-2199-11-14

46. Katayama H, Sasai K, Kawai H, Yuan ZM, Bondaruk J, Suzuki F, Fujii S, Arlinghaus RB, Czerniak BA, Sen S. **(2004)** Phosphorylation by aurora kinase A induces Mdm2-mediated destabilization and inhibition of p53. Nat Genet. 2004 Jan;36(1):55-62.

47. Kieber-Emmons T, Saha S, Pashov A, Monzavi-Karbassi B, Murali R. **(2014)** Carbohydrate-mimetic peptides for pan anti-tumor responses. Front Immunol. 5:308. doi: 10.3389/fimmu.2014.00308

48. Kim JK i Park SU. **(2016)** Current potential health benefits of sulforaphane. EXCLI J. 15:571-577. doi: 10.17179/excli2016-485

49. King D, Yeomanson D, Bryant HE. **(2015)** PI3King the lock: targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway as a novel therapeutic strategy in neuroblastoma. J Pediatr Hematol Oncol. 37(4):245-251. doi: 10.1097/MPH.0000000000000329

50. Kiszka I, Kmieciak D, Gzyl J, Naito T, Bolesta E, Sieron A, Singh SP, Srinivasan A, Trinchieri G, Kaneko Y, Kozbor D. **(2002)** Effect of the V3 loop deletion of envelope glycoprotein on cellular responses and protection against challenge with recombinant vaccinia virus expressing gp160 of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates. J Virol. 76(9):4222-4232.

51. Kowalczyk A, Gil M, Horwacik I, Odrowaz Z, Kozbor D, Rokita H. **(2009)** The GD2-specific 14G2a monoclonal antibody induces apoptosis and enhances cytotoxicity of chemotherapeutic drugs in IMR-32 human neuroblastoma cells. Cancer Lett. 281(2):171-182. doi: 10.1016/j.canlet.2009.02.040

52. Krengel U i Bousquet PA. **(2014)** Molecular recognition of gangliosides and their potential for cancer immunotherapies. Front Immunol. 5:325. doi: 10.3389/fimmu.2014.00325

53. Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Bast RC Jr., Gansler TS, Holland JF, MD, Frei E, III (edytorzy) **(2003)** Holland-Frei Cancer Medicine, 6th edition, Hamilton (ON): BC Decker; ISBN-10: 1-55009-213-8.

54. Livingston PO i Ragupathi G. **(1997)** Carbohydrate vaccines that induce antibodies against cancer. 2. Previous experience and future plans. Cancer Immunol Immunother. 45(1):10-19.

55. Makhoul I, Hutchins L, Emanuel PD, Pennisi A, Siegel E, Jousheghany F, Monzavi-Karbassi B, Kieber-Emmons T. **(2015)** Moving a Carbohydrate Mimetic Peptide into the clinic. Hum Vaccin Immunother. 11(1):37-44. doi: 10.4161/hv.34300

56. Mao R, Yang R, Chen X, Harhaj EW, Wang X, Fan Y. **(2017)** Regnase-1, a rapid response ribonuclease regulating inflammation and stress responses. Cell Mol Immunol. 14(5):412-422. doi: 10.1038/cmi.2016.70

57. Maris JM. **(2009)** Unholy matrimony: Aurora A and N-Myc as malignant partners in neuroblastoma. Cancer Cell. 15(1):5-6. doi: 10.1016/j.ccr.2008.12.008

58. Otto T, Horn S, Brockmann M, Eilers U, Schüttrumpf L, Popov N, Kenney AM, Schulte JH, Beijersbergen R, Christiansen H, Berwanger B, Eilers M. **(2009)** Stabilization of N-Myc is a critical function of Aurora A in human neuroblastoma. Cancer Cell. 15(1):67-78. doi: 10.1016/j.ccr.2008.12.005

59. Ratner N, Brodeur GM, Dale RC, Schor NF. **(2016)** The "neuro" of neuroblastoma: Neuroblastoma as a neurodevelopmental disorder. Ann Neurol. 80(1):13-23. doi: 10.1002/ana.24659

60. Schramm A, Köster J, Assenov Y, Althoff K, Peifer M, Mahlow E, Odersky A, Beisser D, Ernst C, Henssen AG, Stephan H, Schröder C, Heukamp L, Engesser A, Kahlert Y, Theissen J, Hero B, Roels F, Altmüller J, Nürnberg P, Astrahantseff K, Gloeckner C, De Preter K, Plass C, Lee S, Lode HN, Henrich KO, Gartlgruber M, Speleman F, Schmezer P, Westermann F, Rahmann S, Fischer M, Eggert A, Schulte JH. **(2015)** Mutational dynamics between primary and relapse neuroblastomas. Nat Genet. 47(8):872-877. doi: 10.1038/ng.3349

61. Seguin L, Desgrosellier JS, Weis SM, Cheresh DA. **(2015)** Integrins and cancer: regulators of cancer stemness, metastasis, and drug resistance. Trends Cell Biol. 25(4):234-240. doi: 10.1016/j.tcb.2014.12.006

62. Shen M, Gong F, Pang P, Zhu K, Meng X, Wu C, Wang J, Shan H, Shuai X. **(2012)** An MRI-visible non-viral vector for targeted Bcl-2 siRNA delivery to neuroblastoma. Int J Nanomedicine. 7:3319-3332. doi: 10.2147/IJN.S32900

63. Shohet J i Foster J. **(2017)** Neuroblastoma. BMJ. 357:j1863. doi: 10.1136/bmj.j1863

64. Skalniak A, Boratyn E, Tyrkalska SD, Horwacik I, Durbas M, Łastowska M, Jura J, Rokita H. **(2014)** Expression of the monocyte chemotactic protein-1-induced protein 1 decreases human neuroblastoma cell survival. Oncol Rep. 31(5):2385-2392. doi: 10.3892/or.2014.3076

65. Smith GP i Petrenko VA. **(1997)** Phage Display. Chem Rev. 97(2):391-410.

66. Smith GP. **(1985)** Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. Science. 228(4705):1315-1317.

67. Soliman C, Yuriev E, Ramsland PA. **(2017)** Antibody recognition of aberrant glycosylation on the surface of cancer cells. Curr Opin Struct Biol. 44:1-8. doi: 10.1016/j.sbi.2016.10.009

68. Tang A, Gao K, Chu L, Zhang R, Yang J, Zheng J. **(2017)** Aurora kinases: novel therapy targets in cancers. Oncotarget. 8(14):23937-23954. doi: 10.18632/oncotarget.14893

69. Tapryal S, Gaur V, Kaur KJ, Salunke DM. **(2013)** Structural evaluation of a mimicry-recognizing paratope: plasticity in antigen-antibody interactions manifests in molecular mimicry. J Immunol. 191(1):456-463. doi: 10.4049/jimmunol.1203260

70. Valentino L, Moss T, Olson E, Wang HJ, Elashoff R, Ladisch S. **(1990)** Shed tumor gangliosides and progression of human neuroblastoma. Blood. 75(7):1564-1567.

71. Vázquez AM, Gabri MR, Hernández AM, Alonso DF, Beausoleil I, Gomez DE, Pérez R. **(2000)** Antitumor properties of an anti-idiotypic monoclonal antibody in relation to N-glycolyl-containing gangliosides. Oncol Rep. 7(4):751-756.

72. Vyas NK, Vyas MN, Chervenak MC, Bundle DR, Pinto BM, Quiocho FA. **(2003)** Structural basis of peptide-carbohydrate mimicry in an antibody-combining site. Proc Natl Acad Sci U S A. 100(25):15023-15028.

73. Wierzbicki A, Kiszka I, Kaneko H, Kmieciak D, Wasik TJ, Gzyl J, Kaneko Y, Kozbor D. **(2002)** Immunization strategies to augment oral vaccination with DNA and viral vectors expressing HIV envelope glycoprotein. Vaccine. 20(9-10):1295-1307.

74. Young SA, McCabe KE, Bartakova A, Delaney J, Pizzo DP, Newbury RO, Varner JA, Schlaepfer DD, Stupack DG. **(2015)** Integrin α4 enhances metastasis and may be associated with poor prognosis in MYCN-low neuroblastoma. PLoS One. 10(5):e0120815. doi: 10.1371/journal.pone.0120815

75. Yu AL, Gilman AL, Ozkaynak MF, London WB, Kreissman SG, Chen HX, Smith M, Anderson B, Villablanca JG, Matthay KK, Shimada H, Grupp SA, Seeger R, Reynolds CP, Buxton A, Reisfeld RA, Gillies SD, Cohn SL, Maris JM, Sondel PM; Children's Oncology Group. **(2010)** Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. N Engl J Med. 363(14):1324-1334. doi: 10.1056/NEJMoa0911123

76. Yu RK, Tsai YT, Ariga T, Yanagisawa M. **(2011)** Structures, biosynthesis, and functions of gangliosides--an overview. J Oleo Sci. 60(10):537-544.

Kraków, 16 października 2017 r. Irena Nowacik