



dr hab. inż. Anna Choromańska, prof. UM
Katedra i Zakład Biologii Molekularnej i Komórkowej
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
ul. Borowska 211A
50-556 Wrocław
e-mail: anna.choromanska@umw.edu.pl

Wrocław, 28.01.2025 r.

RECENZJA

**pracy doktorskiej Pani magister Katarzyny Weroniki Horodeckiej, prowadzonej
w dziedzinie nauki medyczne i nauki o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne.**

Praca pt. „*Analiza funkcjonalna RAB27 w liniach komórkowych czerniaka: wydzielanie małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, migracja, inwazja i sygnalizacja komórkowa*”, wykonana w Szkole Doktorskiej BioMedChem Uniwersytetu Łódzkiego i Instytutów Polskiej Akademii Nauk w Łodzi. Promotorem pracy jest Pani prof. dr hab. Magdalena Klink. Promotorem pomocniczym pracy jest Pani dr Liliana Czernek.

Podstawa recenzji: Uchwała Rady Naukowej Instytutu Biologii Medycznej PAN w Łodzi z dnia 6 grudnia 2024 r., podpisana przez Przewodniczącą Rady Naukowej Instytutu Biologii Medycznej PAN prof. dr hab. Antoniego Różalskiego.

Podstawa prawna recenzji: 1) Ustawa z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.).

1. Informacja na temat doktorantki

Pani Katarzyna Horodecka uzyskała tytuł magistra na kierunku biotechnologia medyczna w roku 2020 na Uniwersytecie Łódzkim. Powyższa praca dotyczyła nanocząstek srebra modyfikowanych powierzchniowo jako nośniki siRNA w terapii przeciwnowotworowej. W okresie od czerwca 2020 do lipca 2021 pracowała na stanowisku Graduate Research Assistant w Katedrze Biochemii i Genetyki Molekularnej na Uniwersytecie w Wirginii w USA. W latach 2021–2024 realizowała pracę doktorską w Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi. Od 2024 roku do chwili obecnej pracuje na stanowisku biologa w tym samym Centrum.

Pani Katarzyna Horodecka posiada imponujący dorobek naukowy jak na swój etap kariery. Publikowała w renomowanych czasopismach naukowych, takich jak *FEBS Open Bio* czy *Journal of Immunology*. Jej prace dotyczą m.in. roli białka Rab27 w inwazyjności komórek czerniaka, sekrecji małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, a także wykorzystania nanocząstek w terapii przeciwnowotworowej. Publikacje te podkreślają jej wkład w rozwój wiedzy z zakresu biologii molekularnej i medycyny spersonalizowanej, a także nowatorskie podejście do badania interakcji białek i szlaków sygnałowych.

Doktorantka aktywnie uczestniczyła w realizacji dwóch projektów badawczych finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki. Była wykonawcą w grantie OPUS, a obecnie w projekcie w ramach konkursu SONATA. Projekty dotyczą m.in. modulowania produkcji egzosomów jako wsparcia terapii przeciwnowotworowych oraz badań nad bakteryjnymi pęcherzykami i ich immunomodulacyjnym wpływem na komórki śródbłonna. W tych projektach wykorzystywała zaawansowane techniki, takie jak edycja genów CRISPR/Cas9, analiza proteomiczna, cytometria przepływowa, a także przygotowanie materiału do sekwencjonowania.

Katarzyna Horodecka wielokrotnie prezentowała wyniki swoich badań na międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych. Uczestniczyła m.in. w:

- **48th FEBS Congress** (Mediolan, 2024), gdzie zaprezentowała poster dotyczący roli Rab27 w szlakach sygnałowych czerniaka.
- **ASCB Cell Bio 2023** (Boston, USA, 2023) oraz **47th FEBS Congress** (Tours, Francja, 2023), gdzie wygłosiła prezentacje ustne na temat wpływu Rab27 na inwazyjność komórek czerniaka i sekrecję egzosomów.
- Krajowych wydarzeniach, takich jak *25th Gliwice Scientific Meetings* czy *V Ogólnopolskie Sympozjum Biomedyczne ESKULAP*, prezentując wyniki dotyczące nanotechnologii i terapii genowych.

Jej aktywność konferencyjna potwierdza zdolność do skutecznego przekazywania wyników badań szerszemu środowisku naukowemu.

Dorobek naukowy Katarzyny Horodeckiej, jej zaangażowanie w realizację zaawansowanych projektów badawczych oraz liczne wystąpienia na prestiżowych konferencjach świadczą o jej wnikliwości badawczej, zdolnościach organizacyjnych i umiejętnościach interdyscyplinarnych. Te osiągnięcia podkreślają jej gotowość do prowadzenia pracy naukowej na najwyższym poziomie.

2. Wstęp

Czerniak to jeden z najbardziej agresywnych nowotworów skóry, charakteryzujący się wysoką śmiertelnością w zaawansowanych stadiach. Jego rozwój związany jest z mutacjami genetycznymi, ekspozycją na promieniowanie ultrafioletowe (UV) oraz czynnikami środowiskowymi i genetycznymi. Pomimo postępów w diagnostyce i terapii, czerniak pozostaje wyzwaniem dla medycyny ze względu na swoje zdolności do przerzutowania i rozwijania oporności na leczenie. Pozostaje poważnym wyzwaniem klinicznym, szczególnie w zaawansowanych stadiach. Osiągnięcia w dziedzinie immunoterapii i terapii celowanych znacznie poprawiły rokowania pacjentów, jednak rozwój oporności oraz trudności w leczeniu przerzutów nadal ograniczają ich skuteczność. Nowe odkrycia dotyczące biologii czerniaka, w tym analiza uwalnianych przez komórki czerniaka pęcherzyków zewnątrzkomórkowych oraz mikrośrodowiska nowotworu, otwierają nowe możliwości diagnostyczne i terapeutyczne, które mogą zrewolucjonizować walkę z tym nowotworem. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Katarzyny Horodeckiej pt. „Analiza funkcjonalna RAB27 w liniach komórkowych czerniaka: wydzielanie małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, migracja, inwazja i sygnalizacja komórkowa” stanowi istotny wkład w zrozumienie mechanizmów molekularnych leżących u podstaw agresywnego zachowania czerniaka, jednego z najbardziej śmiertelnych nowotworów skóry. Temat pracy trafnie odzwierciedla podjęte do analizy problemy badawcze.

Praca koncentruje się na analizie białek RAB27, które odgrywają kluczową rolę w regulacji wydzielania małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (sEVs) – struktur odpowiedzialnych za komunikację międzykomórkową, promowanie migracji i inwazji komórek nowotworowych oraz tworzenie mikrośrodowiska sprzyjającego przerzutom. Autorka badała wpływ tych białek na wydzielanie sEVs, procesy migracyjne, inwazyjne oraz zmiany w sygnalizacji komórkowej w trzech liniach komórkowych czerniaka (SkMel28, DMBC12 i A375), różniących się stopniem inwazyjności.

3. Ocena pracy

3.1. Ocena układu pracy

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska ma formę monografii, składającej się ze 128 stron, 43 rycin oraz 13 tabel. Układ pracy jest prawidłowo zorganizowany. Umożliwia odbiorcy łatwe zrozumienie podjętego problemu, przebiegu badań, ich założeń, zastosowanych

metod oraz uzyskanych wyników. Pozwala także na swobodną analizę i interpretację przedstawionych treści. Składa się ona z następujących części: (1) Wstęp, (2) Cel badań, (3) Materiał i metody, (4) Wyniki, (5) Dyskusja, (6) Podsumowanie, (7) Streszczenie w języku polskim i angielskim (8) Wykaz bibliografii (9) Dorobek naukowy doktorantki. Wstęp poprzedza wykaz stosowanych skrótów oraz spis treści. Konstrukcja opracowania jest zwarta, jednoznaczna, a jednocześnie typowa dla prac doktorskich opracowywanych w formie monografii. Praca cechuje się nie tylko wysokim poziomem merytorycznym, ale również estetycznym wykonaniem i zgodnością z zasadami edytorskimi. Autorka płynnie i logicznie przeprowadza czytelnika przez omawiane zagadnienia. Jest konsekwentna w stosowanej terminologii. W samym tekście pracy stwierdziłam tylko pojedyncze błędy literowe, do których należą na str. 29 w trzecim wierszu zamiast „atologicznych” powinno znaleźć się „patologicznych”. Na stronie 35, w pierwszym zdaniu drugiego akapitu zamiast sformułowania „komórkach czerniaka” powinno być „komórek czerniaka”. Jednym z drobnych niedopatrzeń jest niekonsekwencja w zachowaniu kolejności alfabetycznej w wykazie skrótów użytych w rozprawie.

3.2. Ocena poszczególnych części rozprawy

3.2.1 Ocena części „Wstęp”

Wstęp rozprawy stanowi szczegółową analizę molekularnych mechanizmów leżących u podstaw rozwoju i progresji czerniaka, ze szczególnym uwzględnieniem zmian genetycznych i szlaków sygnałowych. Tekst jest dobrze uporządkowany, merytoryczny i oparty na aktualnej literaturze naukowej, co czyni go wartościowym wkładem w zrozumienie biologii tego nowotworu. Jednym z największych atutów fragmentu jest szczegółowe omówienie obciążenia mutacyjnego w czerniaku, które przypisuje się głównie ekspozycji na promieniowanie UV. Autorka trafnie opisuje zarówno punktowe mutacje typu C > T, jak i strukturalne zmiany genetyczne, takie jak rearanżacje genów i zmiany liczby kopii, które odgrywają kluczową rolę w procesie nowotworowym. Ta kompleksowa charakterystyka genetyczna czerniaka stanowi solidną podstawę dla dalszej analizy. Dużą wartość merytoryczną wnosi także szczegółowe omówienie szlaków sygnałowych, takich jak MAPK, PI3K, Rb i p53, które są kluczowe dla patogenezы czerniaka. Doktorantka przedstawia sekwencyjny charakter nabywania mutacji w tych szlakach, wskazując, w jaki sposób przyczyniają się one do proliferacji, oporności na apoptozę i niekontrolowanego wzrostu komórek. Szczególnie wyróżnia się precyzyjne opisanie mechanizmu aktywacji szlaku MAPK przez mutacje w genach *BRAF* i *NRAS* oraz ich wpływu

na konstytutywną aktywację tego szlaku. Cennym aspektem fragmentu jest także zwrócenie uwagi na plastyczność fenotypową komórek czerniaka, z podkreśleniem roli czynników transkrypcyjnych MITF i AXL w determinacji fenotypu proliferacyjnego i inwazyjnego. Autorka wyjaśnia w jaki sposób mikrośrodowisko nowotworu oraz czynniki epigenetyczne wpływają na zmianę fenotypów, przypominając proces przejścia epitelialno-mezenchymalnego. Warto również docenić powiązanie omawianych mechanizmów molekularnych z klinicznymi konsekwencjami czerniaka, w tym gorszym rokowaniem związanym z amplifikacją *MITF*.

Fragment Wstępu dotyczący diagnozy i leczenia czerniaka został opracowany z dużą dbałością o szczegóły i opiera się na aktualnych danych naukowych, co czyni go wartościowym elementem pracy. Wprowadzenie zawiera istotne informacje na temat epidemiologii czerniaka, wskazując na skalę problemu zarówno globalnie, jak i lokalnie, w Polsce. Diagnostyka czerniaka została szczegółowo omówiona, począwszy od wstępnej oceny zmian skórnych, przez wywiad chorobowy, aż po bardziej zaawansowane metody, takie jak dermatoskopia i biopsja wycinająca. Szczególnie cenne jest uwzględnienie skali Argenziano, która pozwala na wczesne wykrycie zmian podejrzanych o charakter złośliwy, a także podkreślenie znaczenia histopatologicznej oceny zmian w klasyfikacji czerniaka. Autorka poprawnie wskazuje na rolę takich parametrów jak grubość nacieku według Breslowa czy stopień zaawansowania według klasyfikacji TNM.

Omówienie metod leczenia czerniaka uwzględnia zarówno klasyczne terapie chirurgiczne, jak i nowoczesne podejścia immunoterapeutyczne oraz terapie celowane. Cennym dodatkiem jest omówienie terapii celowanych skierowanych na mutację BRAF, czy opis najnowszych metod, takich jak terapia komórkowa oparta na limfocytach T naciekających nowotwór, która została niedawno zatwierdzona przez FDA. W opisie metod leczenia czerniaka, brakuje jednak moim zdaniem omówienia techniki elektrochemioterapii (ECT), która jest uznaną metodą leczenia w wielu krajach. ECT polega na zastosowaniu impulsów elektrycznych do zwiększenia przepuszczalności błon komórkowych dla cytostatyków, takich jak bleomycyna czy cisplatyna, co znacząco zwiększa skuteczność leczenia nowotworów, w tym czerniaka. Badania naukowe potwierdzają skuteczność tej metody w leczeniu miejscowych zmian nowotworowych, szczególnie u pacjentów z zaawansowanymi postaciami czerniaka. Na przykład badania *Gehl i Mir* (2006) wykazały, że ECT jest skuteczna w leczeniu zarówno pierwotnych, jak i przerzutowych zmian czerniaka, z wysokim odsetkiem odpowiedzi całkowitej i częściowej. Ponadto, *Campana i wsp.* (2019) podkreślają, że elektrochemioterapia jest szczególnie przydatna w sytuacjach, gdzie chirurgiczne usunięcie zmian jest niemożliwe lub ryzykowne. Uwzględnienie elektrochemioterapii w analizie metod leczenia czerniaka mogłoby uzupełnić

i wzbogacić przedstawiony w pracy kontekst terapeutyczny, a także podkreślić wszechstronność nowoczesnych podejść w leczeniu tego agresywnego nowotworu.

Fragment dotyczący małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych przedstawia kompleksowe spojrzenie na rolę sEVs w procesach nowotworowych, ze szczególnym uwzględnieniem czerniaka. Ukazuje zaawansowaną wiedzę autorki w tej dziedzinie, łącząc precyzyjny opis mechanizmów biologicznych z potencjalnym znaczeniem klinicznym. Doktorantka opisuje mechanizmy uwalniania i funkcje sEVs w warunkach nowotworowych, podkreślając kluczowe znaczenie hipoksji w sortowaniu ładunku sEVs oraz ich sekrecji, rolę kwasowego mikrośrodowiska w regulacji ilości i zawartości sEVs, jak również opisuje zmiany w profilu miRNA w sEVs w czerniaku, które wpływają na wzrost guza, angiogenezę, lekooporność i zdolność komórek do nabierania cech macierzystych. Każdy z tych aspektów jest dobrze uargumentowany, a autorka cytuje aktualne i kluczowe publikacje (np. miRNA-494 i jego rola w progresji nowotworu). Przejrzystość argumentacji umożliwia łatwe śledzenie powiązań między mechanizmami molekularnymi a ich znaczeniem klinicznym. Autorka rozprawy omówiła także zastosowania sEVs jako biomarkerów w diagnostyce i monitorowaniu terapii. Wskazanie specyficznych białek w sEVs (np. Alix, S100B, MIA, TGF- β 1, kaweolina-1) jako prognostycznych dla czerniaka podkreśla potencjał praktycznego wykorzystania tych struktur. Opis zastosowania inhibitorów wydzielania sEVs, takich jak GW4869, dodatkowo wzbogaca fragment o aspekty terapeutyczne, które mogą być rozwijane w przyszłych badaniach.

Dzięki kompleksowemu ujęciu tematu, precyzyjnemu opisowi mechanizmów molekularnych czerniaka oraz ich powiązaniu z rolą sEVs w procesach nowotworowych i aspektami klinicznymi, „Wstęp” stanowi solidny fundament dla kolejnych części rozprawy. Należy dodać, że Autorka zamieściła w nim bardzo wartościowe ryciny i tabele, które w klarowny sposób obrazują i podsumowują podjętą tematykę, znacząco ułatwiając zrozumienie omawianych zagadnień.

3.2.2 Ocena części „Cel pracy”

Rozdział „Cel pracy” w rozprawie mgr Katarzyny Horodeckiej został przygotowany w sposób jasny, rzeczowy i zgodny z naukowymi standardami. Autorka precyzyjnie zdefiniowała ogólny cel swoich badań, odnosząc się do istotnego problemu klinicznego, jakim jest brak wystarczająco skutecznego leczenia zaawansowanych stadiów czerniaka. Należą tutaj:

- Poznanie roli RAB27A w aktywności funkcjonalnej komórkach czerniaka, związanej z progresją nowotworu;

- Poznanie wpływu białka RAB27A na ekspresję i aktywność wybranych białek zaangażowanych w nowotworzenie i/lub progresję nowotworu.

Ponadto, przedstawione szczegółowe cele pracy ukazują kompleksowe podejście do wyjaśnienia roli białek RAB27A i RAB27B w procesach związanych z progresją nowotworu. Autorka wyraźnie podkreśliła kliniczną wagę badań nad czerniakiem, wskazując na konieczność poszukiwania nowych celów terapeutycznych. Szczególnie istotne jest odniesienie do niedostatecznego poznania roli białek RAB27A i RAB27B w biologii czerniaka, co uzasadnia wybór tego obszaru badawczego. Cele szczegółowe są logicznie sformułowane, wyraźnie nawiązując do hipotez badawczych oraz wybranych metod eksperymentalnych. Należą tutaj:

- 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.

Badaczka w sposób kompleksowy podjęła się analizy podjętego zagadnienia. Zakres badań obejmuje zarówno analizy funkcjonalne komórek czerniaka (prolifерacja, migracja, inwazja), jak i ocenę molekularnych mechanizmów działania białek RAB27A i RAB27B. Uwzględnienie kluczowych szlaków sygnalizacyjnych PI3K/AKT i RAS/RAF/MEK/ERK oraz receptorów HER świadczy o dogłębnej analizie biologicznych i onkologicznych aspektów badanego problemu. Wprowadzenie techniki CRISPR/Cas9 do wyciszania ekspresji białek RAB27A i RAB27B w liniach komórkowych czerniaka wskazuje na nowatorskie podejście badawcze. Uwzględnienie linii komórkowych różniących się stopniem inwazyjności pozwala na formułowanie bardziej uniwersalnych wniosków i stwarza możliwość lepszego zrozumienia zróżnicowania biologii czerniaka.

3.2.3 Ocena części „Materiały i metody”

o kompleksowym podejściu do potwierdzenia efektywności modyfikacji genetycznych. Wyodrębnienie pojedynczych klonów komórkowych oraz ich dokładna analiza zwiększa wiarygodność uzyskanych wyników i pozwala na bardziej szczegółową interpretację wpływu wyciszenia RAB27A i RAB27B na badane procesy biologiczne.

2. Udział RAB27 w uwalnianiu sEVs

Badania wskazują na znaczący wpływ białek RAB27 na zawartość białek w sEVs, ale nie na ich liczbę. Wyniki te są przedstawione w sposób klarowny za pomocą analiz NTA, Western blot oraz metody BCA. Zauważalne różnice w zawartości markerów białkowych sEVs między liniami komórkowymi podkreślają różnorodność biologii czerniaka oraz możliwy kontekst specyficzny dla danej linii komórkowej. Jest to istotne dla lepszego zrozumienia roli sEVs w procesach nowotworowych i może stanowić podstawę do dalszych badań.

3. Aktywność funkcjonalna komórek czerniaka z nokautem RAB27

Autorka przeprowadziła wszechstronną analizę funkcji biologicznych komórek z nokautem RAB27A oraz RAB27A/B, obejmującą proliferację, migrację i inwazję. Wyniki wskazują, że wpływ wyciszenia RAB27A różni się w zależności od linii komórkowej, co świadczy o złożoności biologii czerniaka.

Zaobserwowany spadek migracji i inwazji w liniach DMBC12 i SkMel28, przy jednoczesnym braku takich zmian w linii A375, wskazuje na różnorodną rolę białka RAB27A w różnych podtypach czerniaka.

4. Profil proteomiczny onkoprotein

Przeprowadzona analiza proteomiczna dostarczyła istotnych informacji na temat różnic w poziomach białek związanych z nowotworzeniem. Wyniki są bogato udokumentowane tabelami i rycinami, które pozwalają na łatwą interpretację danych. Autorka trafnie zauważyła, że liczba białek, których poziom uległ zmianie w mniej inwazyjnych liniach, była większa niż w bardziej inwazyjnej linii A375. Jest to cenne spostrzeżenie, które może wskazywać na różnice w mechanizmach regulacyjnych w zależności od stopnia inwazyjności nowotworu.

5. Analiza ekspresji białek z rodziny HER

Zastosowanie różnych metod, takich jak RT-PCR, Western blot oraz cytometria przepływowa, pozwoliło na wszechstronną ocenę poziomu białek z rodziny HER. Wyniki

Rozdział „Materiały i metody” w rozprawie mgr Katarzyny Horodeckiej został opracowany bardzo szczegółowo i starannie. Przedstawia on szerokie spektrum metod eksperymentalnych zastosowanych w badaniach, co świadczy o zaawansowanym warsztacie badawczym Autorki oraz doskonałej znajomości technik molekularnych i komórkowych. Jasność i precyzja opisu poszczególnych procedur pozwalają na łatwe odtworzenie eksperymentów, co jest niezwykle ważne w kontekście transparentności i wiarygodności badań. Autorka zastosowała szeroki wachlarz nowoczesnych technik badawczych, takich jak:

- Izolacja sEVs z użyciem ultrawirowania.
- Analiza sEVs za pomocą techniki NTA, barwienia srebrem oraz oznaczenia stężenia białka metodą BCA.
- Zastosowanie Western blot do oceny poziomu białek oraz stopnia ich fosforylacji.
- Profilowanie onkoprotein z wykorzystaniem zestawu Proteome Profiler.
- qRT-PCR do oceny poziomu mRNA oraz analiza cytometryczna do oceny ekspresji receptorów powierzchniowych.
- Wykorzystanie systemu CRISPR/Cas9 do wyciszenia genów RAB27A i RAB27B.
- Testy funkcjonalne oceniające proliferację, migrację i inwazyjność komórek czerniaka.

Taka różnorodność metod pozwala na dogłębną analizę badanych procesów biologicznych z różnych perspektyw. Autorka zastosowała zaawansowane metody statystyczne, dostosowane do charakteru danych (testy t-Studenta, ANOVA, porównania post-hoc), co świadczy o staranności w interpretacji wyników oraz poprawnym wnioskowaniu. Szczególnie warto docenić, że badania w zakresie proteomicznej analizy komórek z wyciszoną ekspresją RAB27 są pionierskie, co wpływa na nowatorski charakter rozprawy.

3.2.4 Ocena części „Wyniki”

Wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej są bardzo szczegółowe i obejmują szeroki zakres badań, które zostały przeprowadzone z wykorzystaniem nowoczesnych metod biologii molekularnej. Poniżej przedstawiam analizę poszczególnych aspektów wyników:

1. Otrzymanie linii komórkowych z nokautem RAB27A i RAB27A/B

Autorka z powodzeniem wykorzystwała technologię CRISPR/Cas9 do uzyskania linii komórkowych z wyciszeniem genów RAB27A oraz RAB27A/B. Wyniki edycji genów zostały rzetelnie zweryfikowane metodą T7E1 oraz sekwencjonowaniem Sangera, co potwierdza ich wysoką jakość. Kluczowym elementem było również wykorzystanie technik Western blot oraz qRT-PCR do analizy poziomu białek i mRNA, co świadczy

wskazują na zróżnicowany wpływ wyciszenia RAB27A i RAB27B na ekspresję tych receptorów, co podkreśla znaczenie białek RAB27 w regulacji kluczowych szlaków sygnałowych w czerniaku.

6. Ocena fosforylacji białek AKT i ERK

Wyciszenie RAB27A wpływa na szlaki PI3K/AKT i RAS/RAF/MEK/ERK w sposób zależny od linii komórkowej. W DMBC12 KO zaobserwowano zahamowanie fosforylacji AKT i ERK1/2, podczas gdy w SkMel28 i A375 takich zmian nie odnotowano, choć w SkMel28 KO wzrósł poziom ERK1/2. W A375 z podwójnym wyciszeniem RAB27A/B fosforylacja AKT i ERK1/2 była zahamowana, co sugeruje kompensacyjną rolę RAB27B w tej linii.

Na podstawie zaprezentowanych wyników Autorka trafnie zwraca uwagę, że RAB27A nie wpływa bezpośrednio na ilość wydzielanych małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, ale odgrywa kluczową rolę w modyfikacji ich składu białkowego, co może mieć istotne znaczenie biologiczne i kliniczne. Wyniki wskazujące na regulację proliferacji, migracji i inwazji przez RAB27A w sposób zależny od specyfiki linii komórkowej zostały jasno przedstawione, a interakcje z receptorami HER i ich wpływ na aktywację białek sygnałowych dodatkowo wzbogacają wnioski. Fragment w wyważony sposób wskazuje na potencjalne znaczenie RAB27A w progresji czerniaka, podkreślając jednocześnie jego ograniczoną uniwersalność jako celu terapeutycznego. Taka konkluzja świadczy o krytycznym podejściu do uzyskanych wyników i ich klinicznego potencjału. Należy jednocześnie podkreślić, że wyniki rozprawy doktorskiej są imponujące pod względem metodologicznym. Autorka wykazała się dużą precyzją i dbałością o szczegóły w planowaniu eksperymentów, analizie danych i ich prezentacji.

3.2.5 Ocena umiejętności interpretacji i dyskusji uzyskanych wyników (ocena „Dyskusji” i „Podsumowania”)

Część „Dyskusja i Podsumowanie” jest kompleksowym podsumowaniem wyników badań nad funkcją RAB27A i RAB27B w kontekście czerniaka, przedstawiającym wnioski o znaczeniu naukowym. Przedstawiono szczegółową analizę wpływu tych białek na funkcjonowanie komórek nowotworowych, uwzględniając ich rolę w sekrecji sEVs, regulacji proliferacji, migracji oraz inwazji komórek, a także w modulacji szlaków sygnałowych związanych z receptorami HER. Autorka starannie zestawiała swoje wyniki z dostępnymi

danymi literaturowymi, wskazując zarówno na podobieństwa, jak i różnice, co podkreśla rzetelność podejścia badawczego.

Dyskusja uwzględnia różnice między liniami komórkowymi (SkMel28, DMBC12, A375), podkreślając znaczenie kontekstu biologicznego w interpretacji uzyskanych wyników. Wnioski są jasne i logicznie wyprowadzone z prezentowanych wyników, z podkreśleniem ograniczeń oraz przyszłych kierunków badań, takich jak potrzeba głębszego zrozumienia mechanizmów współpracy między RAB27 a receptorami HER.

3.2.6 Ocena możliwości praktycznego zastosowanie uzyskanych wyników badań oraz oryginalności rozwiązania problemu naukowego

Rezultaty przeprowadzonych przez Doktorantkę badań mają znaczenie praktyczne, gdyż mogą przyczynić się do rozwoju nowych markerów diagnostycznych oraz strategii terapeutycznych. Identyfikacja wpływu RAB27A i RAB27B na receptory z rodziny HER oraz szlaki sygnałowe, takie jak RAS/RAF/MEK/ERK i PI3K-AKT, wskazuje na potencjalne możliwości zastosowania celowanych terapii w celu zahamowania progresji czerniaka, przy czym realizacja tego podejścia wymaga przeprowadzenia dalszych, odpowiednio zaprojektowanych badań przedklinicznych i klinicznych.

Rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, gdyż jest to pierwsza praca badająca wpływ wyciszenia ekspresji RAB27A i RAB27B na proteomiczny profil komórek czerniaka oraz na funkcjonowanie receptorów z rodziny HER. Wysoka jakość analizy literaturowej oraz zastosowanie nowoczesnych metod badawczych podkreślają nowatorski charakter pracy.

3.2.7 Ocena prezentacji ogólnej wiedzy teoretycznej w dyscyplinie nauki medyczne oraz umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej

Rozprawa doktorska świadczy o szerokiej wiedzy teoretycznej mgr Katarzyny Horodeckiej w dziedzinie nauk medycznych, szczególnie w zakresie biologii molekularnej i komórkowej nowotworów. Autorka wykazała znajomość kluczowych mechanizmów molekularnych związanych z progresją czerniaka oraz złożonych szlaków sygnałowych. Zastosowanie najnowszych badań literaturowych świadczy o umiejętności wnikliwej analizy i krytycznego podejścia do aktualnych problemów naukowych w dziedzinie. Rozprawa potwierdza zdolność Doktorantki do samodzielnego prowadzenia badań naukowych, czego dowodem jest jej umiejętność planowania i realizacji eksperymentów, wykorzystania zaawansowanych technik badawczych (CRISPR/Cas9, analiza proteomiczna, Western blot,

NTA), analizy danych oraz formułowania wniosków. Przeprowadzone badania są kompleksowe, a ich wyniki zostały logicznie przedstawione i omówione w kontekście aktualnej wiedzy naukowej. Ponadto, oryginalność i nowatorski charakter pracy świadczą o wysokich kompetencjach badawczych Autorki.

3.2.8 Ocena cytowanej bibliografii

Doktorantka wykazała się wnikliwą analizą literaturową, odnosząc się aż do 279 pozycji, co świadczy o jej rzetelności i zaangażowaniu w zgłębianie tematyki badawczej. Ponadto, zacytowana literatura jest nie tylko adekwatna do poruszanych zagadnień, ale również uwzględnia najnowsze osiągnięcia w danej dziedzinie, co znacząco podnosi wartość naukową rozprawy.

4. Wniosek końcowy

Rozprawa doktorska pt. *"Analiza funkcjonalna RAB27 w liniach komórkowych czerniaka: wydzielanie małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, migracja, inwazja i sygnalizacja komórkowa"*, autorstwa Pani Katarzyny Weroniki Horodeckiej, spełnia wszystkie warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Praca ta stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego, co znajduje potwierdzenie w pionierskich badaniach nad proteomiczną analizą komórek z wyciszoną ekspresją RAB27 oraz ich rolą w progresji czerniaka.

Rozprawa cechuje się wysoką jakością merytoryczną, szczegółową analizą literaturową, a także zastosowaniem zaawansowanych metod badawczych. Wykorzystane metody i podejście badawcze wskazują na wszechstronną wiedzę doktorantki w dziedzinie nauk medycznych oraz jej umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Ze względu na nowatorski charakter przeprowadzonych badań oraz znakomity warsztat metodyczny zaprezentowany przez Doktorantkę, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk o podjęcie uchwały o wyróżnieniu niniejszej rozprawy.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I ZAKŁAD BIOLOGII
MOLEKULARNEJ I KOMÓRKOWEJ

profesor uczelni
Anna Choromańska
dr hab. inż. Anna Choromańska