



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani mgr Katarzyny Weroniki Horodeckiej

pod tytułem

„Analiza funkcjonalna RAB27 w liniach komórkowych czerniaka: wydzielanie małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, migracja, inwazja i sygnalizacja komórkowa”

Informacje wstępne i ocena formalna

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny W. Horodeckiej została wykonana pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Magdaleny Klink oraz Pani dr Liliany Czernek, pełniącej funkcję promotora pomocniczej, w Instytucie Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk oraz Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk.

Rozprawa doktorska została przygotowana w postaci klasycznej monografii naukowej. Została ona podzielona na rozdziały typowe dla tego typu opracowań, to jest *Wstęp*, *Cel pracy*, *Materiały i metody*, *Wyniki*, *Dyskusja*, *Podsumowanie*, *Streszczenia* - zgodnie z wymogami formalnymi- zarówno w języku polskim, jak i angielskim, oraz *Bibliografię*. Ponadto dysertacja zawiera *Wykaz najczęściej stosowanych skrótów* oraz zestawienie dorobku naukowego Doktorantki. Cała rozprawa doktorska zajmuje 122 strony. Jest ona ilustrowana 43 rycinami, posiada 13 tabel, a spis literatury obejmuje 279 pozycji wyłącznie anglojęzycznych, opublikowanych w latach 1946-2024, z czego ponad 40% stanowią pozycje opublikowane w ciągu ostatnich pięciu lat. Artykuły opublikowane w latach 1946-1996 były wykorzystane do przedstawienia historii badań pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Taki układ rozprawy doktorskiej nie odbiega od ogólnie przyjętego schematu i spełnia wymogi formalne stawiane tego typu opracowaniom. Na podstawie analizy dorobku naukowego Doktorantki oraz treści rozprawy doktorskiej można stwierdzić, że opisane w ocenianej dysertacji wyniki badań dotyczące roli RAB27 w czerniaku były do tej pory upowszechniane tylko w formie doniesień konferencyjnych podczas czterech konferencjach międzynarodowych i jednej krajowej w formie jednej prezentacji ustnej oraz czterech posterów. Pani mgr Katarzyna W. Horodecka jest współautorką sześciu anglojęzycznych publikacji oryginalnych i przeglądowych opublikowanych w czasopismach umieszczonych na liście *Journal Citation Reports* oraz indeksowane w bazie *Web of Science*. Łączny współczynnik oddziaływania (IF) tych czasopism - liczony zgodnie z rokiem publikacji danego artykułu - wynosi 27,85, a łączna suma punktów ministerialnych przypisana tym czasopismom - liczona również zgodnie z rokiem publikacji danego artykułu - wynosi 800.

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Ocena merytoryczna

Rozprawę doktorską rozpoczyna dwudziestoosmio-stronnicowy rozdział *Wstęp*, w którym doktorantka opisała czerniaka będącego najbardziej agresywnym nowotworem skóry oraz małe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, które aktualnie są przedmiotem intensywnych badań nie tylko podstawowych, ale też klinicznych. Osobna część rozdziału *Wstęp* została poświęcona charakterystyce białka regulatorowego RAB27, które było przedmiotem analizy w niniejszej dysertacji w kontekście roli pełnionej w czerniaku.

W dwóch podrozdziałach dotyczących czerniaka Doktorantka szczegółowo opisała molekularne podłoże tego nowotworu pokazując sekwencyjność zmian genetycznych prowadzących w konsekwencji do zaburzeń szlaków sygnałowych w melanocytach, co ostatecznie prowadzi do ich transformacji nowotworowej, oraz dodatkowo klasyfikację patomorfologiczną czerniaków, jak wygląda diagnostyka i leczenie tego nowotworu zaczynając od bazowej terapii jaką jest chirurgiczne usunięcia, poprzez chemioterapię, immunoterapię do terapii celowanych. Za szczególnie cenne uważam opracowanie przez Doktorantkę dwóch tabel (Tabela 1 i Tabela 2). W Tabeli 1 Doktorantka zebrała informacje dotyczące najczęściej występujących mutacji w poszczególnych typach czerniaka, z zaznaczeniem czy odgrywają one wiodącą rolę podczas inicjacji czy progresji, oraz jaki jest skutek danej mutacji. Dodatkowo przy każdym typie czerniaka pojawiła się informacja czy jego genezę można powiązać z nadmierną ekspozycją na promieniowanie ultrafioletowe. Natomiast Tabela 2 to zestawienie badań klinicznych dotyczących leków stosowanych w terapii czerniaka. Ta część tekstu rozprawy doktorskiej dodatkowo ilustrowana jest jedną ryciną (Rycina 1) pokazującą przebieg szlaków sygnałowych w melanocytach i komórkach czerniaka. Moim zdaniem ta rycina byłaby bardziej czytelna gdyby podzielono ją na dwa panele A i B, a legenda do niej była następująca:

Rycina 1. Schemat przedstawiający szlaki sygnałowe w melanocytach (panel A) oraz komórkach czerniaka (panel B). Transformacja nowotworowa jest efektem konstytutywnej aktywacji szlaków (etapy zaznaczone pogrubionymi strzałkami) i mutacji prowadzących do utraty funkcji białek, których kontury zaznaczono przerywaną linią....

W legendzie do tej ryciny (str. 2) pojawiło się określenie „prawidłowe melanocyty”. Czy są jeszcze jakieś inne typy melanocytów? Jeśli na Rycinie 1 zostały pokazane szlaki sygnałowe, to mamy do czynienia z białkami, a nie z genami. Zatem w dalszej części legendy do tej ryciny nie powinny pojawiać się terminy „onkogeny” i „geny supresorowe”, ale produkty tych genów. Ponadto, onkogeny i białka będące ich produktami są obecne tylko w komórkach nowotworowych. W komórkach prawidłowych są protoonkogeny. Zatem na schemacie powinien pojawić się dodatkowy kolor dla białek będących produktami protoonkogenów, inny niż czerwony aktualnie oznaczający białka będące produktami onkogenów. W tekście podrozdziałów I.1.1. i I.1.2. znalazłam jeszcze kilka nieścisłości:

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

1. Zapis BRAF^{V600E} oznacza substytucję waliny przez kwas glutaminowy, a nie odwrotnie jak napisano na str. 2.
2. W warunkach prawidłowych białko p16 inaktywuje, a nie aktywuje, Rb (str. 3).
3. Jasna karnacja jest cechą osób pochodzenia kaukaskiego, a nie pochodzenia europejskiego – w domyśle wszystkich mieszkańców Europy (str. 5).
4. Poprawny jest termin „stopień zaawansowania nowotworu” a nie „stadium” (str. 6).

W kolejnym podrozdziale *Wstępu* (I.2.) Doktorantka przedstawiła początki badań dotyczących pęcherzyków zewnątrzkomórkowych i poruszyła kwestie związane z niejednoznacznością nazewnictwa używanego w literaturze przedmiotowej. Następnie opisała Ona szczegółowo proces powstawanie małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (sEVs), ich udział w modulowaniu szerokiego wachlarza procesów, które przyczyniają się do progresji nowotworu, oraz możliwości wykorzystania sEVs do celów diagnostycznych i terapeutycznych. Za szczególnie cenne uważam odnośnienie się do wyników badań dotyczących roli sEVs w czerniaku. Ta część rozprawy doktorskiej ilustrowana jest trzema rycinami (Ryciny 2-4) przedstawiającymi skład sEVs, ich biogenezę i sposoby internalizacji przez komórki docelowe, oraz procesy, których modulacja przez sEVs promuje postęp nowotworu. Dodatkowo zamieszczona jest tabela (Tabela 3) prezentująca które białka wchodzi w skład ESCRT. Moje uwagi do tej części dysertacji są następujące:

1. Stwierdzenie, że cytuję: „...(sEVs) są wychwytywane przez komórki, autokrynnie, parakrynnie lub endokrynnie...” (str. 10) jest zbyt dużym skrótem myślowym, gdyż *de facto* chodzi o sposób komunikacji (autokrynną, parakrynną lub endokrynną).
2. Osobiście nie jestem za tłumaczeniem wszystkich nazw własnych z języka angielskiego na język polski. Ale jeśli już, to uważam, że nazwa *International Society for Extracellular Vesicles* lepiej brzmiałaby w wersji „Międzynarodowe Stowarzyszenie Badaczy Pęcherzyków Zewnątrzkomórkowych” niż „Międzynarodowe Stowarzyszenie Pęcherzyków Zewnątrzkomórkowych” (str. 12).
3. W polskojęzycznym rozwinięciu skrótu HRS (str. 13) został zgubiony wyraz „wzrostu”, powinno być: substrat kinazy tyrozynowej regulowanej czynnikiem wzrostu hepatocytów.
4. Informacje zawarte w akapicie drugim na stronie 15 odnoszą się w rzeczywistości do wpływu wywieranego przez produkty niektórych onkogenów i genów supresorowych (czyli wpływu białek) na regulację biogenezy EVs i ich uwalnianie, nie wpływu samych tych genów. O czym jest mowa w artykułach źródłowych (pozycje 88 i 89 w *Bibliografii*).
5. Rycina 3 nie uwzględnia wszystkich sposobów internalizacji sEVs przez komórki docelowe. Na schemacie brak fagocytozy i pinocytozy, mimo, że wymienione są one w tekście (str. 16).
6. Zamiast terminu „komórki odpornościowe” lepiej byłoby używać „komórki układu odpornościowego”.

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Ostatni podrozdział *Wstępu* Doktorantka przeznaczyła na opisanie białek RAB27, na co składało się wymienienie białek efektorowych oddziałujących z tymi GTPazami będącymi w stanie aktywnym lub nieaktywnym, wraz z pokazaniem schematu budowy dwunastu z nich na Rycinie 5, oraz wskazanie w jakich szczególnych rodzajach wewnątrzkomórkowego transportu pęcherzyków pełnią one funkcje, w stanach fizjologicznych (m.in. w transporcie melanosomów, uwalnianiu sEVs) i patologicznych (m.in. wpływ na tempo wzrostu guza czy tworzenia przerzutów). Lektura drugiego akapitu na str. 23 wprawia czytelnika w konsternację, gdyż z informacji zamieszczonych w drugim zdaniu dowiaduje się on, że stan aktywny białek RAB uwarunkowany jest związaniem GDP, ale już stan aktywny podrodziny RAB27 zależy od związania z GTP (ostatnie zdanie tego akapitu). Czy tak jest faktycznie? Za dobry pomysł uważam zebranie przez Doktorantkę w Tabeli 4 wyników badań dotyczących wpływu wyciszenia genów *RAB27A* i/lub *RAB27B* w modelach komórkowych i zwierzęcych na wydajność procesu uwalniania sEVs, oraz w Tabeli 5 wyników badań pokazujących zależność pomiędzy poziomem białka RAB27A/B w tkance pacjentów onkologicznych a stopniem zaawansowania danego typu nowotworu i przeżywalnością chorych. Na podstawie wykonanego przeglądu literatury Doktorantka zauważyła, że przeprowadzone do tej pory badania nie pozwalają na jednoznaczne wskazanie roli jaką pełni RAB27 podczas sekrecji sEVs przez komórki czerniaka. Wiadomo jednak, że wzrost poziomu ekspresji RAB27A w tkance nowotworowej koreluje ze stopniem zaawansowania czerniak oraz niższą przeżywalnością pacjentów.

Analiza przedmiotowej literatury pozwoliła Doktorantce na zidentyfikowanie stanu niewiedzy odnośnie roli RAB27 w czerniaku. Na tej podstawie zostały sformułowane dwa ogólne i pięć szczegółowych celów badawczych. W mojej opinii lepszym rozwiązaniem byłoby sformułowanie hipotezy badawczej w zamian za dwa cele ogólne, oraz bardziej precyzyjne postawienie celów (to jest celów szczegółowych), których realizacja dałaby możliwość potwierdzenia lub obalenia hipotezy w wyniku przeprowadzonych badań. Szczególnie dotyczy to trzeciego celu szczegółowego. Poza tym czym uzasadniony był w tym celu szczegółowym podział na białka będące produktami protoonkogenów i inne (w domyśle) białka zaangażowane w progresję nowotworu? Czy faktycznie chodziło o produkty protoonkogenów? Realizacja postawionych celów wymagała wyciszenia ekspresji genu *RAB27A* metodą CRISPR/Cas 9 w trzech liniach czerniaka ludzkiego (SkMel18, DMBC12 i A375) różniących się stopniem inwazyjności oraz przygotowanie linii A375 z nokautem podwójnym *RAB27A/B* w celu oceny potencjalnie kompensacyjnego działania RAB27B w komórkach czerniak.

Metodyka badań opisanych w niniejszej dysertacji obejmuje szereg nowoczesnych i różnorodnych metod z zakresu biologii molekularnej, biologii komórki i biochemii, takich jak otrzymywanie komórek czerniaka z nokautem genów *Rab27A* lub *RAB27A/B* metodą CRISPR/Cas 9, badanie poziomu wybranych białek na poziomie mRNA i ostatecznego

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

produktu, stopnia ich ufostorylowania przy użyciu odpowiednio metod, to jest qRT-PCR, Western Blot, cytometrii przepływowej, testu Proteome Profiler; izolację sEVs metodą wirowania różnicowego wraz z analizą ich wielkości metodą śledzenia ruchu nanocząstek (NTA), oraz ocenę potencjału proliferacyjnego (test CyQUANT Cell Proliferation Assay), migracyjnego (test zarastania ran) i inwazyjnego (test QCM ECMatrix Cell Invasion) komórek czerniaka typu dzikiego i z nokautem, a w przypadku linii A375 też z podwójnym nokautem. Moim zdaniem zostały wybrane adekwatne metody do realizacji założonych celów badawczych, a statystyczna analiza wyników została przeprowadzona przy użyciu adekwatnych testów.

Rozdział *Materiały i metody* został w większości opracowany poprawnie. W podrozdziale III.1., w którym standardowo zamieszczane są zestawienia wykorzystywanych w badaniach odczynników chemicznych, przeciwciał, komercyjnie dostępnych testów i zestawów, linii komórkowych, sekwencji starterów, Doktorantka dodała jeszcze informacje o składzie roztworów i buforów niezbędnych do przeprowadzenia poszczególnych procedur, wykorzystywanej aparaturze i oprogramowaniu niezbędnym do zbierania czy analizy danych, oraz ostatecznej wizualizacji uzyskanych wyników, a nawet o pochodzeniu używalnych materiałów laboratoryjnych, Moim zdaniem w podrozdziale III.1.9. można było specjalistyczną aparaturę wyraźnie odseparować od typowego sprzętu laboratoryjnego przez utworzenia dwóch oddzielnych kategorii. Gdyby kolejność poszczególnych podrozdziałów w obrębie III.2. lepiej odzwierciedlała kolejność w jakiej są opisywane otrzymane przez Doktorantkę wyniki w rozdziale IV., to taki układ pokazywałby lepiej sekwencyjność realizowanych przez Doktorantkę badań. Za dobry pomysł uważam umieszczenie w rozdziale III. czterech tabel pokazujących wykorzystywane sekwencje miejscowo-specyficznych RNA i sekwencje starterów do PCR i qRT-PCR oraz listę używanych przeciwciał w metodzie Western blot wraz ze stosowanymi rozcieńczeniami. Rozdział ten zilustrowany jest dwoma rycinami, które schematycznie przedstawiają otrzymywanie komórek czerniaka z nokautem genu *Rab27A* lub genów *RAB27A/B*, oraz izolację sEVs z pożywek kondycjonowanych. Moje uwagi i pytania do tej części dysertacji są następujące:

1. W rozdziale III.1.1. dobrze byłoby podać informacje o rodzajach zmian nowotworowych z jakich zostały wyprowadzone linie A375 i SkMel28, analogicznie jak w przypadku linii DMBC12. Również informacje o występujących w tych liniach mutacjach, czy stopniu inwazyjności. Te informacje pojawiają się dopiero na str. 100, a pomogłyby zrozumieć dlaczego właśnie te linie zostały wybrane do badań.
2. Na str. 40 błędnie napisano, że efektywność edycji oceniano jak opisano w pkt III.2.2.3. zamiast pkt III.2.2.4, chociaż wymieniono właściwą metodę (z użyciem T7 endonukleazy I). Analogicznie w przypadku weryfikacji obecności białek RAB27A i RAB27B metodą Western blot wskazano pkt III.4. zamiast pkt III.2.5.3.

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

3. sEVs były izolowane z pożywek (a nie podłoży) kondycjonowanych metodą wirowania różnicowego (a nie różnicującego) – str. 42.
4. Ile ml odpowiedniej pożywki kondycjonowanej potrzeba było użyć do izolacji sEVs, aby możliwe było przeprowadzenie wszystkich badań dotyczących sEVs?
5. Bardzo proszę o wyjaśnienie w jakim celu oznaczano stężenie białka metodą z BCA w wyizolowanych próbkach sEVs (pkt III.2.4.2), skoro do półilościowej analizy ilości białka (pkt III.2.3.4) oraz poziomu wybranych białek w sEVs i stopnia ich ufosforylowania metodą Western blot (pkt III.2.5.5), na 10% żel poliakryloamidowy nakładano równe objętości próbek sEVs, a nie równe ilości białka.
6. W pkt. III.2.5.2 nie napisano jak długo trwała inkubacja z II-rzędowymi przeciwciałami oraz detekcję jakich białek prowadzono po stripowaniu membran.
7. Profil proteomiczny onkoprotein był określany wyłącznie w przypadku komórek czerniaka. Bardzo proszę o podanie ile μg białka było potrzebnych do wykonania tej analizy i dlaczego analogicznych badań nie przeprowadzono dla próbek sEVs.
8. W opisie metodyki badań ekspresji powierzchniowej EGFR, HER2 i HER3 metodą cytometrii przepływowej (pkt III.2.7) brak informacji o tym jakie były rozcieńczenia poszczególnych przeciwciał i kontroli izotypowych.
9. Bardzo proszę o wyjaśnienie dlaczego dla każdej z trzech linii komórek czerniaka dawano różne ilości komórek do insertów badając ich inwazyjność (pkt III.2.10).

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biochemii

Glikokonjugatów

Wyniki uzyskane w efekcie przeprowadzonych przez Doktorantkę badań zostały zebrane w czterech tabelach i na trzydziestu pięciu rycinach. Jakość obrazów pokazujących elektroforogramy po rozdziale produktów PCR oraz wyniki immunodetekcji wybranych białek jest satysfakcjonująca, z wyjątkiem fragmentów Rycin 21 i 24 dotyczących immunodetekcji CD63. Wykresy są czytelne, a istotności statystyczne zaznaczone, w wyjątkiem Ryciny 23 (niezgodność z opisem w tekście na str. 65). Legendy do tabel i rycin są kompletne. Opis wyników spójny z dokumentacją graficzną. Próba wyprowadzenia przez doktorantkę trzech linii komórkowych (SkMel28, DMBC12 i A375) z wyciszoną ekspresją RAB27A przy użyciu systemu CRISPS/Cas9 zakończyła się sukcesem, co potwierdziła analiza poziomu mRNA RAB27A i białka RAB27A w wyselekcjonowanych klonach (Rycina 14). Dodatkowo Doktorantce udało się otrzymać wariant linii A375 z podwójnym nokautem RAB27A/B (Rycina 18). Czy podejmowana została również próba uzyskania wariantu linii SkMel28 z podwójnym nokautem RAB27A/B? Nie znalazłam na ten temat żadnych informacji w podrozdziale IV.1., chociaż wspomniano o niepowodzeniu przy uzyskiwaniu podwójnego nokautu RAB27A/B linii DMBC12. Otrzymane warianty komórek czerniaka z pojedynczym lub podwójnym nokautem RAB27A(/B) były wykorzystywane w dalszych eksperymentach.

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokonjugatow>



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Kierując się przesłankami wynikającymi z danych literaturowych wskazujących na udział RAB27A i RAB27B w regulacji procesu uwalniania małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych zarówno w stanach fizjologicznych, jak i patologicznych, Doktorantka sprawdziła czy faktycznie wyciszenie genu RAB27A (KO) lub równoczesne genów RAB27A i RAB27B (dKO) zmienia wielkość i ilość sEVs uwalnianych przez komórki czerniaka w stosunku do typu dzikiego (WT). Nie stwierdzono takich zmian, chociaż pomiędzy trzema badanymi liniami czerniaka już takie różnice występowały. Moim zdaniem interpretując wyniki dotyczące ilości całkowitego białka lub poziomu czterech markerów (CD63, CD81, TGS101 i Alix) w sEVs uwalnianych przez warianty KO, dKO i WT komórek czerniaka należy zachować dużą ostrożność. Densytometryczna analiza elektroforogramów wybarwionych metoda srebrową (Ryciny 20 i 23) oraz obrazów z Western blot (Ryciny 21 i 24) pozwala jedynie na półilościową analizę. Z tego powodu należy bardzo ostrożnie wypowiadać się na temat zmian ilościowych dotyczących markerów CD63, CD81, TGS101 i Alix w sEVs uwalnianych przez komórki KO lub dKO. Aby móc twierdzić, że cytuję „... *utrata RAB27A prowadzi do istotnych zmian w zawartości białek* (domyślam się, że w tym miejscu chodziło o ilość) *w sEVs, jednakże nie zaobserwowano jednoznacznej tendencji w modyfikacji składu białkowego pęcherzyków.* (str. 67)” należałoby przeprowadzić jakościową i ilościową analizę proteomu sEVs metodą spektrometrii mas. Ale nawet już wyniki badań przeprowadzonych przez Doktorantkę z wykorzystaniem testu Proteome Profiler pokazały, że obecność białka RAB27A zmienia ekspresję białek zaangażowanych w proces nowotworzenia i/lub progresję nowotworu w komórkach czerniaka z nokautem. Obserwowane zmiany (spadek/wzrost) poziomu danego białka i wielkość tej zmiany zależały od rodzaju linii czerniaka, a w przypadku linii A375 zależało to od tego czy nokaut był pojedynczy czy podwójny (Tabele 12 i 13). Obserwowane zmiany dotyczyły białek pełniących różnorodne funkcje biologiczne w komórce, a w obrębie tej samej kategorii funkcji niekoniecznie tych samych białek. Obserwowane zmiany dotyczyły w większym stopniu komórek mniej inwazyjnych (SkMel28 i DMBC12) niż agresywnej linii A375. Ponadto Doktorantka wykazała, że nokaut RAB27A/(B) powoduje zmianę ekspresji receptorów z rodziny HER, to jest HER2 i/lub HER3, ale nie EGFR, na poziomie mRNA i białka, ale obserwowany efekt był ponownie zależny od linii czerniaka. Wyniki dotyczące ekspresji powierzchniowej receptorów z rodziny HER uzyskane metodą cytometrii przepływową są dla mnie bardziej wiarygodne, jeśli chodzi o ocenę poziomu ekspresji danego białka, niż wyniki z analizy densytometrycznej obrazów z Western blot, z uwagi na wspomniane już ograniczenia (metoda półilościowa). Aby dokumentacja wyników z cytometrii przepływową była kompletna, to do Rycin 37 i 40 należałoby dołączyć jeszcze odpowiednie histogramy. Doktorantka wykazała również, że nokaut RAB27A/(B) powoduje spadek stopnia ufosforylowania białek AKT i ERK1/2 w komórkach DMBC12 KO i A375 dKO w porównaniu do typu dzikiego (WT). Obserwowane zmiany w poziomie wspomnianych białek można powiązać

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

z obserwowanym przez Doktorantkę spadkiem potencjału proliferacyjnego (SkMel28 KO) oraz hamowaniem zdolności migracyjnych i inwazyjnych (SkMel28 KO, DMBC12 KO, A375 dKO) komórek czerniak w wariantach z nokautem *RAB27A(B)* w porównaniu do typu dzikiego (WT).

Rozprawę doktorską kończy jedenasto-stronnicowa dyskusja, w której Doktorantka omówiła znaczenie uzyskanych przez siebie wyników na tle dostępnej literatury. Rozdział ten dobrze się czyta się, przeprowadzona analiza jest rzeczowa i wyważona, a Doktorantka wykazuje się dobrą znajomością tematyki dotyczącej zakresu prowadzonych badań i potwierdza swoją dojrzałość naukową. Interesujące są zwłaszcza te fragmenty, w których próbowała Ona znaleźć wyjaśnienie sprzeczności pojawiającymi się pomiędzy wynikami otrzymanymi przez Nią a innymi grupami badawczymi. Doktorantka zwróciła też uwagę na ograniczenia i trudności przy ocenianiu wydajności sekrecji sEVs przez komórki na podstawie metod półilościowych i NTA, na które dodatkowo wpływają też heterogenność samych sEVs, warunki hodowli komórek *in vitro*, stan fizjologiczny/patologiczny komórek. Dodatkowy problem stanowi brak standaryzacji metody izolacji EVs wykonywanych w różnych ośrodkach. Doktorantka zauważyła, że wpływ wyciszenia genu *RAB27A* na proliferację, migrację i inwazję komórek czerniaka zależał od typu linii komórkowej i starała się to powiązać ze stopniem inwazyjności poszczególnych linii komórkowych typu dzikiego. Szkoda zatem, że w wynikach nie pojawiło się liczbowe porównanie stopnia inwazyjności tych linii. Rycina 27 pokazuje tylko inwazję wariantów KO normalizowaną względem wartości dla komórek typu dzikiego. Pomimo wykazanego przez Doktorantkę wpływu *RAB27* na ekspresję białek związanych z nowotworzeniem i progresją czerniaka, dyskusja zamyka się stwierdzeniem, że przesłanki są za słabe aby *RAB27* stało się uniwersalnym celem terapeutycznym w czerniaku. Na stronie 96 Doktorantka napisała cytując „*Wpływ RAB27 na migrację i inwazyjność komórek przypisywany jest regulacji sekrecji małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych*”. Zatem, być może należało również przeprowadzić analizę jakościową i ilościową proteomu sEVs uwalnianych przez komórki czerniaka z nokautem *RAB27A* i zbadać ich wpływ na funkcje komórek docelowych (np. melanocytów, komórek czerniaka, innych komórek niszy nowotworowej). Jak Doktorantka zaplanowałaby takie eksperymenty dysponując nieograniczonym dostępem do odpowiedniej aparatury? Odpowiedź na to pytanie chciałabym usłyszeć podczas publicznej obrony. W rozdziale *Podsumowanie* brakuje wniosków końcowych będących odpowiedzią na postawione szczegółowe cele badań, których było tylko pięć. Oba streszczenia dobrze oddają treść całej rozprawy doktorskiej.

Uwagi dotyczące strony edycyjnej rozprawy doktorskiej

Rozprawa doktorska została napisana poprawianie od strony językowej i starannie przygotowana od strony edycyjnej. Nie mam większych zastrzeżeń co do poprawności formalnej manuskryptu, jakości tabel czy większości rycin. Chciałam jednak zwrócić uwagę, że należy się starać tak formatować tekst aby cała tabela była na jednej stronie (dotyczy to Tabeli

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

1). Ponadto, zgodnie z przyjętą konwencją nazwy genów powinny być zawsze pisane kursywą i należy unikać żargonu laboratoryjnego w wypowiedziach pisemnych (dotyczy to słowa „worteksować”). Dodatkowo w *Spisie treści* nie zamieszcza się elementu „spis treści”. Jeśli rozdział *Wstęp* miał się zacząć od strony 1, to do numeracji wszystkich wcześniejszych stron lepiej było użyć liczb rzymskich, a nie arabskich gdyż w takim przypadku dwa razy w dysertacji różne strony mają ten sam numer. Sam *Spis treści* jest niekompletny gdyż rozdziały III.2.2., III.2.4., III.2.5. i III.2.2.6. miały odpowiednio po 3, 3, 5 i 2 podrozdziałów.

Wnioski końcowe

Na podstawie przedstawionego powyżej podsumowania jednoznacznie stwierdzam, że badania opisane w niniejszej rozprawie doktorskiej stanowią oryginalne rozwiązanie problemu naukowego dotyczącego roli białka RAB27 w czerniaku, a moje krytyczne uwagi nie umniejszają wysokiej oceny wartości merytorycznej rozprawy doktorskiej Pani mgr Katarzyny W. Horodeckiej. Doktorantka udowodniła, że potrafi samodzielnie prowadzić badania i zrealizować postawione cele badawcze, dobrze opanowała warsztat badawczy i potrafi posługiwać się nowoczesnymi metodami, umiejętnie analizuje, prezentuje i omawia otrzymane wyniki.

Zatem z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny W. Horodeckiej pod tytułem *„Analiza funkcjonalna RAB27 w liniach komórkowych czerniaka: wydzielanie małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, migracja, inwazja i sygnalizacja komórkowa”* spełnia wszelkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w artykule 187 ust. 1-4 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 poz. 742 z późn. zmianami). W związku z powyższym, wnoszę do Rady Naukowej Instytut Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny W. Horodeckiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

dr hab. Małgorzata Przybyło, prof. UJ

Kraków, 12.02.2025 r.

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biochemii

Glikokoniuugatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniuugatow>