



**SZKOŁA DOKTORSKA
BioMedChem**

Uniwersytetu Łódzkiego
i Instytutów Polskiej
Akademii Nauk w Łodzi



Katarzyna Weronika Horodecka

Praca doktorska:

**Analiza funkcjonalna RAB27 w liniach
komórkowych czerniaka: wydzielanie
małych pęcherzyków
zwnętrzkomórkowych, migracja,
inwazja i sygnalizacja komórkowa**

Doctoral thesis:

**Functional analysis of RAB27 in
melanoma cell lines: small extracellular
vesicle secretion, migration, invasion and
cell signaling**

- Promotor/Supervisor
prof. dr hab. Magdalena Klink
Instytut Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk
- Promotor pomocniczy/Assistant Supervisor
dr Liliana Czernek
Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych
Polskiej Akademii Nauk

Łódź, 2024

Praca wykonana w Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk w ramach realizacji grantu Narodowego Centrum Nauki, OPUS 18 nr. 2019/35/B/NZ7/03256, pt. : „Modulowanie produkcji egzosomów jako element wspierający terapię przeciwnowotworową”.
Kierownik projektu: dr Liliana Czernek

Życiorys naukowy

Wykształcenie

- Uniwersytet Łódzki

Kierunek: Biotechnologia

Specjalizacja: Biotechnologiczna medyczna

X 2017 – VI 2019

Poziom wykształcenia: magister

Tytuł pracy: “Nanocząstki srebra modyfikowane powierzchniowo jako nośniki siRNA w terapii przeciwnowotworowej”

- Uniwersytet Łódzki

Kierunek: Biotechnologia

X 2017 – VII 2020

Poziom wykształcenia: licencjat

Tytuł pracy: “Nanomedycyna w walce z nowotworami: możliwości i ograniczenia”

Wykaz osiągnięć w pracy naukowo-badawczej

Publikacje zawierające wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej

1. Horodecka K, Czernek L, Pęczek Ł, Klink M (2025) Revealing the role of RAB27 in HER receptor family expression and signaling in melanoma cells. Cell Communication and Signaling – in press **(140 pkt MNiSW; IF = 8,2)**
2. Horodecka K, Czernek L, Pęczek Ł, Gadzinowski M, Klink M (2024) Impact of Rab27 on Melanoma Cell Invasion and sEV Secretion. Int J Mol Sci 25(22), 12433 **(140 pkt MNiSW; IF = 4,9)**

Pozostałe publikacje oryginalne

1. Abashkin V, Pędziwiatr-Werbicka E, Horodecka K, Zhogla V, Ulashchik E, Shmanai V, Shcharbin D, Bryszewska M (2023) Silver Nanoparticles Modified by Carbosilane Dendrons and PEG as Delivery Vectors of Small Interfering RNA. Int J Mol Sci 24(1):840 **(140 pkt MNiSW; IF = 5,640)**

2. Cypryk W, Czernek L, Horodecka K, Chrzanowski J, Stańczak M, Nurmi K, Bilicka M, Gadzinowski M, Walczak-Drzewiecka A, Stensland M, Eklund K, Fendler W, Nyman TA, Matikainen S (2023) Lipopolysaccharide Primes Human Macrophages for Noncanonical Inflammasome-Induced Extracellular Vesicle Secretion. *J Immunol* 210(3):322-334 **(140 pkt MNiSW; IF = 4,4)**
3. Pędziwiatr-Werbicka E, Gorzkiewicz M, Horodecka K, Lach D, Barrios-Gumiel A, Sánchez-Nieves J, Gómez R, de la Mata FJ, Bryszewska M (2021) PEGylation of Dendronized Gold Nanoparticles Affects Their Interaction with Thrombin and siRNA. *J Phys Chem B*. 125(4):1196-1206 **(140 pkt MNiSW; IF = 2,991)**
4. Pędziwiatr-Werbicka E, Gorzkiewicz M, Horodecka K, Abashkin V, Klajnert-Maculewicz B, Peña-González CE, Sánchez-Nieves J, Gómez R, de la Mata FJ, Bryszewska M (2020) Silver Nanoparticles Surface-Modified with Carbosilane Dendrons as Carriers of Anticancer siRNA. *Int J Mol Sci*. 21(13):4647. **(140 pkt MNiSW; IF = 4,556)**

Publikacje przeglądowe

1. Horodecka K, Döchler M (2021) CRISPR/Cas9: Principle, Applications, and Delivery through Extracellular Vesicles. *Int J Mol Sci* 22(11):6072 **(140 pkt MNiSW; IF = 5,923)**
2. Pędziwiatr-Werbicka E, Horodecka K, Shcharbin D, Bryszewska M (2021) Nanoparticles in Combating Cancer: Opportunities and Limitations: A Brief Review. *Curr Med Chem* 28(2):346-359 **(100 pkt MNiSW; IF = 4,53)**

Doniesienia konferencyjne

1. Horodecka K, Czernek L, Pęczek Ł, Klink M (2024) Unraveling the Role of Rab27 in Melanoma Signaling Pathways. The 48th FEBS Congress, Mediolan, Włochy – poster
2. Horodecka K, Czernek L, Pęczek Ł, Klink M (2023) Functional implication of Rab27 in pro-invasive status of melanoma cells. ASCB Cell Bio 2023, Boston, USA – poster
Abstrakt opublikowany w: *Mol Biol Cell* 3075 (abstract B373/P1360) **(100 pkt MNiSW; IF = 3,1)**
3. Horodecka K, Czernek L, Pęczek Ł, Klink M (2023) The role of Rab27 in melanoma cell invasion and exosomal secretion. The 47th FEBS Congress, Tours, Francja – prezentacja ustna
Abstrakt opublikowany w *FEBS Open Bio* 13: 2-60 (abstract 13: SpT-04.1-1). **(70 pkt MNiSW; IF = 2,6)**
4. Horodecka K, Czernek L, Pęczek Ł, Döchler M (2022) Unexpected production of small extracellular vesicles in Rab27a/Rab27b knockout A375 melanoma cells. Recent insights into Immunology, Leuven, Belgia – poster
5. Horodecka K, Czernek L, Pęczek Ł, Döchler M (2021) Rab27a knockout in a melanoma cell line. 25th Gliwice Scientific Meetings, Gliwice, Polska – poster

Wprowadzenie

Czerniak jest złośliwym nowotworem wywodzącym się z melanocytów, czyli komórek produkujących melanicę. Najczęstszą postacią czerniaka jest postać skórna, która jest jednocześnie najbardziej śmiertelnym typem tego nowotworu złośliwego. Wcześniej wykryty czerniak jest prawie całkowicie wyleczalny, jednak w zaawansowanym stopniu tego nowotworu odsetek przeżywalności jest niski. Oprócz leczenia chirurgicznego stosowana jest terapia celowana z użyciem inhibitorów BRAF i MEK oraz immunoterapia przeciwciałami skierowanymi przeciwko CTLA-4 i PD-1, jednak skuteczność tego postępowania jest ograniczona ze względu na wrodzoną lub nabytą oporność na leczenie (Fisher i Bastian 2019, Schadendorf i wsp. 2015). Dlatego wciąż poszukuje się nowych molekularnych celów terapeutycznych, które mogłyby stanowić wsparcie w terapii czerniaka.

Głównym celem niniejszej pracy było poznanie roli RAB27 w komórkach czerniaka. Białko to występuje w postaci izoform RAB27A i RAB27B, o identyczności aminokwasów w 71% i odgrywa ważne role w procesach fizjologicznych i patologicznych. Szczególne zainteresowanie budzi rola RAB27 w wielu różnych typach nowotworów, którą potwierdzają liczne doniesienia literaturowe (Tsukuba i wsp. 2021, Homma i wsp. 2021). Jednym z kluczowych mechanizmów, który przypisywany jest pro-nowotworowej funkcji RAB27 jest promowanie sekrecji małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (sEVs) przez komórki nowotworowe. Uwalniane pęcherzyki transportują ładunek w postaci onkogennych kwasów nukleinowych i białek, co umożliwia komunikację pomiędzy komórkami nowotworowymi, mikrośrodowiskiem guza i odległymi tkankami. Transport pęcherzykowy przyczynia się do powstawania niszy premetastatycznej, transformacji nowotworowej komórek prawidłowych czy immunosupresji. Jednakże niezależnie od sekrecji sEVs, RAB27 wpływa także na wydzielanie rozpuszczalnych czynników promujących progresję nowotworu (np. cytokin, metaloproteinaz), a także moduluje funkcje komórek takie jak ich proliferacja czy migracja (Bobrie i wsp. 2012, Li i wsp. 2018). Jednakże rola RAB27 w czerniaku nie jest w pełni poznana, a dotychczasowe wyniki prowadzonych badań są niejednoznaczne. Szczególne kontrowersje budzi potencjalne zahamowanie uwalniania sEVs na skutek wyciszenia genu RAB27A i/lub RAB27B (Guo i wsp. 2019, Li i wsp. 2019, Peinado i wsp. 2012). Dlatego dalsze badania nad tym mechanizmem, a także ocena wpływu RAB27 na pozostałe, niezależne od sEVs, funkcje komórek pozwolą na lepsze zrozumienie znaczenia tego białka w czerniaku oraz ocenę jego potencjalnego zastosowania jako molekularnego celu terapeutycznego.

Cel pracy

Celem pracy była weryfikacja dwóch hipotez badawczych:

1. RAB27A bierze czynny udział w aktywności funkcjonalnej komórek czerniaka, związanej z progresją nowotworu.
2. RAB27A wpływa na ekspresję i aktywność wybranych białek zaangażowanych w nowotworzenie i/lub progresję nowotworu.

Realizacja tych postanowień była możliwa dzięki wyciszeniu ekspresji RAB27A metodą CRISPR/Cas9 w liniach komórkowych SkMel28, DMBC12 i A375, różniących się stopniem inwazyjności. Postanowiono również ocenić potencjalne kompensacyjne działanie drugiej izoformy białka RAB27 - RAB27B w komórkach czerniaka. W tym celu przygotowano linię komórkową A375 z wyciszoną ekspresją RAB27A/B.

Aby zweryfikować hipotezy wyznaczono poniższe cele badawcze:

- Ocena uwalniania małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych przez linie komórkowe czerniaka typu dzikiego i z nokautem RAB27A lub RAB27A/B.
- Ocena proliferacji, migracji i inwazji linii komórkowych czerniaka typu dzikiego i z nokautem RAB27A lub RAB27A/B.
- Ocena ekspresji białek będących produktami protoonkogenów oraz białek zaangażowanych w progresję nowotworu w liniach komórkowych czerniaka typu dzikiego i z nokautem RAB27A lub RAB27A/B.
- Ocena ekspresji receptorów z rodziny HER w liniach komórkowych czerniaka typu dzikiego i z nokautem RAB27A lub RAB27A/B.
- Ocena aktywności receptorów z rodziny HER na podstawie stopnia fosforylacji białek docelowych należących do szlaków sygnałowych PI3K/AKT i RAS/RAF/MEK/ERK w liniach komórkowych czerniaka typu dzikiego i z nokautem RAB27A lub RAB27A/B.

Metodyka badawcza i wyniki

Badania prowadzono na komórkach trzech linii czerniaka – dostępnych komercyjnie A375 i SkMel28 oraz linii DMBC12, którą wyprowadzono ze zmiany pierwotnej czerniaka guzkowego skóry, otrzymaną od Zakładu Biologii Molekularnej Nowotworów Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Wszystkie linie charakteryzują się wzrostem adherentnym, jednak z danych literaturowych i obserwacji własnych wynika, że różnią się one poziomem inwazyjności (Rossi i wsp. 2018). Bazowy poziom mRNA

i białka RAB27A, oceniony odpowiednio metodami qRT-PCR i Western blot, jest znacząco wyższy w komórkach linii SkMel28, natomiast niższy i porównywalny w komórkach DMBC12 i A375.

Aby ocenić funkcje w komórkach czerniaka pełnione przez RAB27A otrzymano linie komórkowe z nokautem (KO) tego genu metodą CRISPR/Cas9. Linie te oznaczono jako SkMel28 *RAB27A* KO, DMBC12 *RAB27A* KO, A375 *RAB27A* KO. Dodatkowo, aby ocenić potencjalny mechanizm kompensacji działania jednej izoformy RAB27 przez drugą otrzymano także linię komórkową A375 z podwójnym nokautem (dKO) *RAB27A* i *RAB27B* – A375 *RAB27A/B* KO. Wydajność transfekcji i powstanie mutacji na skutek działania nukleazy Cas9 oceniono metodą enzymatyczną z zastosowaniem T7 endonukleazy I. Na podstawie trawienia produktów PCR zidentyfikowano krótsze fragmenty DNA, wskazujące na obecność mutacji typu insercja/delecja, które są selektywnie rozpoznawane i przecinane przez endonukleazę. Następnie wyizolowano i namnożono pojedyncze komórki, w celu otrzymania homogennych linii komórkowych. Wyciszenie ekspresji RAB27A lub RAB27A/B zweryfikowano metodą Western blot, a w celu potwierdzenia wystąpienia mutacji w miejscu docelowym wykorzystano sekwencjonowanie Sangera. Do dalszych badań wybrano klony o najwyższej wydajności edycji genów, obliczonych algorytmami TIDE oraz ICE Synthego.

Badania przeprowadzono w trzech etapach. W pierwszym oceniano udział białek RAB27A i B w uwalnianiu małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych przez komórki czerniaka. Analiza śledzenia nanocząstek (Nanoparticle Tracking Analysis, NTA) pozwoliła na zmierzenie liczby i rozmiaru sEVs. Ich średnica, w zależności od linii komórkowej, wynosiła od ~119 do ~145 nm, co jest zgodne z wymiarami typowymi dla małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Średni rozmiar sEVs uwalnianych przez komórki typu dzikiego (WT) i *RAB27A* KO był porównywalny. Średnica sEVs pochodzących z komórek A375 WT i KO była mniejsza, niż pęcherzyków z komórek DMBC12 i SkMel28 WT i KO. Liczba małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych izolowana z pożywki kondycjonowanej komórek typu dzikiego i *RAB27A* KO była zbliżona, chociaż komórki SkMel28, zarówno WT, jak i KO, uwalniały ich znacząco więcej, w porównaniu do komórek pozostałych linii.

Następnie przeanalizowano poziom białek charakterystycznych dla małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych: tetraspanin (CD63, CD81) i białek ESCRT (Alix i TSG101) w sEVs i lizatach komórkowych metodą Western blot. Zaobserwowano znaczące różnice w ekspresji białek, jednak były one zależne od linii komórkowej. W sEVs uwalnianych przez komórki DMBC12 *RAB27A* KO poziom wszystkich badanych markerów był obniżony. Z kolei ilość TSG101 była zwiększona w pęcherzykach wydzielanych przez komórki SkMel28 KO, a wzrost poziomu TSG101 i CD63 wystąpił w sEVs pochodzących z komórek A375 KO.

Analogiczne badania przeprowadzono dla małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych uwalnianych przez komórki A375 z podwójnym nokautem *RAB27A/B*. Rozmiar oraz liczba sEVs, analizowane za pomocą NTA, były porównywalne. Natomiast zaszły zmiany w poziomie białek

stanowiących markery sEVs. Wzrost tetraspaniny CD63 wystąpił zarówno w pęcherzykach, jak i lizatach komórkowych. W lizatach wykryto także zwiększony poziom CD81.

W drugim etapie badań analizowano aktywność funkcjonalną komórek czerniaka typu dzikiego i z nokautem poprzez ocenę ich proliferacji, migracji i inwazji. Proliferacja komórek, badana za pomocą pomiaru przyrostu komórkowego DNA, była zmniejszona jedynie w komórkach linii SkMel28 *RAB27A* KO. Test zarastania rasy pozwolił na ocenę dwuwymiarowej migracji komórek, która była wolniejsza w komórkach SkMel28 i DMBC12 z nokautem. Przeanalizowano także zdolność komórek czerniaka do inwazji przez warstwę białek macierzy zewnątrzkomórkowej. Inwazja komórek SkMel28 KO i DMBC12 KO była ograniczona względem komórek kontrolnych typu dzikiego. Dodatkowo w tych komórkach obniżony był poziom N-kadheryny, markera mezenchymalnego, co może sugerować na udział białka *RAB27A* w regulacji inwazyjności tych linii komórkowych. Natomiast wyciszenie *RAB27A* w komórkach A375 nie wpłynęło na ich proliferację, migrację, inwazję macierzy zewnątrzkomórkowej, ani poziom N-kadheryny. Oceniono także aktywność funkcjonalną komórek A375 z podwójnym nokautem *RAB27A/B*. Podobnie jak w przypadku pojedynczego KO, wyciszenie obu izoform nie wpłynęło na proliferację, ani inwazyjność komórek, natomiast ich migracja była wolniejsza, w porównaniu do komórek typu dzikiego. Ponieważ linia A375 charakteryzuje się największą inwazyjnością, pozwala to przypuszczać, że *RAB27A* wpływa na funkcjonowanie komórek o mniejszej agresywności.

W ostatnim etapie badań oceniono poziom 84 białek zaangażowanych w onkogenezę i/lub progresję nowotworu z zastosowaniem testu Proteome Profiler. Profil proteomiczny komórek z nokautem znacząco różnił się od tego w komórkach typu dzikiego. Wśród białek, których poziom był zwiększony lub zmniejszony wyróżniono między innymi cząsteczki adhezyjne, regulatory angiogenezy, regulatory odpowiedzi immunologicznej, białka zaangażowane w EMT, składniki ECM czy proteazy oraz ich inhibitory. Znaczące różnice zaobserwowano także w ekspresji białek sygnałowych, uczestniczących w procesach apoptozy, regulacji cyklu komórkowego czy receptorów kinaz. Liczba białek, których poziom uległ zmianie w komórkach mniej inwazyjnych linii SkMel28 i DMBC12 była zdecydowanie większa, niż w przypadku linii bardziej inwazyjnej – A375. Ponadto, wyciszenie drugiej izoformy *RAB27* wywołało dodatkowe zmiany w profilu onkoprotein w komórkach A375.

We wszystkich badanych liniach komórkowych zaobserwowano różnice w poziomie białek z rodziny ludzkich naskórkowego czynnika wzrostu (HER), jednak były one zależne od danej linii komórkowej. W celu dodatkowej walidacji otrzymanych wyników zbadano poziom mRNA i białka, a także powierzchniową ekspresję HER2, HER3 i EGFR w komórkach. Poziom HER3 był znacząco obniżony we wszystkich badanych liniach czerniaka. Natomiast fluktuacje w poziomie HER2 i EGFR były różne w zależności od linii komórkowej. Dodatkowo aby ocenić konsekwencje zmiany ekspresji receptorów HER na aktywność szlaków sygnałowych zbadano także fosforylację białek AKT i ERK1/2. Zaobserwowano, że stopień fosforylacji ERK1/2 oraz AKT był niższy w komórkach DMBC12 *RAB27A* KO, natomiast

pozostał niezmienny w komórkach SkMel28 *RAB27A* KO i A375 *RAB27A* KO. Zaobserwowano także obniżenie fosforylacji AKT i ERK1/2 w komórkach A375 z podwójnym nokautem *RAB27A/B*.

Wnioski

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki wskazują, że:

1. *RAB27A* i *RAB27B* nie wpływają na rozmiar i liczbę małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych uwalnianych przez komórki czerniaka, niezależnie od jego bazowej ekspresji.
2. *RAB27A* promuje proliferację, migrację i inwazję komórek czerniaka o niskim i średnim stopniu inwazyjności, ale nie wpływa na proliferację i ruchliwość komórek wysoko inwazyjnych.
3. *RAB27B* promuje migrację wysoko inwazyjnych komórek czerniaka A375.
4. *RAB27A* i *RAB27B* modulują ekspresję wewnątrzkomórkowych białek odpowiedzialnych za procesy nowotworowe.
5. Wyciszenie ekspresji *RAB27A* lub *RAB27A/B* znacząco zaburzyło równowagę pomiędzy ekspresją i aktywnością receptorów z rodziny HER, co może mieć kluczowe znaczenie dla funkcjonowania komórek nowotworowych i tłumaczyć zmiany w ich proliferacji, migracji i inwazyjności.
6. Konsekwencją zależnej od *RAB27A* lub *RAB27A/B* obniżonej ekspresji HER3 jest osłabienie aktywności szlaków sygnałowych RAS/RAF/MEK/ERK oraz PI3K-AKT w niektórych liniach komórkowych, co może skutkować zahamowaniem inwazyjności komórek.

RAB27A i *RAB27B* odgrywają istotną rolę w promowaniu inwazyjnego charakteru komórek czerniaka. Jednakże aktywność *RAB27A* jest ściśle uzależniona od linii komórkowej tego nowotworu.

Literatura

1. Bobrie A, Krumeich S, Reyat F, Recchi C, Moita LF, Seabra MC, Ostrowski M, Théry C (2012) Rab27a Supports Exosome-Dependent and -Independent Mechanisms That Modify the Tumor Microenvironment and Can Promote Tumor Progression. *Cancer Res* 72:4920-4930
2. Fisher DE, Bastian BC (eds) (2019) Melanoma. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7147-9>
3. Guo D, Lui GYL, Lai SL, et al (2019) *RAB27A* promotes melanoma cell invasion and metastasis via regulation of pro-invasive exosomes. *Int J Cancer* 144:3070-3085
4. Homma Y, Hiragi S, Fukuda M (2021) Rab family of small GTPases: an updated view on their regulation and functions. *FEBS J* 288:36-55

5. Li J, Chen J, Wang S, et al (2019) Blockage of transferred exosome-shuttled miR-494 inhibits melanoma growth and metastasis. *J Cell Physiol* 234:15763-15774
6. Li Z, Fang R, Fang J, He S, Liu T (2018) Functional implications of Rab27 GTPases in Cancer. *Cell Commun Signal CCS* 16:44
7. Rossi S, Cordella M, Tabolacci C, et al (2018) TNF-alpha and metalloproteases as key players in melanoma cells aggressiveness. *J Exp Clin Cancer Res CR* 37:326
8. Schadendorf D, Fisher DE, Garbe C, et al (2015) Melanoma. *Nat Rev Dis Primer* 1:15003
9. Tsukuba T, Yamaguchi Y, Kadowaki T (2021) Large Rab GTPases: Novel Membrane Trafficking Regulators with a Calcium Sensor and Functional Domains. *Int J Mol Sci* 22:7691