

Gliwice, dn. 11.02. 2025

Dr hab. Monika Pietrowska, prof. NIO-PIB

Narodowy Instytut Onkologii

im. Marii Skłodowskiej - Curie - Państwowy Instytut Badawczy

Oddział w Gliwicach

ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15

44-102 Gliwice

tel. (32) 278 96 72

e-mail: monika.pietrowska@gliwice.nio.gov.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Weroniki Horodeckiej pt. "Analiza funkcjonalna RAB27 w liniach komórkowych czerniaka: wydzielanie małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, migracja, inwazja i sygnalizacja komórkowa"/"Functional analysis of RAB27 in melanoma cell lines: small extracellular vesicle secretion, migration, invasion and cell signaling"

zrealizowanej w Instytucie Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk pod kierunkiem Prof. dr hab. Magdaleny Klink oraz Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk, pod kierunkiem dr Liliany Czernek (promotor pomocniczy).

Obecnie w badaniach nad biologią nowotworów coraz większą uwagę zwraca się na komunikację międzykomórkową pomiędzy komórkami nowotworowymi, a komórkami prawidłowymi obecnymi w mikrośrodkowisku nowotworu (ze szczególnym naciskiem na komórki układu immunologicznego). Za komunikację międzykomórkową odpowiadają między innymi uwalniane w warunkach zarówno fizjologicznych jak i patologicznych pęcherzyki zewnątrzkomórkowe. Jedną z klas tych pęcherzyków są małe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe. Te niewielkich rozmiarów (poniżej 200 nm) pęcherzyki błonowe uwalniane są przez większość typów komórek, zarówno *in vitro* tj. w warunkach hodowli komórkowej jak i *in vivo*, i obecne są we wszystkich płynach ustrojowych. Oprócz „uniwersalnego” zestawu białek błonowych i cytozolowych, w obrębie proteomu małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych obserwuje się białka swoiście związane z funkcjami komórek, z których zostały uwolnione. Szereg danych wskazuje na to, że małe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe biorą udział w wielu procesach istotnych dla transformacji nowotworowej i odpowiedzi na terapię przeciwnowotworową. Szczególną rolę w promowaniu rozwoju nowotworu poprzez przenoszenie cząsteczek sygnałowych między komórkami przypisuje się małym pęcherzykom zewnątrzkomórkowym uwalnianym przez komórki nowotworowe. Istotnie statystycznie większa liczba małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych jest uwalniana przez komórki nowotworowe niż prawidłowe, a prace porównujące grupy pacjentów z różnym stopniem zaawansowania nowotworu wykazują jego dodatnią korelację z liczbą pęcherzyków lub/i poziomem białka małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych izolowanych z surowicy/osocza tych pacjentów. W związku z powyższymi obserwacjami poczynionymi przez badaczy zahamowanie produkcji małych

pęcherzyków zewnątrzkomórkowych uwalnianych przez komórki nowotworowe wydaje się być interesującą strategią leczenia nowotworu. Między innymi z tego powodu badania nad uwalnianiem małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych przez komórki nowotworowe należą obecnie do tzw. „gorących” tematów onkologii molekularnej. Dużym utrudnieniem w badaniach nad praktycznym zastosowaniem małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych jest prowadzenie badań w układach *in vivo*, w których stanowią heterogenną populację pęcherzyków uwolnionych przez różne typy komórek. Stąd modele *in vitro* (hodowle komórkowe), w którym pęcherzyki zewnątrzkomórkowe stanowią homogeną populację, są wyborem pozwalającym na prowadzenie badań w bardzo dobrze kontrolowanych warunkach. W związku z powyższym temat rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Horodeckiej oceniam jako aktualny, istotny oraz wysoce adekwatny w stosunku do problematyki współczesnych badań biomedycznych. Praca doktorska mgr Katarzyny Horodeckiej prezentuje interesujące wyniki o potencjale w badaniach podstawowych oraz translacyjnych. Doktorantka zrealizowała postawione sobie cele, dobrała do ich realizacji odpowiednie metody badawcze, dokonała bardzo rzeczowej analizy wyników i ich interpretacji. Pracę przeczytałam z prawdziwą przyjemnością, gdyż poza tym, że jest bardzo dobrze napisana jest też dobrze ilustrowana i opracowana pod względem zaprezentowania uzyskanych wyników.

Rozprawa doktorska mgr Katarzyny Horodeckiej składa się z jedenastu rozdziałów i liczy 122 strony. Streszczenia w języku polskim i angielskim Autorka umieściła po podsumowaniu wyników pracy doktorskiej, chociaż tradycyjnie otwierają pracę doktorską. To moja jedyna uwaga do struktury pracy o charakterze raczej edytorskim niż dotyczącym zawartości merytorycznej. Opis rozprawy jest szczegółowy, bardzo przejrzysty i logiczny, więc Recenzent jest w stanie ocenić oraz docenić dobór metod do założonych celów pracy, uzyskane wyniki i wyciągnięte wnioski. Dobór piśmiennictwa (279 pozycji) jest imponujący oraz adekwatny do treści pracy. Rozprawa doktorska napisana jest w języku polskim. Układ pracy jest tradycyjny. Praca jest przejrzysta, konkretna oraz „nie przegadana”, co jako Recenzent bardzo doceniam. Dodatkowo uzyskane dane są prezentowane na przejrzystych, dobrze zaplanowanych oraz zaprezentowanych w przedstawionej do recenzji pracy rycinach. Każdy rozdział jest jasno podzielony na części które mają strukturę tradycyjnych prac doktorskich. Pracę doktorską rozpoczyna wprowadzenie, w którym Doktorantka opisuje wybrany model badań, skupiając się na najważniejszych informacjach dotyczących tematu pracy czyli molekularnego podłoża czerniaka, biogenezie małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych oraz udziale w nich białka RAB27. Oceniając wstęp teoretyczny pracy prezentujący model realizowanych badań jest on napisany poprawną polszczyzną w bardzo precyzyjny, ale jednocześnie przystępny sposób. Autorka dokonała przeglądu literatury tematu (ponad 200 pozycji w bibliografii), ale jednocześnie dokonała selekcji materiału wykorzystanego we wstępie tak, że zawiera on informacje konieczne dla zrozumienia podjętego przez nią tematu badań. Podobna precyzja w opisie i doborze treści towarzyszy kolejnym rozdziałom w których zostały przedstawione wyniki. W swojej rozprawie doktorskiej mgr Katarzyna Horodecka podjęła się zbadania roli białka RAB27 w komórkach ludzkiego czerniaka wybierając jako testy funkcjonalne: proces uwalniania małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, ocenę receptora EGFR, HER2 oraz HER3, migrację oraz inwazyjność komórek z obecnym białkiem oraz usuniętym metodą CRISPR/Cas9 genem RAB27A oraz RAB27A/RAB27B. Białko RAB27 jest małą GTPazą regulującą transport pęcherzykowy,

jej obecność jest niezbędna do transportowania melanosomów do wypustek dendrytycznych melanocytów. Najbardziej jednak intrygującą rolą RAB27 jest jego udział w przekazywaniu sygnału w komórce oraz w sekrecji czynników o działaniu pronowotworowym i proinwazyjnym. Autorka pracy podjęła się niezwykle ambitnego zadania, gdyż w literaturze istnieje sporo sprzecznych wobec siebie danych literaturowych. Dyskusja poprowadzona jest w sposób bardzo konsekwentny, a mgr Katarzyna Horodecka omawia uzyskane wyniki nie dokonując nadinterpretacji, wskazując słabe strony wykonanych eksperymentów (np. brak w prezentowanych w pracy doktorskiej danych dla linii czerniaka z nokautem genu RAB27B), przedstawia argumenty literaturowe wykazując się ogólną wiedzę teoretyczną oraz dojrzałością naukową. Interpretację badań Autorki dodatkowo komplikuje fakt, że małe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe uzyskiwane są różnymi metodami izolacji, istnieje na rynku również kilka różniących się od siebie urządzeń wyznaczających stężenie małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, co utrudnia obiektywne porównania danych literaturowych. Tym niemniej dyskusja w której pojawia się sporo uogólnień oraz nieprecyzyjnych sformułowań jest w mojej opinii najciekawszą częścią pracy doktorskiej. Autorka mimo uzyskania wyników nie zawsze zgodnych z doniesieniami literaturowymi stara się przedstawić stan rzeczy w najbardziej dla czytelnika zrozumiałym sposób, wprowadzając go w skomplikowany obecnie ze względów głównie metodologicznych świat pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, prezentując też rys historyczny pojawiających się rozwiązań metodologicznych. W literaturze tematu bowiem jest to też ważny aspekt oceny własnych wyników w kontekście tych dostępnych w literaturze. Wyniki uzyskane 5 lat temu kiedy nie były dostępne obecne możliwości oceny rozmiarów w skali nano nie mogą być porównywane z tymi uzyskanymi obecnie. Ponadto żadne wyniki nie mogą być porównywane z tymi nie zawierającymi podstawowej charakterystyki małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, co jest częstą wadą prac z zakresu tej tematyki.

W pracy doktorskiej mgr Katarzyna Horodecka nie uniknęła niezręczności językowych i uogólnień, które nie powinny się pojawiać w języku naukowym np. „były znacząco ograniczone”, „również znacząco wpływa”. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe małe czy duże, są rzeczownikiem policzalnym w związku z tym piszemy o ich liczbie, a nie ilości. W tekście pracy znajdujemy obie wersje np. str. 92 „wpływa na ilość i rodzaj uwalnianych pęcherzyków”, ale tylko jedna z nich jest prawidłowa. Używanie słowa pęcherzyki na określenie dowolnej populacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych też niestety nie jest dobrym pomysłem, chociaż zdarza się to Autorce na szczęście dość rzadko. Uważam też, że oznaczenie na Ryc. 33A, 33B oraz 33C sygnałów różnicujących oraz opis jakich białek dotyczą dodałoby pracy przejrzystości. Tabela 12 mogłaby w takim przypadku zostać mapą ciepłą, która jest dobrym sposobem na zaprezentowanie graficzne tego typu danych.

Mimo tych niedociągnięć, pozostając pod ogromnym wrażeniem pracy włożonej w przygotowanie przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej, w związku z niezasygnalizowanymi, a pojawiającymi się podczas czytania wątpliwościami, mam kilka pytań związanych z treścią rozprawy, do których prosiłabym, aby mgr Katarzyna Horodyńska odniosła się podczas publicznej obrony:

(1) Czy uwalnianie małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych może być zablokowane poprzez usunięcie genu? Jeśli nie, to jakie są podstawowe ograniczenia takiego podejścia?

(2) Jakimi kryteriami kierowała się Doktorantka przy wyborze panelu linii komórkowych wykorzystanych do realizacji pracy doktorskiej? Jak Autorka oceniała inwazyjność linii i czy wyniki własne korelowały z tymi uzyskanymi z przeglądu literatury?

(3) Czy w swojej pracy doktorskiej napotkała ograniczenia w związku z stosowaną metodą izolacji małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, szczególnie w prowadzonych testach funkcjonalnych?

Do przesłanej do recenzji pracy dołączono osiągnięcia naukowe Doktorantki. Mgr Katarzyna Horodecka jest według nich pierwszym Autorem następujących prac naukowych:

1. Horodecka K, Czernek L, Pęczek Ł, Gadzinowski M, Klink M. Impact of Rab27 on Melanoma Cell Invasion and sEV Secretion. *Int J Mol Sci.* 2024 Nov 19;25(22):12433. doi: 10.3390/ijms252212433. PMID: 39596498; PMCID: PMC11594641.
2. Horodecka K, Döchler M. CRISPR/Cas9: Principle, Applications, and Delivery through Extracellular Vesicles. *Int J Mol Sci.* 2021 Jun 4;22(11):6072. doi: 10.3390/ijms22116072. PMID: 34199901; PMCID: PMC8200053.

Ponadto Doktorantka jest współautorką następujących publikacji z zakresu tematycznego jej pracy doktorskiej:

1. Abashkin V, Pędziwiatr-Werbicka E, Horodecka K, Zhogla V, Ulashchik E, Shmanai V, Shcharbin D, Bryszewska M. Silver Nanoparticles Modified by Carbosilane Dendrons and PEG as Delivery Vectors of Small Interfering RNA. *Int J Mol Sci.* 2023 Jan 3;24(1):840. doi: 10.3390/ijms24010840. PMID: 36614277; PMCID: PMC9820844.
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. Lipopolysaccharide Primes Human Macrophages for Noncanonical Inflammasome-Induced Extracellular Vesicle Secretion. *J Immunol.* 2023 Feb 1;210(3):322-334. doi: 10.4049/jimmunol.2200444. PMID: 36525001.
3. Pędziwiatr-Werbicka E, Gorzkiewicz M, Horodecka K, Lach D, Barrios-Gumiel A, Sánchez-Nieves J, Gómez R, de la Mata FJ, Bryszewska M. PEGylation of Dendronized Gold Nanoparticles Affects Their Interaction with Thrombin and siRNA. *J Phys Chem B.* 2021 Feb 4;125(4):1196-1206. doi: 10.1021/acs.jpcc.0c10177. Epub 2021 Jan 22. PMID: 33481607.
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. Silver Nanoparticles Surface-Modified with Carbosilane Dendrons as Carriers of Anticancer siRNA. *Int J Mol Sci.* 2020 Jun 30;21(13):4647. doi: 10.3390/ijms21134647. PMID: 32629868; PMCID: PMC7370058.
5. Pędziwiatr-Werbicka E, Horodecka K, Shcharbin D, Bryszewska M. Nanoparticles in Combating Cancer: Opportunities and Limitations. A Brief Review. *Curr Med Chem.* 2021;28(2):346-359. doi: 10.2174/0929867327666200130101605. PMID: 32000637.

Osiągnięcia doktorantki uważam za bardzo dobre na tym etapie jej kariery naukowej.

Wnioski ogólne

Podsumowując, mocną stroną pracy jest wstęp teoretyczny w którym jego Autorka wykazała się wiedzą z zakresu biologii pęcherzyków zewnątrzkomórkowych oraz dojrzała, dobrze napisana dyskusja uzyskanych wyników. Praca doktorska, której podjęła się mgr Katarzyna Horodecka jest interdyscyplinarna i wymaga bardzo wszechstronnej wiedzy. Została dobrze zaplanowana, zrealizowana oraz napisana. Dodatkowo ryciny prezentujące uzyskane dane są przygotowane w sposób przejrzysty, dobrze dokumentujące uzyskane dane. Ponadto rozprawa stanowi rozwiązanie problemu naukowego, wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydatki w danej dyscyplinie oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Gratuluję mgr Katarzynie Horodeckiej oraz Paniom Promotorkom, gdyż jestem pod ogromnym pozytywnym wrażeniem tej pracy.

Stąd rekomenduję Radzie Naukowej Instytutu Biologii Medycznej PAN dopuszczenie przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Horodeckiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne.

Ze względu na poziom merytoryczny badań, dużą samodzielność oraz dojrzałość naukową w interpretacji uzyskanych wyników zaprezentowaną szczególnie w dyskusji przedstawionej mi do recenzji pracy doktorskiej wnioskuję o wyróżnienie tej pracy.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, tekst jednolity: Dz.U. z 2021 r. poz. 478.



Dr hab. Monika Pietrowska, Prof. NIO-PIB