



**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 zewnątrzkomórkowych, 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

*Sometimes you win,
sometimes you learn*

Podziękowania

Wyrazy dozgonnej wdzięczności składam Pani prof. dr hab. Magdalenie Klink, za obdarzenie mnie nieocenioną szansą, zaufaniem i wsparciem, bez których nie ukończyłabym tej rozprawy doktorskiej

Dr Lilianie Czernek dziękuję za wprowadzenie mnie w świat egzosomów, wspólną pracę laboratoryjną i wiarę we mnie

Dr Łukaszowi Pęczkowi i dr Wojtkowi Cyprykowi serdecznie dziękuję za owocną współpracę i okazaną mi ogromną życzliwość

Pracownikom Działu Chemii Bioorganicznej CBMM PAN dziękuję za wszelką pomoc i wspólnie spędzony czas

Na zawsze w pamięci pozostanie Prof. dr hab. Markus Döchler, pomysłodawca i kierownik projektu, dzięki któremu mogłam przygotować niniejszą rozprawę doktorską

Pracę dedykuję mojej Mamie Oli

Spis treści

Spis treści.....	3
Wykaz najczęściej stosowanych skrótów	5
I. Wstęp	7
I.1 Czerniak	7
I.1.1. Molekularne podłoże czerniaka	7
I.1.2. Diagnostyka i leczenie	11
I.2. Małe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe	16
I.2.1. Historia pęcherzyków zewnątrzkomórkowych.....	17
I.2.2. Biogeneza małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych	19
I.2.3. Wychwyty małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych	21
I.2.4. Funkcje małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych	23
I.2.5. Zastosowanie małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w diagnostyce i terapii	27
I.3. RAB27	28
I.3.1. Funkcje RAB27	30
II. Cel pracy	35
III. Materiały i metody	36
III.1. Materiały	36
III.1.1. Linie komórkowe	36
III.1.2. Odczynniki i inne materiały laboratoryjne	36
III.1.3. Przeciwciała	38
III.1.4. Testy i zestawy komercyjne.....	39
III.1.5. Bufory i roztwory chemiczne.....	40
III.1.6. Podłoża	41
III.1.7. Oligonukleotydy	42
III.1.8. Materiały plastikowe	43
III.1.9. Aparatura i sprzęt laboratoryjny	44
III.1.10. Oprogramowanie	44
III.2. Metody	45
III.2.1. Hodowla komórek	45
III.2.2. Otrzymanie linii komórkowych z nokautem.....	45
III.2.3. Izolacja małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych.....	48
III.2.4. Analiza wielkości i liczby sEVs oraz stężenia całkowitego białka.....	49
III.2.5. Ocena poziomu białek i stopnia ich ufosforylowania w komórkach i/lub w sEVs.....	50
III.2.6. Ocena poziomu mRNA za pomocą qRT-PCR.....	53
III.2.7. Cytometria przepływowa	54

III.2.8. Ocena proliferacji komórek	54
III.2.9. Ocena migracji komórek.....	54
III.2.10. Ocena inwazyjności komórek	55
III.2.12. Analiza statystyczna	55
IV. Wyniki.....	57
IV.1. Otrzymanie linii komórkowych czerniaka z nokautem <i>RAB27A</i> i <i>RAB27A/B</i>	57
IV.2 Ocena udziału białek Rab27A i Rab27B w uwalnianiu sEVs przez ludzkie komórki czerniaka ...	66
IV.3. Analiza aktywności funkcjonalnej komórek czerniaka dzikich i z nokautem <i>RAB27</i>	74
IV.3.1. Ocena proliferacji, migracji i inwazji komórek	74
IV.3.2. Profil proteomiczny onkoprotein	78
IV.3.3. Ocena ekspresji białek z rodziny HER.....	89
IV.3.4. Ocena poziomu i stopnia ufosforylowania białek sygnałowych AKT i ERK	93
V. Dyskusja.....	96
VI. Podsumowanie.....	108
VII. Streszczenie.....	109
VIII. Abstract	111
IX. Bibliografia.....	113
XI. Dorobek naukowy	127

Wykaz najczęściej stosowanych skrótów

- AKT (ang. *serine-threonine protein kinase*) - serynowo-treoninowa kinaza
- Ab (ang. *antibody*) - przeciwciało
- BSA (ang. *bovine serum albumin*) - surowicza albumina bydłęca
- Cas9 (ang. *CRISPR associated protein 9*) - białko związane z CRISPR
- CRISPR (ang. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) - zgrupowane, regularnie rozproszone, krótkie, powtarzające się sekwencje palindromiczne
- DNA (ang. *deoxyribonucleic acid*) - kwas deoksyrybonukleinowy
- ECM (ang. *extracellular matrix*) - macierz zewnątrzkomórkowa
- EGFR (ang. *epidermal growth factor receptor*) - receptor nabłonkowego czynnika wzrostu
- EMT (ang. *epithelial-mesenchymal transition*) - przejście epitelialno-mezenchymalne
- ERK1, ERK2 (ang. *extracellular signal-regulated kinases 1, 2*) - kinazy regulowane przez sygnały zewnątrzkomórkowe 1 i 2
- ESCRT (ang. *endosomal sorting complex required for transport*) - endosomalny kompleks sortujący wymagany do transportu
- FBS (ang. *fetal bovine serum*) - płodowa surowica bydłęca
- GAP (ang. *GTPase-activating protein*) - białko aktywujące GTPazę
- GDP (ang. *guanosine 5'-diphosphate*) - guanozyno-5'-difosforan; difosforan guanozyny
- GEF (ang. *guanine nucleotide exchange factor*) - czynnik wymiany nukleotydów guaninowych
- GTP (ang. *guanosine-5'-triphosphate*) - guanozyno-5'-trifosforan
- GTPaza (ang. *GTPase, guanosine 5'-triphosphatase*) - guanozyno-5'-trifosfataza; fosfohydrolaza guanozynotrifosforanu
- IL (ang. *Interleukin*) - interleukina
- KD (ang. *knockdown*) - "knockdown", wyciszenie genu z użyciem siRNA/shRNA
- KO (ang. *knockout*) - nokaut, wyciszenie genu z użyciem CRISPR
- MMP (ang. *matrix metalloproteinase*) - metaloproteinaza macierzy
- mRNA (ang. *messenger RNA*) - matrycowy RNA
- MVB (ang. *multivesicular body*) - ciałko wielopęcherzykowe
- NHEJ (ang. *non-homologous end joining*) - łączenie niehomologicznych końców
- PBS (ang. *phosphate-buffered saline*) - zbuforowany roztwór soli fizjologicznej
- PCR (ang. *polymerase chain reaction*) - reakcja łańcuchowa polimerazy
- RAB (ang. *Ras-related in brain*) - białko w mózgu związane z Ras
- RFU (ang. *relative fluorescence unit*) - względna jednostka fluorescencji
- RNA (ang. *ribonucleic acid*) - kwas rybonukleinowy

- RNP (ang. *ribonucleoprotein*) - kompleksy rybonukleoproteinowe
- qRT-PCR (ang. *quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*) - ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją
- siRNA (ang. *small interfering RNA*) - krótkie interferujące RNA
- shRNA (ang. *short hairpin RNA*) - krótkie RNA o strukturze spinki do włosów
- SD (ang. *standard deviation*) - odchylenie standardowe
- sEVs (ang. *small extracellular vesicles*) - małe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe
- sgRNA (ang. *single guide RNA*) - jednoniciowa sekwencja RNA miejscowo-specyficzna
- TGF- β (ang. *transforming growth factor β*) - transformujący czynnik wzrostu beta
- TNF- α (ang. *tumor necrosis factor α*) - czynnik martwicy nowotworów alfa
- VEGF (z ang. *vascular endothelial growth factor*) - czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego
- vs - *versus*
- WT (ang. *wild type*) - typ dziki

I. Wstęp

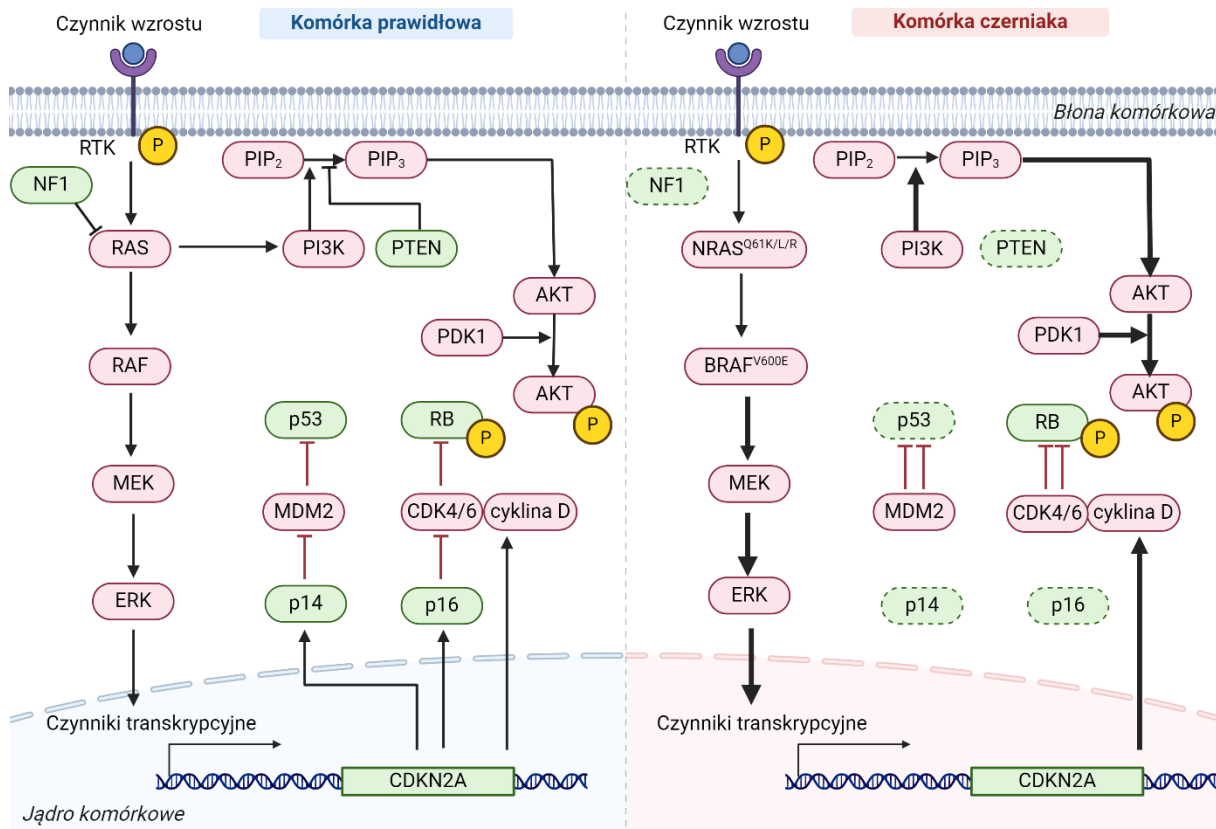
I.1 Czerniak

Czerniak jest złośliwym nowotworem wywodzącym się z melanocytów, czyli komórek pochodzenia neuroektodermalnego produkujących melaninę. Melanocyty są obecne głównie w skórze, ale występują również w błonie naczyniowej oka, oponach mózgowych czy nabłonkach śluzówki dróg oddechowych i moczowo-płciowych oraz układu pokarmowego. Skórna postać czerniaka stanowi około 90% przypadków zachorowań. Początkowo nowotwór w skórze objawia się zmianą o radialnej fazie wzrostu, obecną w powierzchniowej warstwie naskórka. Wcześniej wykryty czerniak może być skutecznie usunięty chirurgicznie, co daje niemal stuprocentową wyleczalność. Niestety nowotwór może przekształcić się do wertykalnej fazy wzrostu, kiedy nacieka w głąb skóry właściwej, a następnie tworzyć przerzuty do węzłów chłonnych i odległych organów. Przeżywalność pacjentów z czerniakiem skóry w IV stadium wynosi zaledwie około 30%. Wystąpienie tego nowotworu złośliwego w innych organach związane jest z jeszcze gorszymi prognozami [1, 2].

I.1.1. Molekularne podłoże czerniaka

Czerniak jest typem nowotworu o największej liczbie mutacji (średnio 38 mutacji na milion par zasad), co przypisuje się głównie ekspozycji na promieniowanie ultrafioletowe (ang. *ultraviolet radiation*, UVR). Główną funkcją melanocytów jest produkcja melaniny w celu ochrony sąsiadujących keratynocytów przed UVR ze światła słonecznego. Mimo to, same melanocyty są wrażliwe na mutagenne właściwości promieniowania ultrafioletowego, które indukuje powstawanie mutacji punktowych, głównie C > T. W komórkach czerniaka obecne są także mutacje strukturalne, takie jak zmiana liczby kopii czy rearanżacje genów. Są one głównymi czynnikami wywołującymi transformację nowotworową w melanocytach nieekspozowanych na słońce [3, 4].

Mutacje kierujące (ang. *driver mutations*) zidentyfikowano w ponad 40 genach i były zależne od typu czerniaka (Tabela 1). Modyfikują one wiele kluczowych dla funkcjonowania komórki szlaków sygnałowych, m.in. szlak kinaz białkowych aktywowanych mitogenem (ang. *mitogen-activated protein kinases*, MAPK), szlak 3-kinazy fosfatidyloinozytolu (ang. *phosphatidylinositol 3-kinase*, PI3K), szlak białka siatkówczaka (ang. *retinoblastoma*, Rb) oraz szlak inicjowany przez białko p53 (Rycina 1). Badania wskazują, że wraz z transformacją melanocytów komórki czerniaka nabywają mutacje w sposób sekwencyjny. Analiza genomiczna i transkryptomyczna pokazała, że zmiany genetyczne indukowały kolejno: aktywację szlaku MAPK, zwiększoną regulację telomerazy, przekroczenie punktu kontrolnego G1/S, zwiększenie przekazywania sygnałów przez MAPK, zakłócenie szlaku Rb/p53 i aktywację szlaku PI3K [5].



Rycina 1. Schemat przedstawiający szlaki sygnałowe w prawidłowych melanocytach oraz komórkach czerniaka. Konstytutywna aktywacja szlaków (zaznaczona grubymi strzałkami) i mutacje skutkujące utratą funkcji (zaznaczona przerywaną linią konturu) prowadzą do transformacji nowotworowej. Onkogeny zaznaczono na czerwono, a geny supresorowe na zielono.

Ścieżka sygnałowa RAS/RAF/MEK/ERK jest aktywowana przez czynniki ze środowiska komórki, np. czynniki wzrostu, hormony, cytokiny, które oddziałują na receptory błonowe o aktywności kinazy tyrozynowej (RTK). Receptory błonowe po przyłączeniu cząsteczek sygnałowych ulegają dimeryzacji, co aktywuje białka RAS związane z wewnętrzną stroną błony. Aktywowany RAS (izoformy NRAS, KRAS, HRAS) pobudza białko RAF (izoformy BRAF, CRAF, ARAF) poprzez jego rekrutację z cytozolu do błony komórkowej, oraz PI3K. Aktywowana kinaza RAF fosforyluje i aktywuje białka MEK1 i MEK2, które z kolei fosforylują i aktywują kinazy regulowane przez sygnały zewnątrzkomórkowe 1 i 2 (ang. *extracellular signal-regulated kinases*, ERK). Aktywowane białka ERK1/2 przemieszczają się z cytoplazmy do jądra komórkowego, gdzie poprzez fosforylację aktywują czynniki transkrypcyjne regulujące podstawowe procesy komórkowe, takie jak proliferacja, różnicowanie i przeżywalność. Mutacje w genach białek należących do szlaku RAS/RAF/MEK/ERK występują w niemal 100% czerniaków. Około połowę przypadków stanowi mutacja genu *BRAF*, a w ~90% z nich występuje substytucja kwasu glutaminowego na walinę (*BRAF*^{V600E}). Mutacje *BRAF* powodują zmianę konformacji białka zwiększającą jego aktywność kinazową, co skutkuje konstytutywną aktywacją ścieżki sygnałowej

RAS/RAF/MEK/ERK. Dodatkowo liczba mutacji aktywujących ten szlak sygnałowy wzrasta wraz z progresją nowotworu [1, 2].

Kolejną często występującą zmianą w materiale genetycznym w czerniaku jest mutacja *NRAS*^Q, wykrywana u 13-25% pacjentów, a jej najczęstszą postacią jest substytucja glutaminy lizyną, leucyną lub arginina (*NRAS*^{Q61K/L/R}). Poza szlakiem MAPK, NRAS jest również zaangażowany w ścieżkę sygnałową PI3K-AKT. Szlak ten jest aktywowany poprzez stymulację komórek cytokinami, insuliną i czynnikami wzrostu. Ich przyłączenie do receptora kinaz tyrozynowych powoduje jego autofosforylację, co rekrutuje do błony komórkowej PI3K. PI3K przekształca fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan (PIP2) do fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trisfosforanu (PIP3). PIP3 rekrutuje do błony komórkowej serynowo-treoninową kinazę (ang. *serine-threonine protein kinase*, AKT) i jej aktywator - fosfatydyloinozytolo-zależną kinazę 1 (PDK1). PDK1 fosforyluje resztę treoninową obecną w AKT w pozycji 308. Do pełnej aktywacji AKT wymagana jest także fosforylacja reszty serynowej w pozycji 473. Aktywna kinaza AKT przemieszcza się do cytoplazmy i fosforyluje białka zaangażowane w procesy komórkowe, takie jak proliferacja, wzrost, przeżywalność i apoptoza [1, 2]. W około 14-17% przypadków czerniaka obserwuje się mutację w obrębie genu *NF1*, kodującego neurofibrominę 1. Utrata funkcji *NF1* skutkuje konstytutywną aktywacją RAS, a co za tym idzie hiperaktywacją szlaków MAPK i PI3K. W literaturze często można spotkać się z podziałem na cztery podtypy czerniaka: z mutacjami *BRAF*, *NRAS*, *NF1*, lub potrójny typ dziki [5, 6].

Początkowa faza progresji z łagodnego znamienia wydaje się zależeć od ekspresji *TERT*, katalitycznej podjednostki telomerazy, odpowiadającej za utrzymanie stabilności chromosomalnej. Mutacje w promotorze *TERT* wykrywa się u około 70% pacjentów. Prawdopodobnie na tym etapie pojawiają się także mutacje w genach białek przebudowujących chromatynę, m.in. *ARID2*, *ARID1A* i *ARID1B* [2, 5]. Przejście ze stopnia pośredniego do czerniaka najczęściej zachodzi pod wpływem biallelicznej utraty funkcji genu inhibitora kinazy cyklinozależnej 2A (ang. *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*, *CDKN2A*) na skutek mutacji. Gen ten koduje dwa białka: p16 i p14, które są zaangażowane w szlaki sygnałowe odpowiednio RB i p53. W warunkach fizjologicznych p16 aktywuje retinoblastomę, gen supresorowy, poprzez wiązanie i negatywną regulację kinaz 4/6 zależnych od cyklina (ang. *cyclin dependent kinase 4/6*, CDK4 i CDK6). W ten sposób blokowane jest przejście cyklu komórkowego z fazy G1 do S, co zatrzymuje proliferację komórkową. Z kolei białko p14 zapobiega degradacji p53 przez MDM2 (ang. *mouse double minute 2*), co pozwala na naprawę uszkodzeń DNA, zatrzymanie cyklu komórkowego i apoptozę. A zatem utrata funkcji *CDKN2A* skutkuje zaburzeniem szlaków kontrolujących przejście cyklu komórkowego (szlak RB) i apoptozy (szlak p53). Mimo, że tylko 10% przypadków czerniaka jest dziedziczne, mutacja *CDKN2A* występuje w około 40% rodzin dotkniętych obciążeniem genetycznym. Drugim genem, którego mutacje predysponują do wystąpienia dziedzicznego czerniaka jest *CDK4* [1]. W inwazyjnej, przerzutowej postaci nowotworu pojawiają się

trzeciorzędowe mutacje, na przykład w *PTEN* czy *TP53*. *PTEN* jest genem supresorowym kodującym białko o aktywności fosfatazy lipidowo-białkowej, który jest negatywnym regulatorem szlaku PI3K/AKT. Jego inaktywacja skutkuje niekontrolowanym wzrostem komórki. Z kolei *TP53* koduje białko p53, które reguluje naprawę DNA, hamowanie cyklu komórkowego oraz apoptozę, między innymi w odpowiedzi na uszkodzenia wywołane promieniowaniem ultrafioletowym. Wywołana mutacjami inaktywacja genów *PTEN* czy *TP53* skutkuje niekontrolowanym wzrostem komórki [2, 5].

Należy zaznaczyć, że najczęściej występujące mutacje w czerniaku skórnym są różne od tych występujących w czerniaku błon śluzowych lub oka. W około 90% przypadków czerniaka oka główną mutacją kierującą jest ta obecna w genie *GNAQ* lub *GNA11*. Z kolei w czerniaku błon śluzowych w 30-40% przypadków obserwuje się amplifikacje i mutacje *KIT* [1, 2]. Szczegółowy opis najczęściej występujących mutacji w różnych typach czerniaka przedstawiono w tabeli 1.

Czerniaki są nowotworami wysoce heterogennymi, charakteryzującymi się znaczną zmiennością genetyczną i plastycznością komórkową. Subpopulacje komórek, a nawet pojedyncze klony wykazują odrębne programy transkrypcyjne, które nie są powiązane z poszczególnymi mutacjami, a raczej są związane z różnymi fenotypami komórkowymi, takimi jak skłonność do proliferacji lub inwazji. Programy te kształtowane są przez połączenie wtórnych mutacji genetycznych, wpływu mikrośrodowiska i specyficznych konfiguracji epigenetycznych. Liczne badania wskazują, że komórki czerniaka mogą cechować się fenotypem proliferacyjnym lub inwazyjnym, a dodatkowo posiadają zdolność „przełączania” fenotypów (ang. *phenotype switching*), co przypomina zjawisko przejścia epitelialno-mezenchymalnego, występującego w komórkach nowotworowych pochodzenia nabłonkowego. Badania prowadzone na liniach komórkowych czerniaka oraz tkankach pobranych z guzów wskazują różne geny jako markery fenotypu proliferacyjnego i inwazyjnego. Do markerów fenotypu proliferacyjnego zaliczane są m.in. *MITF*, *SOX10*, *PAX3*, *EDNRB*. Natomiast fenotyp inwazyjny może być identyfikowany na podstawie wysokiej ekspresji m.in. *AXL*, *WNT5A*, *DKK1*, *TGFβ*, *HIF1α*, *TEAD*, *AP1*, *GAS7* [7].

Liczne badania podkreślają szczególnie istotny wpływ czynnika transkrypcyjnego związanego z mikroftalmią (ang. *microphthalmia-associated transcription factor*, *MITF*) na plastyczność komórek czerniaka. *MITF* uznawany jest za kluczowy regulator różnicowania melanocytów, modulujący ekspresję genów zaangażowanych w progresję cyklu komórkowego (np. *CDK2*, *CDKN2A*, *p16*), produkcję melaniny (np. *TYR*, *TYRP1*, *PMEL*, *RAB27A*), czy przeżywalność komórek (np. *BCL2*, *HIF1A*, *c-MET*). Rola *MITF* w czerniaku jest niezwykle złożona, jednak zaobserwowano zależność pomiędzy jego poziomem, a charakterem komórek czerniaka. Początkowo zauważono różnice w poziomie mRNA i białka *MITF* i *AXL* pomiędzy liniami komórkowymi czerniaka. Komórki o wysokim poziomie *AXL* (*AXL+*) i niskim poziomie *MITF* (*MITF-*) posiadały większą zdolność do migracji i inwazji, niż komórki o odwrotnym poziomie *AXL*/*MITF+* [8]. Następnie sekwencjonowanie RNA pojedynczych komórek

z tkanek pacjentów wykazało, że w guzach współistniały dwie populacje, *MITF+* i *AXL+* [9]. Uważa się, że wysoki poziom ekspresji *MITF* jest obecny w proliferacyjnym fenotypie, nazywanym również stanem melanocytowym. Wraz z *SOX10* i *PAX3*, *MITF* promuje przeżywalność i proliferację. Z kolei niski poziom *MITF* jest związany z fenotypem inwazyjnym i występuje w połączeniu ze zwiększoną ekspresją *AXL*. Skutkuje to aktywacją genów takich jak *SOX9*, *SOX2* i *TGFβ*, które promują odróżnicowanie, powolny cykl komórkowy lub fazę spoczynku oraz przejście epitelialno-mezenchymalne. W obrębie fenotypu *MITF-* wyróżnia się subpopulację podobną do komórek mezenchymalnych, oraz podobną do macierzystych komórek grzebienia nerwowego [9]. Co ciekawe, zauważono, że komórki inicjujące powstawanie przerzutów mogą zmieniać swój charakter podczas migracji i inwazji w odpowiedzi na czynniki środowiskowe, takie jak stan zapalny, dostęp substancji odżywczych lub tlenu, czy chemioterapeutyki. Zaobserwowano, że pod wpływem m.in. transformującego czynnika wzrostu β (ang. *transforming growth factor β*, TGFβ), czynnika martwicy nowotworów α (ang. *tumor necrosis factor-alpha*, TNF-α) czy białka sygnałowego WNT5A następowało odróżnicowanie komórek *MITF-*, co umożliwiała ich rozprzestrzenianie i powstawanie przerzutów. Natomiast po kolonizacji nowego miejsca, poprzez działanie endoteliny 3 (ang. *endothelin 3*, EDN3) i dzięki sztywności macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *extracellular matrix*, ECM) wywołanej dużą ilością kolagenu, komórki przełączały się do stanu *MITF+* i nabierały fenotypu proliferacyjnego [7]. Wskazuje się także na istnienie współpracy pomiędzy różnymi fenotypowo subpopulacjami. Tworzą one heterogenne klastry złożone z centrum komórek inwazyjnych otoczonych komórkami proliferacyjnymi, co ma ułatwiać przerzutowanie [10]. Dodatkowo, analiza pojedynczych komórek z bioptatów czerniaka pozwoliła na wykrycie populacji komórek w stanie pośrednim, które posiadały zarówno fenotyp proliferacyjny, jak i inwazyjny [11]. Należy dodać, że *MITF* w zależności od kontekstu może także stymulować inwazję, m.in. poprzez promowanie nadekspresji białek przebudowujących macierz zewnątrzkomórkową. Ponadto, amplifikacja *MITF*, a więc fenotyp proliferacyjny jest związany z gorszą przeżywalnością pacjentów z czerniakiem [7].

I.1.2. Diagnoza i leczenie

Diagnozę czerniaka w 2020 roku usłyszało 325 000 pacjentów na całym świecie. W tym samym roku 57 000 pacjentów zmarło z powodu tego nowotworu [12]. Według WHO w Polsce w 2021 roku zmarło 1457 osób w wyniku zachorowania na czerniaka (WHO mortality database). W ciągu ostatnich pięćdziesięciu lat liczba zachorowań wzrosła, szczególnie wśród osób o jasnej karnacji, pochodzenia europejskiego. Jest to spowodowane zwiększającą się ekspozycją na promieniowanie ultrafioletowe, które jest kluczowym czynnikiem odpowiadającym za powstanie 75% przypadków czerniaka. Przeżywalność zależy od wielu czynników - płci (większa przeżywalność kobiet), typu czerniaka,

grubości zmiany, miejsca występowania na ciele, i co najważniejsze, stadium w momencie diagnozy. Wcześniej wykryty czerniak, skutecznie usunięty chirurgicznie, jest niemal w 100% uleczalny [12, 13].

Diagnostyka czerniaka rozpoczyna się od stwierdzenia obecności zmian skórnych, powstałych *de novo* lub w obrębie istniejącego znamienia barwnikowego. Na podstawie wywiadu chorobowego ocenia się towarzyszące zmianom objawy oraz czynniki zwiększające ryzyko zachorowania na czerniaka, m.in. częstość ekspozycji na UVR czy przebyte oparzenia słoneczne. Zalecanym badaniem jest dermatoskopia, jako nieinwazyjna i szybka diagnostyka, polegająca na oglądaniu zmian w 10-krotnym powiększeniu za pomocą dermatoskopu. Trzypunktowa skala dermatoskopowa wg Argenziano zakłada podejrzenie czerniaka na podstawie spełnienia dwóch z trzech następujących kryteriów: (I) asymetryczny rozkład struktur dermatoskopowych w obrębie zmiany, (II) atypowa siatka barwnikowa, (III) niebiesko-białawy welon. Rekomenduje się także wykonywanie fotografii zmian, lub całej powierzchni skóry w celu prowadzenia obserwacji w czasie [14].

Biopsja wycinająca pierwotną zmianę jest postępowaniem z wyboru, a badanie histopatologiczne umożliwia określenie jej cech makro- i mikroskopowych. Badanie to pozwala na klasyfikację histopatologiczną, oceniana jest także grubość nacieku wg Breslowa, stopień zaawansowania według klasyfikacji TNM, faza wzrostu, obecność owrzodzenia, liczba podziałów mitotycznych na 1 mm², obecność mikroskopowych ognisk satelitarnych oraz marginesu obwodowego i głębokiego. Według rekomendacji WHO z 2018 roku klasyfikacja zmian melanocytarnych uwzględnia podział na czerniaki skóry spowodowane dużym uszkodzeniem skóry wynikającym ze skumulowanej wysokiej dawki promieniowania (ang. *high cumulative sun-damage* (CSD)) oraz niewielkim uszkodzeniem skóry wynikającym z niewielkiej, lub sporadycznej ekspozycji na promieniowanie (*low CDS*). Wyróżnia się także czerniaki niezwiązane z promieniowaniem UV, m.in. czerniak akralny, błon śluzowych, czy guzkowy. Szczegółową klasyfikację przedstawiono w tabeli 1 [14, 15].

Tabela 1. Klasyfikacja patomorfologiczna czerniaków. Mutacje wyróżniono kolorami oznaczającymi: utratę funkcji, nabycie funkcji, zmianę funkcji, amplifikację, rearanżację, mutację promotora [15]

Ekspozycja na promieniowanie UV	Typ czerniaka	Najczęściej występujące mutacje Inicjujące (I) i w trakcie progresji (II)
Sporadyczna	Szerzący się powierzchownie	I BRAF V600E lub NRAS II TERT, CDKN2A , TP53 , PTEN
Przewlekła	Złośliwa plama soczewicowata	I NRAS , BRAF (nie V600E), KIT lub NF1 II TERT, CDKN2A , TP3 , PTEN , RAC1
Przewlekła	Desmoplastyczny	I NF1 , ERBB2 , MAP2K1 , MAP3K1 , BRAF , EGFR , MET II TERT, NFKBIE , NRAS , PIK3CA , PTPN11
Brak/niezwiązana	Spitz	I HRAS , ALK , ROS1 , RET , NTRK1 , NTRK3 , BRAF lub MET II CDKN2A

Akralny (podpaznokciowo-kończynowy)	I KIT, NRAS, BRAF, HRAS, KRAS, NTRK3, ALK lub NF1 II CDKN2A, TERT, CCND1, GAB2
Błon śluzowych: -lentignalny błon śluzowych -guzkowy błon śluzowych	I KIT, NRAS, KRAS lub BRAF II NF1, CDKN2A, SF3B1, CCND1, CDK4, MDM2
Wywodzący się z olbrzymiego znamienia wrodzonego	I NRAS, BRAF V600E lub BRAF
Wywodzący się ze znamienia błękitnego	I GNAQ, GNA11 lub CYSLTR2 II BAP1, EIF1AX, SF3B1
Narządu wzroku: -błony naczyniowej -spojówki	I GNAQ, GNA11, CYSLTR2 lub PLCB4 II BAP1, SF3B1, EIF1AX

Bazową terapią czerniaka jest leczenie chirurgiczne. Na podstawie biopsji wyciętej zmiany pierwotnej podejmuje się decyzję o radykalnym wycięciu blizny z odpowiednim marginesem oraz biopsji wartowniczego węzła chłonny. Po stwierdzeniu obecności przerzutów w węzłach chłonnych zaleca się obserwację i badanie ultrasonograficzne splotu chłonnego co 3-4 miesiące, lub limfadenektomię (usunięcie węzłów chłonnych) przy wysokim ryzyku nawrotu. W przypadku wystąpienia ognisk satelitarnych, przerzutów lub wznowy miejscowej terapią z wyboru jest radykalne leczenie chirurgiczne. Jako leczenie uzupełniające stosowana jest immunoterapia lub terapia celowana w przypadku występowania mutacji *BRAF*. Niestety leczenie zaawansowanego, nieoperacyjnego lub przerzutowego czerniaka wciąż stanowi wyzwanie. Jeszcze trzydzieści lat temu nie istniała w zasadzie skuteczna terapia dla chorych na czerniaka z przerzutami, a wskaźnik 5-letniego przeżycia takich pacjentów wynosił jedynie 5% [16]. Przełom nastąpił w 2011 roku, gdy wprowadzono terapie ukierunkowane na immunologiczne punkty kontrolne. Pierwszym lekiem tego typu, zaakceptowanym przez Agencję Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*, FDA) w marcu 2011 roku, był ipilimumab, monoklonalne przeciwciało skierowane przeciwko antygenowi-4 cytotoksycznych limfocytów T (ang. *cytotoxic T cell antigen 4*, CTLA-4). Wskaźnik 5-letniego przeżycia pacjentów z zaawansowanym czerniakiem wzrósł, jednak wysoka toksyczność ipilimumabu zmusiła do poszukiwania alternatywnych metod (Tabela 2). Od 2014 roku zaczęto stosować przeciwciała ukierunkowane na receptor programowanej śmierci (ang. *programmed death receptor 1*, PD-1), nivolumab i pembrolizumab, które dawały lepszą odpowiedź terapeutyczną, a mniejszą toksyczność niż przeciwciało anty-CTLA-4. Największą efektywność zapewnia terapia skojarzona, przeciwciałami anty-CTLA-4 i anty-PD-1. W badaniach klinicznych terapia skojarzona nivolumabem i ipilimumabem była bardziej skuteczna, niż zastosowanie pojedynczego leku w leczeniu nieoperacyjnego czerniaka w stadium III lub IV. Mediana czasu przeżycia wolnego od progresji wynosiła 11,5 miesiąca dla pacjentów leczonych terapią skojarzoną, w porównaniu do 2,9 miesiąca dla samego ipilimumabu i 6,9 miesiąca dla samego nivolumabu. Wiązało się to jednak ze zwiększonym występowaniem skutków

ubocznych 3-4 stopnia, które odnotowano u 55% pacjentów leczonych przeciwciałami anti-PD-1 i anti-CTLA-4, w porównaniu do 16,3% i 27,3% odpowiednio dla samego nivolumabu i ipilimumabu [17]. Wyzwanie w leczeniu stanowi wrodzona oporność na immunoterapię, występująca u 40-65% pacjentów, i nabyta oporność, występująca u 30-40% pacjentów [17, 18].

Alternatywną terapią jest leczenie inhibitorami BRAF (vemurafenib, dabrafenib i encorafenib) w przypadku nowotworów posiadających mutację tego genu. W sierpniu 2011 roku FDA zatwierdziło stosowanie vemurafenibu, jako pierwszego leku selektywnie działającego na mutacje BRAF. W celu zwiększenia efektywności terapii chorym podaje się także połączenie inhibitorów BRAF i MEK (trametinib, cobimetinib, binimetinib). Mimo to 15-20% pacjentów z mutacją BRAF V600 ma wrodzoną oporność na leczenie, a nabyta oporność występuje średnio po 9-11 miesiącach [19].

Radioterapia rozważana jest tylko w indywidualnych przypadkach, a jedynym chemioterapeutycznym zarejestrowanym do leczenia czerniaka jest dakarbazyna, ale odpowiedź terapeutyczna występuje tylko u 4-12% pacjentów [20].

Duże nadzieje pokłada się w terapii komórkowej. Najnowszym lekiem zaakceptowanym przez FDA w lutym 2024 roku, jest Amtagvi (lifileucel). Jest to pierwsza terapia komórkowa rekomendowana do leczenia guzów litych i opiera się na wykorzystaniu limfocytów T naciekających nowotwór. Jest to autologiczna terapia, polegająca na jednorazowej iniekcji dożylnych limfocytów T, które zostały pobrane z guza pacjenta, a następnie namnożone *ex vivo*. Podanie miliardów poliklonalnych, osobniczo-specyficznych limfocytów T skutkuje ich migracją do miejsca występowania guza, gdzie komórki nowotworowe są rozpoznawane i niszczone. Leczenie jest zalecane u pacjentów z zaawansowanym czerniakiem (nieoperacyjnym lub przerzutującym, w stadium IIIC/IV), u których nastąpiła progresja choroby po wcześniejszym leczeniu inhibitorem PD-1 i, w przypadku wystąpienia mutacji BRAF, inhibitorami BRAF/MEK. Obiektywną odpowiedź na leczenie, czyli całkowitą remisję lub zmniejszenie guzów o co najmniej 30%, uzyskano u 48 z 153 (31,4%) pacjentów. Mediana przeżycia całkowitego i przeżycia wolnego od progresji wynosiły odpowiednio 13,9 i 4,1 miesiący. Warto podkreślić, że odpowiedź terapeutyczna wystąpiła u jednej czwartej pacjentów, którzy wyczerpali już wszystkie dostępne opcje terapii, a zatem leczenie lifileucelem stanowiło dla nich ostatnią szansę [21].

Tabela 2. Przegląd badań klinicznych leków stosowanych w leczeniu czerniaka.

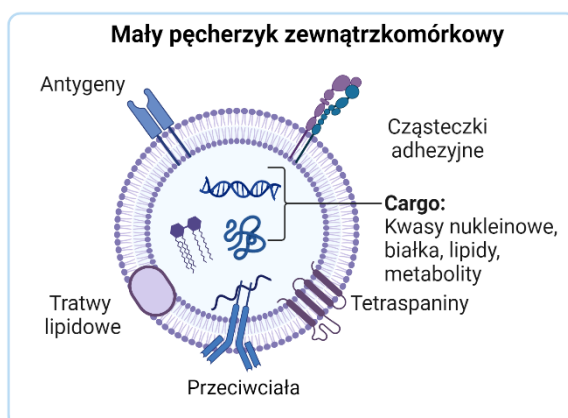
Lek (dawka)	Stadium czerniaka, liczba pacjentów (n)	Odpowiedź terapeutyczna	Skutki uboczne 3-5 stopnia	Nazwa badania klinicznego, rok publikacji
Ipilimumab vs. placebo	III, po resekcji (n=951)	5-letni PFS 40,8% ipi, 30,3% placebo	54,1% ipi, 26,2% placebo	EORTC18071, 2016 [22]
Ipilimumab	III/IV, z przerzutami (n=151)	ORR 9%, średni czas PFS 2,7 miesiący	28%	Ipi4, 2021[23]
Nivolumab vs. ipilimumab	IIIB-C/IV, po resekcji (n=906)	4-letni PFS 51,7% nivo, 41,2% ipi	14,4% nivo, 45,9% ipi	Checkmate-238, 2020 [24]
Nivolumab + ipilimumab vs. nivolumab vs. placebo	IV, po resekcji (n=167)	4-letni PFS 64,2% nivo + ipi, 31,4% nivo, 15% placebo	71% nivo + ipi, 27% nivo	Immuned 2022 [25]
Nivolumab + ipilimumab	III/IV, z przerzutami (n=60)	1,5-roczny PFS 52%	56,7%	ADAPT-IT, 2023[26]
Nivolumab + ipilimumab vs. nivolumab	IIIB-D/IV, po resekcji (n=1833)	2-letni PFS 64,5% nivo + ipi, 63,2% nivo	32,6% nivo + ipi, 12,8% nivo	CheckMate 915, 2023 [27]
Nivolumab + ipilimumab vs. nivolumab vs. ipilimumab	III/IV, nieusuwalny/ z przerzutami (n=951)	5-letni PFS 36% nivo + ipi, 29% nivo, 8% ipi	59% nivo + ipi, 23% nivo, 28% ipi	CheckMate 067, 2019 [17]
Relatlimab + nivolumab vs. nivolumab	III/IV, nieusuwalny/ z przerzutami (n=714)	Roczny PFS 47,7% relatlimab + nivo, 36% nivo	18,9% relatlimab + nivo, 9,7% nivo	RELATIVITY-047, 2022 [18]
Pembrolizumab vs. placebo	IIIA-C, po resekcji (n=1019)	3,5 letni PFS 59,8% pem, 41,4% placebo	14,7% pem, 3,4% placebo	EORTC 1325/Keynote-054 2021 [28]
Pembrolizumab vs. ipilimumab	III/IV, nieusuwalny/ z przerzutami (n=811)	7-letni PFS 23,8% pem, 13,3% ipi	17% pem, 20% ipi	Keynote 006, 2023 [29]
Vemurafenib vs. Dakarbazyna	IIIC/IV (n=675)	Średni OS 13,6 miesiący vemurafenib, 9,7 miesiący dakarbazyna	77% vemurafenib, 43% dakarbazyna	BRIM-3, 2017 [30]
Encorafenib + binimetinib vs. vemurafenib vs. encorafenib	IIIB-C/IV, nieusuwalny/ z przerzutami (n=577)	7-letni PFS 21,2% encorafenib + binimetinib, 6,4% vemurafenib, 15,8% encorafenib	70,3% encorafenib + binimetinib, 65,6% vemurafenib, 70,3% encorafenib	Columbus 7, 2024 [31]
Dabrafenib + trametinib	III/IV, nieusuwalny/ z przerzutami (n=563)	5-letni PFS 19% dabrafenib + trametinib	48%	COMBI-d/-v, 2019 [19]
Dabrafenib vs. Dakarbazyna	III/IV, nieusuwalny/ z przerzutami (n=92)	5-letni PFS 12% dabrafenib + dakarbazyna, 3% dakarbazyna	48%	BREAK-3, 2017 [32]

TIL vs. Ipilimumab	IIIC/IV, nieusuwalny/ z przerzutami (n=168)	ORR 49% TIL, 21% ipi, średni czas PFS 7,2 miesiące TIL, 3,1 miesiące ipilimumab	100% TIL 57% ipi	NCT02278887, 2022 [33]
Lifileucel	IIIC/IV, nieusuwalny/ z przerzutami, lekooporny (n=153)	ORR 31,4%, średni czas PFS 4,1 miesiące	97%	C-144-01, 2022 [21]

PFS - przeżycie wolne od progresji (ang. *progression free survival*), OS - przeżycie całkowite (ang. *overall survival*) ORR - odsetek obiektywnych odpowiedzi (ang. *objective response rate*). TIL - limfocyty naciekające guz (ang. *tumor infiltrating lymphocytes*). Ipi - ipilimumab. Nivo - nivolumab. Pem - pembrolizumab.

I.2. Małe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (ang. *extracellular vesicles, EVs*) są cząstkami wydzielanymi przez praktycznie wszystkie komórki organizmów wyższych. Ich zawartość stanowią cząsteczki biologiczne, takie jak kwasy nukleinowe, białka, lipidy czy metabolity (Rycina 2). Wśród EVs wyróżnia się trzy rodzaje pęcherzyków. Pierwszą grupę stanowią egzosomy, nazywane także małymi pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi (*small extracellular vesicles, sEVs*), o średnicy w zakresie od 30 do 200 nanometrów, wywodzące się z endosomów. Do pozostałych rodzajów EVs należą ektosomy (mikropęcherzyki), powstające bezpośrednio z błony komórkowej i ciała apoptotyczne. Małe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe po uwolnieniu są wychwytywane przez komórki, autokrynnie, parakrynnie lub endokrynnie, a przekazany ładunek (*cargo*) wpływa bezpośrednio na ich funkcjonowanie. Z tego powodu sEVs są uznawane za niezbędnych pośredników w komunikacji międzykomórkowej [34-37].



Rycina 2. Skład małego pęcherzyka zewnątrzkomórkowego

I.2.1. Historia pęcherzyków zewnątrzkomórkowych

Pierwsze doniesienie literaturowe opisujące struktury dzisiaj nazywane pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi pochodzi z 1946 roku. W badaniach nad krzepliwością krwi Chargaff i West [38] zaobserwowali osad wywołujący krzepnięcie krwi, uzyskany po ultrawiirowaniu osocza przy prędkości 31 000 x g, przez 150 min. Badacze uznali, że jest to frakcja białek trombolastycznych oraz produktów rozpadu krwinek. W 1967 roku Peter Wolf [39] zauważył podobny osad pochodzący z płytek krwi, nazwany „pyłem płytkowym” (ang. *platelet dust*), obecnie uznawany za ektosomy/mikropęcherzyki. Trzy lata później opublikowano obrazy z mikroskopu elektronowego przedstawiające pęcherzyki wydzielane przez płytki krwi aktywowane trombiną [40]. Neville Crawford w 1971 roku [41] opisał pęcherzyki, nazywane wówczas mikrocząsteczkami (ang. *microparticles*), izolowane z osocza pozbawionego płytek krwi. Cząsteczki te zawierały lipidy, ATP oraz białka kurczliwe. Badania poświęcone płytkom krwi są uznawane za pionierskie doświadczenia, które stanowiły podwaliny prac nad pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi [42, 43].

W 1974 roku praca Nuneza i wsp. [11] rzuciła światło na biogenezę małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, o średnicy 1-10 nm, obecnych w tkankach pobranych z tarczycy nietoperzy. Autorzy opisali ciała wielopęcherzykowe (ang. *multivesicular bodies*, MVB) obecne w pobliżu błony komórkowej, sugerując, że ich fuzja z błoną może skutkować wydzieleniem zawartości MVB. Pięćdziesiąt lat później ten mechanizm, zgodnie z współczesną klasyfikacją, uznalibyśmy za biogenezę małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych/egzosomów.

Klasyfikacja oraz nomenklatura stosowana w badaniach nad pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi stanowi obecnie pole licznych dyskusji. Szczególnie kontrowersyjnym wydaje się termin „egzosomy”, stosowany w odniesieniu do małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych [42, 43, 45]. Nazwa egzosom (ang. *exosome*) po raz pierwszy w literaturze pojawiła się w publikacjach w Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) w latach 1970-1973 [46, 47]. Oznaczała wówczas fragmenty DNA, które przekazywane pomiędzy komórkami wywoływały transformacje u organizmów z gatunków *Drosophila* i *Neurospora*. Opisywane egzosomy nie posiadały dwuwarstwy lipidowej, a zatem nie zostałyby zaklasyfikowane jako pęcherzyki zewnątrzkomórkowe w dzisiejszym rozumieniu. W 1997 roku egzosomem nazwano również kompleks białkowy przetwarzający RNA, odkryty w *Saccharomyces cerevisiae* [48]. Z kolei samo określenie „pęcherzyki zewnątrzkomórkowe” zostało użyte po raz pierwszy w artykule naukowym z 1971 roku dotyczącego biogenezy struktur produkowanych przez algi z gatunku *Ochromonas danica* [49].

Termin egzosomy w odniesieniu do pęcherzyków zewnątrzkomórkowych po raz pierwszy został użyty w publikacji Trams i wsp. w 1981 [50]. Nazwano tak pęcherzyki uwalniane poprzez pączkowanie błony komórkowej na zewnątrz. Jednak w 1983 roku opisano pęcherzyki uwalniane ze światła endosomu (ang. *intraluminal vesicles*, ILVs) w retikulocytach przez zespoły Rose Johnston

i Philipa Stahla [51, 52], a cztery lata później Johnston i wsp. [53] określili je jako egzosomy, co zapoczątkowało powszechne stosowanie tej nazwy. Opublikowane zdjęcia z mikroskopu elektronowego ukazujące uwalnianie pęcherzyków ze światła MVB na skutek fuzji z błoną komórkową stanowiły podstawę do wyróżnienia grupy pęcherzyków o takiej biogenezie [52]. Proces powstawania egzosomów przypominał odwrotną endocytozę polegającą na uwalnianiu wewnętrznej zawartości pęcherzyków na zewnątrz, w przeciwieństwie do internalizowania cząsteczek do wewnątrz, co zainspirowało Rose Johnston do użycia nazwy egzosom. Badaczka przyznała później, że nie sprawdziła czy to określenie zostało wcześniej użyte, co wywołało komplikacje w terminologii [54].

Kolejne lata zaowocowały szeregiem prac dotyczących powstawania i roli pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w różnego rodzaju komórkach, tkankach czy płynach ustrojowych organizmów wyższych. Udowodniono, że oprócz pozbywania się zbędnych substancji z komórki, egzosomy posiadają funkcjonalne właściwości. Jednym z przełomowych doniesień był artykuł ukazujący, że egzosomy z ludzkich i mysich limfocytów B mają zdolność do prezentacji antygenów, a więc aktywnie wpływają na odpowiedź odpornościową [55]. Z czasem poznawano szczegółową strukturę białkową i lipidową sEVs, a także ich liczne funkcje w procesach fizjologicznych i patologicznych. Wykazano, że transportowane kwasy nukleinowe ulegają translacji w komórkach wychwytyjących pęcherzyki [56]. Szczególną uwagę poświęcono sEVs pochodzącym z komórek nowotworowych lub macierzystych oraz ich rolę w komunikacji międzykomórkowej [34, 57].

Wraz ze wzrostem liczby publikacji, patentów i grantów dotyczących tematyki pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, coraz większą uwagę zaczęto zwracać na właściwą nomenklaturę. Do 2018 roku Międzynarodowe Stowarzyszenie Pęcherzyków Zewnątrzkomórkowych (ang. *International Society for Extracellular Vesicles*, ISEV) rekomendowało używanie nazwy „egzosomy” dla pęcherzyków uwalnianych poprzez fuzję MVB z błoną komórkową. Natomiast wszystkie niereplikujące, otoczone dwuwarstwą lipidową cząstki uwalniane przez komórki były uznawane ogólnie za pęcherzyki zewnątrzkomórkowe [58]. Ponieważ niezwykle trudno jest określić mechanizm powstawania wyizolowanych pęcherzyków, z wyjątkiem metod takich jak obrazowanie komórki na żywo, nie zaleca się więc używać nazwy „egzosomy” w opisie badań naukowych. W wytycznych ISEV z 2018 proponowano grupowanie EVs według doświadczalnie potwierdzonych cech, takich jak wielkość (małe EVs (<100-200 nm)/duże EVs (>100-200 nm)), skład biochemiczny (np. CD63+, CD81+ EVs), czy źródło pochodzenia (np. EVs z komórek macierzystych) [58, 59]. W literaturze można spotkać się z uproszczoną klasyfikacją pęcherzyków według ich wielkości, w celu udogodnienia nazewnictwa. Natomiast według najnowszych zaleceń ISEV z 2024 r. nie powinno się używać określenia „małe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe” jako synonimu dla egzosomów, ponieważ obecnie stosowane metody izolacji, takie jak ultrawirowanie, prowadzą do otrzymania różnych populacji EVs o nakładających się zakresach wielkości, na przykład małych ektosomów i egzosomów. Nie istnieje

również konsensus co do górnych i dolnych granic wielkości różnych podtypów pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Dodatkowo należy z dużą dozą ostrożności podchodzić do mierzonej średnicy pęcherzyków ze względu na potencjalny zakres błędu pomiarowego używanego sprzętu [59].

Jednak zakładając, że sEVs stanowią mieszaną populację pęcherzyków bogatą w egzosomy, wydaje się to być najlepszym terminem do stosowania przy obecnym stanie wiedzy. Z tego powodu w dalszej części pracy używane jest określenie „małe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe”, zamiast „egzosomy” zarówno w opisie badań własnych, jak i przeglądu literatury.

1.2.2. Biogeneza małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych

Biogeneza małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych rozpoczyna się w szlaku endosomalnym. W trakcie dojrzewania endosomów ich błona ulega wgłębieniu formując pęcherzyki wewnątrz światła endosomu. Dojrzałe endosomy zawierające ILVs nazywane są ciałkami wielopęcherzykowymi (MVB) lub endosomami wielopęcherzykowymi (ang. *multivesicular endosomes*, MVE). Powstawanie MVB może być zależne, lub niezależne od endosomalnego kompleksu sortującego niezbędnego do transportu (ang. *endosomal sorting complex required for transport*, ESCRT). Istnieje kilka szlaków formowania ILVs w MVB, co przyczynia się do uwalniania różnych subpopulacji sEVs z tej samej komórki. ESCRT składa się z czterech kompleksów (ESCRT-0-III) oraz białek towarzyszących (Tabela 3). Trzy główne funkcje ESCRT to: rozpoznawanie ubikwitynowanych białek, deformacja błony endosomalnej i umożliwienie zamknięcia ładunku (*cargo*) wewnątrz poprzez jej wpuklenie, oraz odcięcie wpuklenia tworząc ILVs (Rycina 3) [60-63].

Mechanizm ESCRT rozpoczyna się od związania substratu kinazy tyrozynowej regulowanej czynnikiem hepatocytów, (ang. *hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate*, HRS), podjednostki ESCRT-0, przez endosomalny fosfatydyloinozytolo-3-fosforan. HRS i cząsteczka adaptera transdukującego sygnał (ang. *signal transducing adaptor molecule*, STAM1/2), wchodzące w skład ESCRT-0, rozpoznają i zatrzymują ubikwitylowane białka w błonie endosomalnej. HRS dodatkowo wiąże się z białkiem TSG101 (kodowanym przez gen podatności na nowotwory 101, ang. *tumor susceptibility gene 101*), wchodzącym w skład ESCRT-I [64]. Drugi koniec kompleksu ESCRT-I wiąże ESCRT-II, co prowadzi do rozpoczęcia pączkowania błony endosomalnej otaczającej klastry ubikwitynowanych białek. ESCRT-II wiąże podjednostkę EAP20 (VSP25) do podjednostki CHMP6 (VSP20) obecnej w kompleksie ESCRT-III. Rekrutacja ESCRT-III skutkuje odcięciem formujących się pęcherzyków do środka przedziału endosomalnego. ESCRT-III rekrutuje enzymy deubikwitynujące ładunek w ILVs. ATPaza VPS4 zapewnia energię niezbędną do oddysocjowania ESCRT-III od błony endosomalnej umożliwiając recykling kompleksu [65-67].

Tabela 3. Białka wchodzące w skład kompleksów ESCRT [61-63].

Nazwa kompleksu	Białka w obrębie kompleksu
ESCRT-0	HRS; STAM1; STAM2
ESCRT-I	TSG101 (VSP23); VSP28; VSP37A, B, C, D; MVB12A, B; UBAP1
ESCRT-II	EAP30 (VSP22); EAP45 (VSP25); EAP45 (VSP36)
ESCRT-III	CHMP2A, B (VPS2A, B); CHMP3 (VPS24); CHMP6 (VPS20); CHMP4A, B, C (SNF7-1,2,3); CHMP1A, B (DID2); CHMP5 (VPS60); CHMP7

Warto dodać, że chociaż kompleksy ESCRT 0-II wiążą ubikwitynowane białka, rola ubikwitynacji w sortowaniu ładunku do pęcherzyków zewnątrzkomórkowych nie jest w pełni poznana. Zaobserwowano bowiem obecność nieubikwitynowanych białek w izolowanych sEVs [60]. Wykazano też, że deubikwitynacja ładunku po włączeniu do MVBs nie jest niezbędna [68].

Białkiem towarzyszącym kompleksowi ESCRT jest Alix, które również wiąże ESCRT-III i promuje pączkowanie oraz odcinanie ILVs wewnątrz endosomu. Alix oddziałuje z syndekaniem poprzez synteninę, co stymuluje powstawanie ILVs. Białko to może także bezpośrednio rekrutować ESCRT-III do późnych endosomów poprzez wiązanie kwasu lizobisfosfatydowego. Alix ułatwia też przyłączenie tetraspanin do błony ILVs [69-71].

Niezależnie od ESCRT, inne białka oraz lipidy uczestniczą w procesie biogenezy pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Jednym z alternatywnych szlaków formowania ILVs jest mechanizm zależny od neutralnej sfingomielinazy 2 (nSMaza 2), która hydrolizuje sfingomielinę do ceramidu. Ceramidy wywołują spontaniczne zakrzywienie błony endosomalnej do wewnątrz MVB powodując powstawanie ILVs [72]. Podobny mechanizm może być również indukowany przez fosfolipazę D2, która aktywuje kwas fosfatydowy [73, 74]. Ceramidy są także metabolizowane do fosforanu-1-sfingozyny, który aktywuje receptory niezbędne do sortowania zawartości ILVs [75]. Odkryto też, że białko RAB31, niezależnie od ESCRT, koordynuje powstawanie ILVs poprzez interakcje z flotillinami [76].

Dodatkowo, ważną rolę w powstawaniu pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pełnią tetraspaniny takie jak CD9, CD63, CD81 i CD82, które ze względu na ich dużą ilość w sEVs stanowią często ich charakterystyczny marker [77]. Wykazano, że tetraspanina CD63 jest niezbędna do formowania ILVs i sortowania ich ładunku w trakcie formowania melanosomów w melanocytach, czy uwalniania sEVs w komórkach dendrytycznych i komórkach linii HEK293 [78-80]. Z kolei dwa inne badania wykazały, że CD63 nie wpływa na uwalnianie sEVs z komórek HEK293, za to niezbędna jest ekspresja CD9 i CD82 [81, 82]. Na podstawie doświadczeń z wyciszeniem ekspresji CD9 uważa się, że

ta tetraspanina jest kluczowa dla wychwytu sEVs przez komórki raka trzustki, piersi, żołądka lub czerniaka [83-85]. Badania prowadzone na komórkach linii HeLa nie potwierdziły jednak, aby CD63 lub CD9 były wymagane do egzo- lub endocytozy sEVs [86]. Co więcej, CD9 był negatywnym regulatorem wychwytu sEVs przez komórki jelita grubego [87]. Z kolei nokaut CD81 u myszy nie wpłynął na liczbę, ani rozmiar sEVs uwalnianych z limfocytów, ale zmienił ich kompozycję białkową [77]. Można więc przypuszczać, że funkcje poszczególnych tetraspanin w uwalnianiu i wychwycie małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych są zmienne, przynajmniej zależnie od typu komórki.

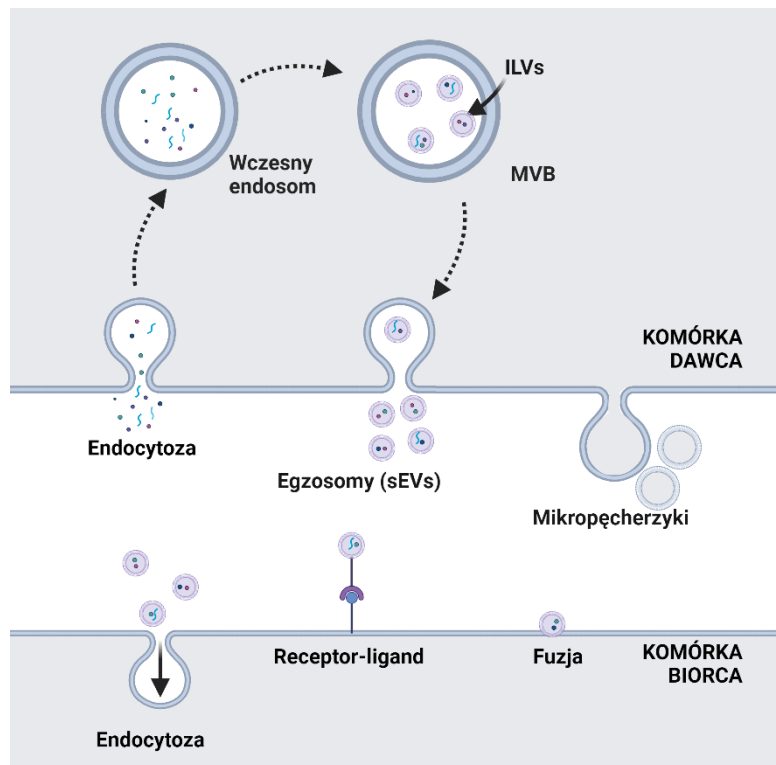
Dodatkowo wykazano, że niektóre onkogeny i geny supresorowe, takie jak receptor naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *epidermal growth factor receptor*, EGFR), p53, czy białka RAS i RAB, są również zaangażowane w regulację biogenezy i wydzielania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z komórek nowotworowych [88, 89].

Kluczowym etapem poprzedzającym uwolnienie sEVs jest transport MVB i fuzja z błoną komórkową. Wymaga to interakcji MVB ze składnikami cytoszkieletu (mikrotubulami oraz aktyną), biologicznymi motorami molekularnymi (dyneiny, kinezy, miozyny), oraz małymi GTPazami (RAB2B, RAB5A, RAB7, RAB9A, RAB11, RAB17, RAB20, RAB27A, RAB27B, RAB35) [90-94]. Białka RAB kontrolują zakotwiczenie MVB w błonie komórkowej. Udział poszczególnych GTPaz zależy od typu komórki. Na przykład RAB7 w komórkach raka szyjki macicy nie reguluje wydzielania sEVs, natomiast w komórkach śródbłonna żyły pępowinowej jest do tego niezbędny [91, 95].

Ostatnim etapem jest sekrecja pęcherzyków na zewnątrz komórki na skutek fuzji MVB z błoną komórkową, kontrolowaną przez białka SNARE i synaptotagminy [96-98]. Wykazano również, że wzrost poziomu wapnia stymuluje uwalnianie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych [90, 99, 100].

1.2.3. Wychwyt małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych

Wywołanie zmian fenotypowych i funkcjonalnych w komórkach organizmów wyższych zachodzi poprzez ich interakcję z pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi. Oddziaływanie może występować na drodze: internalizacji poprzez endocytozę i wsteczną fuzję z błoną endosomu, wiązania sEVs do błony komórkowej, lub rzadziej fuzji sEVs z błoną komórkową i uwolnienia zawartości pęcherzyka bezpośrednio do cytoplazmy komórki biorcy (Rycina 3) [67, 101-103].



Rycina 3. Powstawanie, uwalnianie i wychwyt małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych.

W pierwszej kolejności sEVs są zakotwiczone w błonie komórki biorcy, co wymaga interakcji pomiędzy białkami znajdującymi się na powierzchni pęcherzyków i receptorami w błonie komórkowej, takimi jak tetraspaniny, integryny, lektyny, proteoglikany, siarczan heparanu czy składniki macierzy zewnątrzkomórkowej [87, 104-106]. Następnie może dodatkowo nastąpić internalizacja pęcherzyków na drodze endocytozy zależnej od klatryny lub kaweoliny, endocytozy zależnej od tratw lipidowych, mikropinocytozy czy fagocytozy [101, 107, 108]. Endocytozę mogą ułatwiać aktywne wypustki komórki - filopodia, wzdłuż których sEVs poruszają się w kierunku komórki zanim zostaną internalizowane. Kolejno pęcherzyki są zamykane w endosomach, skąd może następować ich recykling, egzocytoza lub degradacja lizosomalna. Aby ładunek sEVs mógł wywołać funkcjonalny efekt w komórce musi zostać uwolniony do cytoplazmy („ucieczka endosomalna”). Trzecią możliwością jest fuzja sEVs z błoną komórkową i uwolnienie zawartości pęcherzyków bezpośrednio do cytoplazmy [103, 109].

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe mogą być wiązane/wychwytywane przez wszystkie komórki, jednak często obserwuje się ukierunkowany transport poprzez interakcje receptorów powierzchniowych między sEVs, a komórkami docelowymi. Jak pokazują liczne badania, specyficzne receptory na powierzchni sEVs wydzielanych przez komórki nowotworowe determinują organotropizm wywołanych przez nie przerzutów [96, 105, 110, 111]. Przykładem tego zjawiska mogą być badania

prowadzone na myszach, którym przez trzy tygodnie wstrzykiwano sEVs uwalniane przez ludzkie komórki różnych typów nowotworów, o skłonności do wywoływania przerzutów w konkretnych organach (mózgu, płucach lub wątrobie). Obecne w pęcherzykach integryny promowały kolonizację specyficznych tkanek, dzięki czemu po wstrzyknięciu komórek nowotworowych dochodziło do powstania niszy pre-metastatycznej w określonych miejscach. Obecność integryn $\alpha 6\beta 4$ i $\alpha 6\beta 1$ na sEVs determinowała powstawanie przerzutów raka piersi do płuc, a integryny $\alpha V\beta 5$ do wątroby [112]. Z kolei małe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe uwalniane z mysich komórek czerniaka o wysokim poziomie receptora czynnika wzrostu hepatocytów (ang. *hepatocyte growth factor receptor*, HGF)/Met, w większym stopniu niż te o niskim poziomie HGF/Met, promowały powstawanie przerzutów do płuc po podaniu dożylnym myszom [113].

Dystrybucja pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w organizmie jest zależna od źródła z którego się wywodzą, a także drogi podania. Przykładowo, pęcherzyki izolowane z ludzkich komórek nerki wstrzykiwane myszom dootrzewnowo i podskórnice w mniejszym stopniu ulegały akumulacji w wątrobie i śledzionie, a w większym stopniu w trzustce i przewodzie pokarmowym, w porównaniu do sEVs podawanych dożylnie [114]. Istnieje również komunikacja autokrynną. Zauważono, że sEVs uwalniane przez komórki czerniaka u myszy były ponownie wychwytywane przez nie same zwiększając wzrost guza [115, 116].

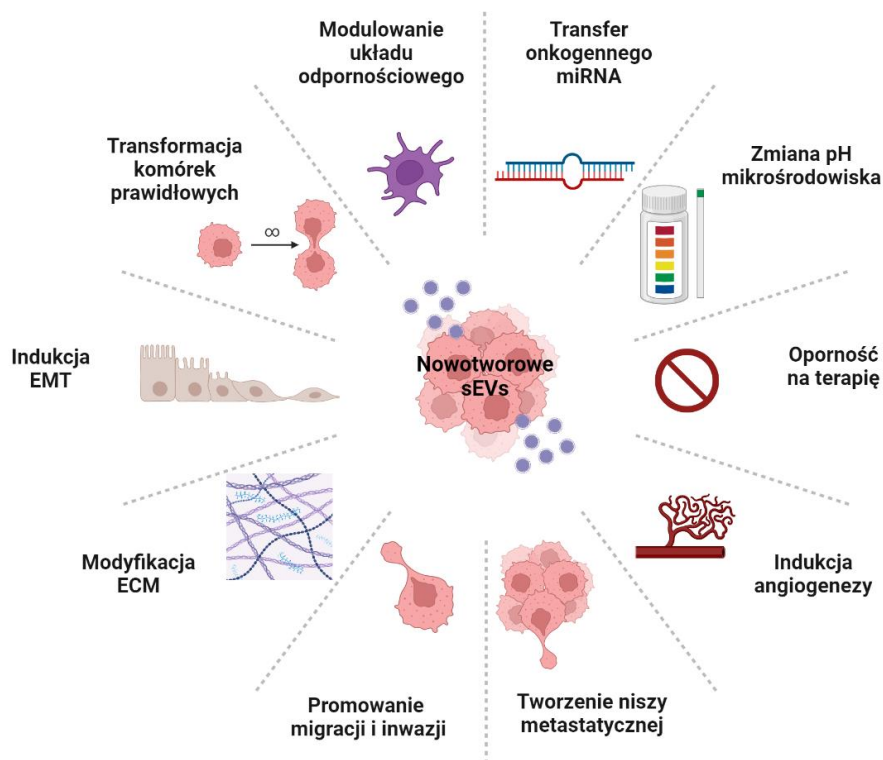
1.2.4. Funkcje małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych

Pierwotnie odkrytą funkcją małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych było pozbywanie się zbędnych substancji z komórki, na przykład receptorów transferyny podczas dojrzewania retikulocytów do erytrocytów [51]. Proces ten zapewnia stabilność środowiska cytoplazmatycznego i zapobiega wykonywaniu funkcji przez niepożądane cząsteczki. W ten sposób komórki pozbywają się błędnie sfałdowanych, lub niepotrzebnych białek, czy nieprawidłowego RNA. Wydzielanie kwasów nukleinowych z komórki poprzez sEVs jest też sposobem regulacji ekspresji genów, aby zapobiec powstawaniu nadmiernej ilości białek. Natomiast sekrecja sEVs zawierających miRNA jest sposobem regulacji stosunku miRNA do mRNA w komórce [117]. Małe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe pomagają także w utrzymaniu homeostazy poprzez redukcję lub usuwanie sygnałów, które zostały już wykryte przez komórkę, a ich nadmiar mógłby być zbędny, lub szkodliwy [118].

Najpowszechniej badaną funkcją małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych jest ich pośredniczenie w komunikacji międzykomórkowej poprzez przekazywanie informacji w postaci cząsteczek biologicznych. Upakowanie kwasów nukleinowych, lipidów i białek w sEVs chroni je przed degradacją i rozproszeniem w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, a ułatwia ich transport na duże odległości, np. w krwioobiegu. W zależności od przenoszonego ładunku, sEVs są zaangażowane w różne procesy fizjologiczne, takie jak przekazywanie sygnałów, wzrost i różnicowanie komórek,

regulacja metaboliczna, embrio- i organogeneza, regeneracja tkanek, czy modulacja układu odpornościowego. W małych pęcherzykach zewnątrzkomórkowych pochodzących z różnych typów komórek zidentyfikowano około 10 000 białek, 1116 lipidów, 3400 cząsteczek mRNA i 2800 cząsteczek miRNA, co wskazuje na ich dużą heterogenność i potencjalną różnorodność funkcjonalną (exocarta.org, stan na 01.09.24) [119, 120]. Na skutek transferu kwasów nukleinowych, np. miRNA może dojść do zmiany ekspresji genów, czy translacji egzogenego mRNA [56, 121-123]. Małe EVs przenoszą również białka, takie jak czynniki wzrostu, cytokiny, integryny czy tetraspaniny [88].

Małe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe są regulatorami fizjologicznej homeostazy, jednak uczestniczą także w procesach patologicznych, m.in. chorobach neurodegeneracyjnych, chorobach układu krążenia, infekcjach, czy nowotworach. W przypadku nowotworów mechanizmy działania sEVs obejmują wszystkie stadia onkogenezy i jego progresji od proliferacji i migracji komórek, angiogenezy, inwazji, po przerzutowanie. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe są przekąźnikami informacji między komórkami nowotworowymi, komórkami mikrośrodowiska guza i komórkami prawidłowymi. Uczestniczą w ucieczce immunologicznej, angiogenezie, powstawaniu niszy premetastatycznej oraz przyczyniają się do rozwoju lekooporności (Rycina 4) [34]. Dane literaturowe wskazują, że komórki nowotworowe uwalniają większe ilości sEVs, niż komórki prawidłowe, a ich kompozycja jest odmienna. Dodatkowo pęcherzyki nowotworowe są często większe niż sEVs z komórek prawidłowych [124].



Rycina 4. Schemat przedstawiający procesy, w których uczestniczą nowotworowe małe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe.

Małe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe przyczyniają się do modyfikacji macierzy zewnątrzkomórkowej w mikrośrodowisku guza, wiążą się do jej składników przez receptory adhezyjne i uwalniają proteiny, w tym metaloproteinazy macierzy (ang. *matrix metalloproteinases*, MMPs) i katepsyny, powodując degradację białek takich jak kolagen, laminina czy fibronektyna, co ułatwia migrację komórek nowotworowych [125, 126]. Ponadto, sEVs wspierają powstawanie naczyń krwionośnych na drodze transferu związków takich jak czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (ang. *vascular endothelial growth factor*, VEGF), MMP, czy proangiogennych mRNA i miRNA do komórek śródbłonna [127, 128].

Przykładami, które dobrze ilustrują udział sEVs w migracji i inwazji komórek nowotworowych oraz w procesie angiogenezy są badania na komórkach czerniaka. Wykazano, że sEVs uwalniane z komórek czerniaka migrowały do węzłów wartowniczych, następnie rekrutowały i wiązały tam komórki czerniaka poprzez zmianę ekspresji genów związanych z migracją (m.in. stabiliny-1, integryny α) i modyfikacją macierzy zewnątrzkomórkowej (m.in. lamininy i kolagenu). Na skutek wywołanej zwiększonej ekspresji proangiogennych genów, takich jak VEGF czy TNF- α , w węzłach chłonnych, sEVs promowały powstawanie przerzutów czerniaka [129]. Inne badania pokazały, że białko sygnałowe WNT5A (należące do szlaku sygnalizacyjnego Wnt) indukowało zależne od jonów wapnia uwalnianie małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych zawierających immunomodulujące i proangiogenne czynniki, takie jak: interleukina 6 (IL-6), VEGF i MMP2 z komórek czerniaka [130]. Z kolei obecność receptora dla urokinazowego aktywatora plazminogenu (ang. *urokinase-type plasminogen activator receptor*, uPAR) w sEVs z komórek czerniaka promowało angiogenezę ze względu na zwiększanie poziomu VE-kadheryny, EGFR i uPAR i aktywację ERK1/2 w komórkach śródbłonna naczyniowego *in vitro* i *in vivo* [131].

Kolejnym pro-nowotworowym działaniem sEVs jest ich udział w tworzeniu niszy premetastatycznej. Wykazano, że komórki czerniaka dające przerzuty do mózgu i płuc w mysim modelu wydzielały pęcherzyki wychwytywane przez fibroblasty płuc oraz astrocyty. Pęcherzyki te były źródłem mRNA zwiększającego ekspresję cytokin i chemokin prozapalnych w fibroblastach i astrocytach, co przyczyniło się do tworzenia środowiska ułatwiającego powstawanie przerzutów w płucach i mózgu [132].

Małe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe wydzielane przez komórki nowotworowe modulują mikrośrodowisko guza oraz funkcjonowanie komórek prawidłowych na skutek transferu czynników onkogennych. Przykładowo, sEVs z komórek czerniaka zawierały onkogenny Met, który promował powstawanie przerzutów z guzów pierwotnych u myszy na skutek zmiany fenotypu komórek progenitorowych ze szpiku kostnego. Komórki te nabywały cech, które sprzyjały powstawaniu nowych naczyń krwionośnych oraz przerzutów [133]. Wykazano również, że małe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe z komórek czerniaka promują zmianę fenotypu prawidłowych melanocytów.

Transfer miRNA let-7i i miR-106b-5p w pęcherzykach aktywował szlak sygnałowy MAPK/ERK, co skutkowało zmianą funkcjonowania melanocytów, przypominającą przejście epitelialno-mezenchymalne [134, 135]. Z kolei pęcherzykowy transport długiego niekodującego RNA Gm26809 z komórek czerniaka do fibroblastów wywołał ich transformację do fibroblastów związanych z nowotworem i zwiększył ich migrację [136]. Inne badania pokazały, że transfer miR-21 w pęcherzykach uwalnianych przez komórki czerniaka zwiększył poziom MMP2 i MMP9 w fibroblastach oraz zmniejszył poziom inhibitora metaloproteinaz TIMP3, co skutkowało zwiększoną inwazyjnością komórek [137]. Istotną funkcją sEVs w progresji nowotworu jest także przekazywanie sygnałów promujących migrację i przerzutowanie z bardziej do mniej inwazyjnych komórek nowotworowych. Dodanie sEVs uwalnianych z komórek czerniaka wywołującego przerzuty do hodowli komórek mniej agresywnych powodowało nasilenie ich migracji [138].

Jak pokazują liczne badania, nowotworowe małe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe uczestniczą w immunosupresji miejscowo w mikrośrodowisku guza oraz, dzięki obecności w krwioobieg i płynach ustrojowych, oddziałują na krążące we krwi komórki odpornościowe. Nowotworowe sEVs pełnią immunosupresyjną rolę bezpośrednio (dostarczając sygnał/ładunek hamujący przeciwnowotworową aktywność komórek) lub pośrednio (poprzez zmianę różnicowania się komórek, które następnie hamują funkcjonowanie innych komórek). Liczne badania potwierdziły udział sEVs w hamowaniu proliferacji, aktywacji i cytotoksyczności limfocytów T efektorowych oraz komórek NK (ang. *Natural Killer*). Ograniczają także dojrzewanie i różnicowanie komórek dendrytycznych. Z drugiej strony, promują różnicowanie i ekspansję limfocytów T regulatorowych i komórek supresorowych pochodzenia mieloidalnego [139].

Przykładem immunosupresyjnego działania nowotworowych sEVs są obserwacje dokonane na komórkach czerniaka, które wydzielały sEVs zawierające PD-L1 i IL-10, co prowadziło do zahamowania odpowiedzi odpornościowej limfocytów T CD8⁺ [140, 141]. Inne badania pokazały, że sEVs tego nowotworu transportowały cząsteczki głównego kompleksu zgodności tkankowej klasy I (ang. *major histocompatibility complex class I*, MHC klasy I) do komórek prezentujących antygen, jednocześnie zmniejszając poziom cząsteczek CD86 i CD40 (stymulujących różnicowanie i proliferację limfocytów T), a zwiększając produkcję IL-6 w komórkach dendrytycznych. Dodatkowo transfer immunosupresyjnego TGF- β hamował proliferację limfocytów T. Połączenie transportu kompleksów MHC I z cytokinami immunosupresyjnymi skutkowało nabyciem antygenowo-specyficznej tolerancji w komórkach czerniaka [142]. Badania proteomiczne małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z osocza pacjentów z czerniakiem oraz zdrowych dawców pokazały, że zwiększony poziom immunosupresyjnych białek był skorelowany z występowaniem nowotworu [143].

Na sekrecję pęcherzyków przez komórki mikrośrodowiska guza istotny wpływ mają panujące tam niekorzystne warunki, a przede wszystkim niskie pH i niskie stężenie tlenu. Wykazano, że

niedotlenienie (hipoksja) ma kluczowe znaczenie w sortowaniu ładunku i stymulacji uwalniania sEVs z komórek nowotworowych i nienowotworowych, poprzez m.in. blokowanie degradacji lizosomalnej MVB i promowanie fuzji MVB z błoną komórkową. Dodatkowo, małe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe wydzielane przez komórki mikrośrodowiska guza w warunkach o ograniczonym dostępie tlenu mogą przyczynić się do angiogenezy, lekooporności, czy nabrania cech komórek macierzystych przez komórki nowotworowe (ang. *stemness*) [144-147]. W przypadku czerniaka wykazano, że poziom miRNA w sEVs uwalnianych z komórek będących w hipoksji znacząco różnił się, w porównaniu do komórek w normoksji. Zaobserwowano między innymi ponad dwukrotnie więcej onkogenego miR-494, który promuje wzrost guza i przerzutowanie *in vivo*, a jego zwiększony poziom w sEVs z surowicy pacjentów jest skorelowany z występowaniem choroby [148, 149].

Kwasowe mikrośrodowisko guza jest również istotnym elementem pobudzającym komórki do uwalniania sEVs i regulującym ich zawartość. Badania potwierdzają, że komórki czerniaka w niższym pH wydzielają więcej pęcherzyków zewnątrzkomórkowych [150]. Opisano również, że sEVs z komórek czerniaka zakwaszały środowisko zewnątrzkomórkowe wywołując zwiększoną glikolizę tlenową i zmniejszając fosforylację oksydacyjną w prawidłowych fibroblastach skórnych poprzez transfer miR-155 i miR-210, co sprzyjało powstawaniu niszy pre-metastatycznych [151]. Ponadto oporność na cisplatynę w ludzkich komórkach czerniaka *in vitro* oraz ksenograftach u myszy była spowodowana spadkiem pH oraz wydalaniem chemioterapeutyku w formie sEVs [152]. Co ciekawe, w komórkach czerniaka w niskim pH oprócz wzrostu ilości wydzielanych pęcherzyków występował również ich nasilony wychwyty na drodze fuzji membranowej, co mogło być spowodowane zwiększoną sztywnością oraz zmianą składu lipidowego sEVs. Dodatkowo, pęcherzyki te transferowały kaweolinę-1, która uznawana jest za czynnik zaangażowany w progresję czerniaka [153].

1.2.5. Zastosowanie małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w diagnostyce i terapii

Małe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe są obecne w krwi, osoczu, moczu, płynach: mózgowo-rdzeniowym, otrzewnowym i owodniowym, ślinie, spermie, żółci, łzach i mleku. Z tego powodu mogą być biomarkerami stosowanymi do wczesnego wykrywania chorób, ich diagnozy oraz stanowić czynnik prognostyczny pozwalający na oszacowanie odpowiedzi terapeutycznej, monitorowania efektów leczenia i wystąpienia skutków ubocznych [154, 155]. Badania proteomiczne sEVs pochodzących z osocza pacjentów z czerniakiem pozwoliło na wyróżnienie licznych białek, których poziom był zwiększony lub zmniejszony w porównaniu do sEVs z osocza zdrowych dawców. Ponadto, profil białkowy różnił się pomiędzy próbkami od pacjentów z czerniakiem niewykrywalnym po leczeniu, oraz tych z postępującą chorobą. Do białek, których podwyższony poziom w sEVs uznawany jest za czynnik prognostyczny należą Alix, S100B, MIA, TGF- β 1, TYRP2, VLA4, HSP70, HSP90, MET, CD63 czy kaweolina-1 [133, 156-158].

Ze względu na rolę sEVs w progresji nowotworu, zahamowanie ich wydzielania stanowi interesującą strategię leczenia. Mezoporowate nanocząstki krzemionkowe stosowano w celu usunięcia sEVs wydzielanych przez komórki niedrobnokomórkowego raka płuc w mysim modelu. Dodatkowo naładowane nanocząstki wiązały się specyficznie do EGFR, obecnego na powierzchni sEVs w krwioobiegu, a następnie były internalizowane przez komórki wątroby oraz wydzielane do układu pokarmowego. Znacząco zahamowało to powstawanie przerzutów *in vivo* [159].

Znane są też substancje chemiczne, które są inhibitorami wydzielania małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Do najczęściej stosowanych należą GW4869 i cambinol które hamują neutralną sfingomielinazę blokując niezależne od ESCRT, ceramido-zależne pączkowanie wewnątrz ciała wielopęcherzykowego [115, 160, 161]. Manumycyna A i tipifarnib hamują działanie farnezyltransferaz, zapobiegając aktywacji Ras, co blokuje biogenezę sEVs zależną od ESCRT [162, 163]. Nexinhib 20, inhibitor egzocytozy neutrofilowej hamował interakcję pomiędzy białkiem RAB27A, a jego białkiem efektorowym, egzofiliną-7, co osłabiło wydzielanie ziarnistości neutrofilii w mysim modelu [164]. Liczne badania roli małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych *in vitro* i *in vivo* odbywały się właśnie poprzez stosowanie inhibitorów i obserwację efektów zahamowania biogenezy i uwalniania sEVs. Stosowanie tipifarnibu w połączeniu z chemioterapeutyką- tamoksyfenem zahamowało proliferację komórek raka piersi i wzrost guza u myszy [165]. Podanie GW4869 zwiększyło skuteczność leczenia inhibitorem anty-PD-L1 w mysim modelu raka piersi [166]. Co ciekawe, GW4869 nie wpłynął na ilość uwalnianych pęcherzyków w badaniach na liniach komórkowych raka prostaty, co sugeruje, że w zależności od typu komórek inne szlaki są zaangażowane w wydzielanie sEVs [167, 168].

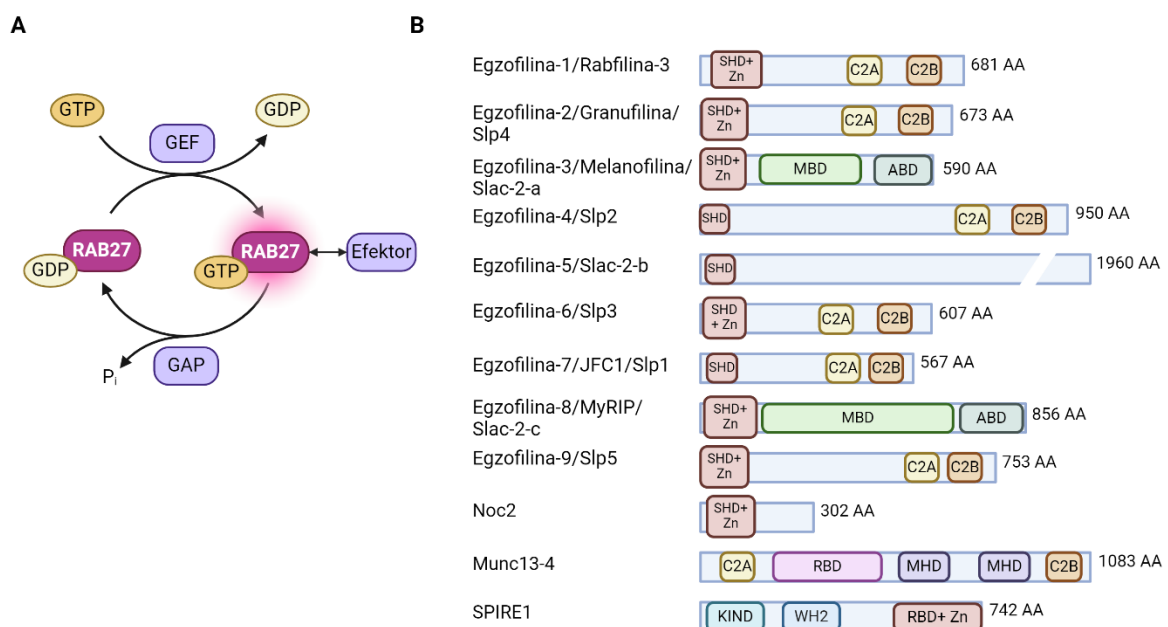
W latach 2000-2020 stosowanie sEVs było podstawą ponad 500 amerykańskich patentów [169]. Zarejestrowano do tej pory prawie 600 badań klinicznych (clinicaltrials.gov). Większość z nich bazuje na diagnostycznym zastosowaniu sEVs, pozostałe zaś w kontekście terapeutycznym. Małe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe są badane w kierunku leczenia m.in. nowotworów, COVID-19, chorób skóry, układu pokarmowego, mięśniowo-szkieletowego czy okulistyce [170]. Obecnie na rynku amerykańskim komercyjnie dostępne są testy pozwalające na diagnozę raka prostaty i płuc poprzez badanie sEVs odpowiednio z moczu i osoczu [171, 172].

I.3. RAB27

Białka RAB po raz pierwszy w komórkach ssaków zidentyfikowano w mózgu szczura, stąd ich nazwa - ang. „*Ras-related in brain*” (białka w mózgu związane z RAS). Są to małe GTPazy, stanowiące największą podgrupę nadrodziny białek RAS, u ssaków kodowane przez około 70 genów. Białka te zazwyczaj cechują się niską masą cząsteczkową, około 20-30 kDa, jednak istnieją także większe GTPazy z tej rodziny, o masie w zakresie 70-150 kDa. Wspólną funkcją białek RAB jest regulacja

wewnątrzkomórkowego transportu pęcherzykowego w wielu typach komórek. RAB27 budzi szczególne zainteresowanie, ze względu na jego udział w licznych procesach fizjologicznych i atologicznych w organizmie człowieka [173-175].

Wyróżnia się dwie izoformy RAB27- RAB27A oraz RAB27B, kodowane przez różne geny, jednak o identyczności aminokwasów w 71%. Aktywność białek RAB, podobnie jak innych GTPaz, jest regulowana przez przełączanie pomiędzy stanem aktywnym, związanym z guanozyno-5'-difosforanem (ang. *guanosine 5-diphosphate*, GDP), oraz nieaktywnym, związanym z guanozyno-5'-trifosforanem (ang. *guanosine 5-triphosphate*, GTP). Zmianę tą koordynują białka aktywujące GTPazę (ang. *GTPase-activating protein*, GAP) oraz czynniki wymiany nukleotydów guaninowych (ang. *guanine nucleotide exchange factor*, GEF). RAB27A i RAB27B w formie aktywnej, związanej z GTP, oddziałują z wieloma białkami efektorowymi w celu przeprowadzania procesów biologicznych (Rycina 5) [176, 177].



Rycina 5. (A) Schemat aktywacji/inaktywacji RAB27. (B) Białka efektorowe oddziałujące z RAB27 związanym z GTP. SHD - domena homologiczna Slp, wiążąca RAB27, z/bez domeną palca cynkowego. RBD - domena wiążąca RAB27, inna od SHD. C2A/B - domeny wiążące fosfolipidy. MBD - domena wiążąca miozynę. ABD - domena wiążąca aktynę. MHD - domena homologiczna Munc. KIND - domena wiążąca forminę. WH2 - klaster domen wiążących G-aktynę.

Do tej pory u ssaków zidentyfikowano dwanaście cząsteczek uznawanych za białka efektorowe związanych z GTP RAB27. Jedynym znanym efekтором nieaktywnego, związanego z GDP, RAB27 jest koronina-3. Interakcje RAB27 z efektorami różnią się w zależności od typu komórki i pełnionej funkcji. Niekiedy jedna izoforma RAB27 kompensuje nieobecność drugiej, prawdopodobnie poprzez zdolność

wiązania tych samych białek efektorowych. Jednak obie izoformy mogą posiadać różne role, czasem nawet w jednej komórce. Współistnienie kilku białek efektorowych w tej samej komórce może skutkować wiązaniem się RAB27 do kilku z nich równolegle, lub sekwencyjnie [176-178].

1.3.1. Funkcje RAB27

RAB27A i RAB27B uczestniczą w licznych procesach biologicznych zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych. Transport błonowy pęcherzyków wydzielniczych jest procesem umożliwiającym uwalnianie cząsteczek z komórek do środowiska zewnątrzkomórkowego. Egzocytoza tych małych organelli w różnych typach komórek podlega precyzyjnej regulacji przez RAB27 i jego białka efektorowe [179]. Jedną z najbardziej znanych funkcji RAB27A jest transport organelli pigmentowych w komórkach produkujących melanicę. Obecność tej GTPazy jest niezbędna do transportowania melanosomów do wypustek dendrytycznych melanocytów. Proces ten jest regulowany przez trójczłonowy kompleks, składający się z RAB27A, białka efektorowego - melanoofiliny (Slac-2-a) i białka motorycznego - miozyny Va. N-końcowa domena melanoofiliny wiąże zakotwiczony w błonie melanosomu RAB27A, z kolei C-końcowa domena łączy go z miozyną Va. Dodatkowo RAB27A rekrutuje do melanosomu nukleatory aktyny SPIRE1/2, które oddziałując z forminą-1 powodują tworzenie sieci z włókien aktyny. Domena motoryczna miozyny Va rozprasza melanosomy wzdłuż ścieżek aktynowych, od błony melanosomów do obrzeży komórki [180-182]. Mutacje *RAB27A*, genów kodujących miozynę V, lub melanoofilinę odpowiadają za powstanie syndromu Griscelli, choroby dziedzicznej autosomalnie recesywnie. Z powodu zaburzonego transportu melanosomów w melanocytach chorobę cechuje występujący w skórze i włosach albinizm. Typ 2 syndromu Griscelli, wywołany mutacją *RAB27A*, jest chorobą śmiertelną, objawiającą się wrodzonym niedoborem odporności, limfocytopenią, hemofagocytową i zaburzeniami neurologicznymi [183].

Do innych procesów kontrolowanych przez RAB27 należą uwalnianie neurotransmiterów poprzez egzocytozę pęcherzyków synaptycznych oraz egzocytoza ziarnistości z neutrofilów, komórek tucznych, komórek NK, płytek krwi i limfocytów T [184-189]. Jednak najczęściej badaną funkcją RAB27 jest regulacja uwalniania małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Ostrowski i wsp. [91] po raz pierwszy opisali, że w komórkach raka szyjki macicy linii HeLa RAB27A i RAB27B pełnią oddzielne, jednak kluczowe funkcje w sekrecji sEVs poprzez oddziaływanie z efektorami, odpowiednio egzofiliną-2 (Slp4) i egzofiliną-5 (Slac-2-b). Autorzy publikacji wnioskują, że RAB27A kontroluje dokowanie i fuzję ciałek wielopęcherzykowych z błoną komórkową. Natomiast RAB27B prawdopodobnie kieruje MVB do zewnątrz komórki poprzez wiązanie go do białka motorycznego.

Udział RAB27A i/lub RAB27B w sekrecji sEVs potwierdzono poprzez wyciszenie ich ekspresji w licznych badaniach, na wielu typach komórek prawidłowych oraz nowotworowych, co opisano w tabeli 4. Należy jednak zauważyć, że efekt ten nie był obecny we wszystkich rodzajach komórek,

m.in. w czerniaku, raka nerki czy komórkach embrionalnych nerki [81, 190, 191]. Co ciekawe, istnieją badania pokazujące, że wyciszenie ekspresji RAB27B spowodowało odwrotny skutek - zwiększoną liczbę sEVs uwalnianych przez komórki raka prostaty oraz raka wątroby [192, 193].

Tabela 4. Przegląd badań wpływu wyciszenia RAB27A i/lub RAB27B na uwalnianie sEVs.

RAB	Metoda wyciszenia	Model badawczy	Wpływ na sEVs	Metoda oceny ilości sEVs	Źródła
RAB27A	Knockdown (shRNA)	Komórki czerniaka B16-F10, SkMel28	Spadek liczby sEVs o ~50%	Stężenie białka	[133]
RAB27A	Knockdown (shRNA)	Komórki czerniaka WM35, A375	Spadek poziomu CD63, CD9, TSG101 o ~60-90%	WB	[149]
RAB27A	Knockdown (shRNA)	Komórki raka szyjki macicy HeLa	Spadek liczby sEVs o ~50%	Stężenie białka, FACS, WB	[91]
RAB27B					
RAB27A	Nokaut (CRISPR)	Komórki raka jajnika OVCAR8	Spadek liczby sEVs o ~50%	NTA	[194]
RAB27B			Prawie całkowity brak sEVs		
RAB27A	Nokaut (CRISPR)	Komórki raka prostaty PC3	Prawie całkowity brak sEVs CD63+	NTA, WT	[167]
RAB27A	Nokaut (CRISPR)	Komórki raka wątroby SMMC7721, PLC/PRF/5	Spadek poziomu CD63, TSG101 o ~50%	WB	[195]
RAB27A	Knockdown (siRNA)	Komórki raka wątroby MHCC97H	Spadek poziomu CD63, TSG101, Alix o ~50%	Stężenie białka, WB	[196]
RAB27A	Nokaut (CRISPR)	Komórki glejaka U87 MG	Prawie całkowity brak sEVs (NTA), spadek poziomu CD63 o ~50%	NTA, WB	[197]
RAB27A	Nokaut (CRISPR)	Komórki raka piersi MDA-MB-231	Spadek liczby sEVs o ~2/3	NTA	[198]
RAB27A	Knockdown (rybozym)	Komórki raka prostaty Du145 cells	Prawie całkowity brak sEVs (TSG101, Alix)	Stężenie białka, WB	[199]
RAB27A	Knockdown (siRNA)	Komórki raka jelita grubego SW480, SW620, HCT116	Spadek poziomu CD9, CD63 o ~50%	WB	[200]
RAB27A	Knockdown (siRNA)	Komórki śródbłonka żyły pępowinowej HUVEC-TIE2-L914F	Spadek liczby sEVs o ~2/3	NTA	[201]
RAB27A	Knockdown (siRNA)	Mysie komórki nabłonka kanalików nerkowych	Prawie całkowity brak sEVs (Alix, CD63, CD81)	WB, test kolorymetryczny EXOCET	[202]
RAB27A	Nokaut (CRISPR)	Mysz KO - progenitorowe komórki śródbłonka	Spadek liczby sEVs o ~50% (NTA), brak różnic CD63, CD9	NTA, WB	[203]
RAB27A	Nokaut (CRISPR)	Mysz KO z niedokrwieniem	Spadek liczby sEVs o ~2/3	NTA, WB	[204]

		mózgu - tkanka mózgowa			
RAB27A	Knockdown (shRNA)	Komórki mysie raka sutka TS/A, 4T1	Spadek liczby sEVs o ~50%	Stężenie białka, WB	[205]
RAB27B	Knockdown (shRNA)		Brak zmiany		
RAB27A/B	Nokaut (CRISPR)	Mysz KO - komórki Treg	Prawie całkowity brak sEVs CD63+	ELISA, FACS	[206]
RAB27A/B	Nokaut (CRISPR)	Mysz KO - komórki szpiku kostnego	Spadek liczby sEVs o ~50%	Test kolorymetryczny EXOCET	[207]
RAB27A	Knockdown (shRNA)	Komórki czerniaka WM164, WM983C	Brak zmiany liczby sEVs, spadek poziomu CD9, wzrost poziomu CD63, TSG101	Stężenie białka, NanoSight, WB	[191]
	Nokaut (CRISPR)	Komórki czerniaka B16-F10			
RAB27B	Knockdown (siRNA)	Komórki raka nerki A498	Brak zmian poziomu CD63	ELISA	[190]
RAB27A	Nokaut (CRISPR)	Komórki embrionalne nerki HEK293	Brak zmian liczby sEVs i poziomu CD63, CD9, CD81	NTA, WB	[81]
RAB27A	Knockdown (siRNA)	Komórki raka prostaty PC3 cells	Brak zmian	NTA	[192]
RAB27B			Wzrost liczby sEVs o ~25%		
RAB27B	Knockdown (shRNA)	Komórki raka wątroby Bel7402	Wzrost liczby sEVs o ~25%	NTA	[193]

Badania prowadzono na komórkach ludzkich, jeśli nie podano inaczej. FACS - cytometria przepływowa (ang. *Fluorescence Activated Cell Sorting*); NTA - analiza śledzenia nanocząstek (ang. *Nanoparticle Tracking Analysis*); WB - Western blotting

Zaburzenia funkcji RAB27 związane są z występowaniem licznych schorzeń, takich jak choroby neurodegeneracyjne, cukrzyca, mukowiscydoza, zespół suchego oka, przewlekłe stany zapalne, astma, alergia, czy nowotwory [176]. Jak pokazują liczne badania, RAB27 uczestniczy w progresji nowotworów na wielu poziomach. Doświadczenia na komórkach lub modelach zwierzęcych różnych typów nowotworów wykazały, że wyciszenie *RAB27A* i/lub *RAB27B* skutkuje ograniczeniem proliferacji, migracji i inwazji komórek nowotworowych a także hamuje wzrost guza, powstawanie przerzutów, chemiooporność i immunosupresję [208]. Jest to spowodowane między innymi zmniejszeniem sekrecji sEVs, które obserwowano w komórkach czerniaka [133] i innych nowotworów złośliwych: jajnika [194], mózgu [209], pęcherza [210], piersi [205], płuc [211], prostaty [167], szyjki macicy [91], wątroby [195], czy żołądka [212].

Pierwsze dane wskazujące na udział RAB27 w biologii nowotworów zostały przedstawione przez Bobrie i wsp. [205] w 2012 roku. Mysie, inwazyjne (linia 4T1) i nieinwazyjne (linia T/S) komórki raka sutka wydzielają o połowę mniej sEVs na skutek knockdownu *RAB27A*, podczas gdy wyciszenie *RAB27B* nie wywołało takiego efektu. Gdy komórki linii przerzutowej 4T1 z knockdownem *RAB27A*

wstrzyknięto podskórnie myszom nastąpił wolniejszy wzrost guza oraz mniejsza ilość przerzutów do płuc, niż przy podaniu komórek niezmodyfikowanych. Co ciekawe, knockdown *RAB27A* w komórkach linii TS/A nie spowalniał rozwoju nowotworu. Dodatkowo, wyciszenie ekspresji *RAB27A* w obu liniach skutkowało zmniejszeniem wydzielania cząsteczek rozpuszczalnych, m.in. metaloproteinaz, czynnika wzrostu granulocytów i chemokin MCP-1 i RANTES. Wyniki te wskazują na udział *RAB27A* w promowaniu progresji raka sutka w dwojaki sposób, poprzez stymulowanie uwalniania zarówno małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, jak i substancji rozpuszczalnych.

Rola *RAB27* w czerniaku pozostaje niejednoznaczna. Knockdown *RAB27A* w mysich (B16-F10) i ludzkich (SkMel28) komórkach czerniaka zmniejszył o połowę liczbę wydzielanych sEVs, a także zahamował sekrecję osteopontyny, płytkopochodnego czynnika wzrostu i łożyskowego czynnika wzrostu. Ponadto, powstałe po wstrzyknięciu tych komórek myszom guzy oraz przerzuty do płuc były mniejsze, niż po podaniu komórek czerniaka typu dzikiego [133]. Wyciszenie ekspresji *RAB27A* w ludzkich komórkach czerniaka linii A375 i WM35 również ograniczyło uwalnianie sEVs, co skutkowało zahamowaniem pęcherzykowego transportu miR-494 i zmniejszyło migrację komórek oraz wywołało apoptozę *in vitro*. Dodatkowo, po iniekcji komórek A375 z wyciszeniem *RAB27A* u myszy obserwowano mniejszy wzrost guza i ograniczenie powstawanie przerzutów do płuc, w porównaniu do ksenograftów z komórek niemodyfikowanych [149]. Przeciwnie wnioski wysnuli Guo i wsp. [191] na podstawie badań nad ludzkimi (WM164, WM983C) i mysimi (B16-F10) komórkami czerniaka. Badacze nie zaobserwowali zmniejszenia liczby uwalnianych sEVs pod wpływem wyciszenia ekspresji *RAB27A*. Mimo to nastąpiło ograniczenie inwazji komórek *in vitro*, a także ograniczenie wzrostu guza i przerzutów do węzłów chłonnych u myszy. Wyniki te pozostawiają więc wątpliwości, co do wpływu *RAB27A* na sekrecję sEVs w komórkach czerniaka.

Ze względu na swoją rolę w progresji nowotworów, *RAB27A* oraz *RAB27B* stanowią czynnik prognostyczny, skorelowany z występowaniem choroby lub jej charakterystycznymi cechami kliniczno-patologicznymi. Wzrost poziomu *RAB27A* lub *RAB27B* wykryto w tkankach wielu typów nowotworów, w porównaniu do otaczających tkanek prawidłowych i był on skorelowany z występowaniem przerzutów, bardziej zaawansowanym stadium nowotworu i gorszymi rokowaniami pacjentów. Przykłady takich badań przedstawiono w tabeli 5.

Tabela 5. Przykłady badań wskazujących na związek zwiększonego poziomu RAB27 w tkance nowotworowej i progresji nowotworu.

Typ nowotworu	RAB	Korelacja ze wzrostem poziomu RAB27	Źródła
Czerniak	RAB27A	Obecność nowotworu, zaawansowane stadium, niższa przeżywalność	[191]
Rak pęcherza	RAB27A, RAB27B	Zaawansowane stadium, inwazja mięśni, niższa przeżywalność	[210, 213]
Rak piersi	RAB27B	Obecność nowotworu	[214]
	RAB27B	Przerzuty do węzłów chłonnych, zaawansowane stadium, niższa przeżywalność	[215, 216]
Rak jelita grubego	RAB27B	Przerzuty do węzłów chłonnych i odległe, zaawansowane stadium, niższa przeżywalność	[217]
Rak przełyku	RAB27A, RAB27B	Zaawansowane stadium, niższa przeżywalność	[218]
Rak żołądka	RAB27B	Zaawansowane stadium, przerzuty do węzłów chłonnych, niższa przeżywalność	[212]
Białaczką	RAB27B	Niższa przeżywalność	[219]
Rak wątroby	RAB27A, RAB27B	Wystąpienie choroby, zaawansowane stadium, niższa przeżywalność	[220, 221]
Rak płuc	RAB27A, RAB27B	Odległe przerzuty, niższa przeżywalność	[222]
Glejak	RAB27A	Zaawansowane stadium, niższa przeżywalność	[223]
Rak jajnika	RAB27B	Zaawansowane stadium, przerzuty do węzłów chłonnych i odległe, niższa przeżywalność	[224]
Rak trzustki	RAB27A, RAB27B	Odległe przerzuty, niższa przeżywalność	[225, 226]
Rak nerki	RAB27A, RAB27B	Wystąpienie choroby, niższa przeżywalność	[190, 227]

Należy jednak dodać, że istnieją też doniesienia wskazujące na odwrotną korelację. Niższy poziom RAB27A lub RAB27B w tkance nowotworowej był związany z gorszymi rokowaniami pacjentów z rakiem pęcherza, jelita grubego lub prostaty [192, 220, 228]. Podsumowując, RAB27A i RAB27B bezsprzecznie pełnią istotne funkcje w progresji nowotworu, zarówno poprzez wpływ na uwalnianie małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, a także stymulując uwalnianie pro-nowotworowych czynników rozpuszczalnych z komórek.

II. Cel pracy

Wcześnie wykryty czerniak jest niemal całkowicie wyleczalny, jednak dostępne obecnie leczenie zaawansowanych stadiów tego nowotworu nie jest wystarczająco skuteczne. Dlatego też trwają intensywne poszukiwania nowych celów terapeutycznych, które mogłyby wspomóc standardową terapię. RAB27A i RAB27B są białkami pełniącymi kluczową rolę w licznych procesach fizjologicznych i patologicznych, w tym powstawaniu i progresji nowotworów, jednakże ich rola w czerniaku nie jest w pełni zdefiniowana i wymaga dalszych badań. Najlepiej, jak dotąd, poznaną funkcją RAB27 jest jego udział w komórkowych procesach wydzielniczych zależnych i niezależnych od małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Jednakże białko to pełni również funkcje onkogenne i z danych literaturowych wynika, że może oddziaływać na szereg białek sygnałowych i onkoprotein, które z kolei warunkują zachowanie komórek nowotworowych.

Pierwszym założeniem niniejszej pracy było poznanie roli RAB27A w aktywności funkcjonalnej komórek czerniaka, związanej z progresją nowotworu. Drugim celem było poznanie wpływu tego białka 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.

Szczegółowymi celami niniejszej pracy były:

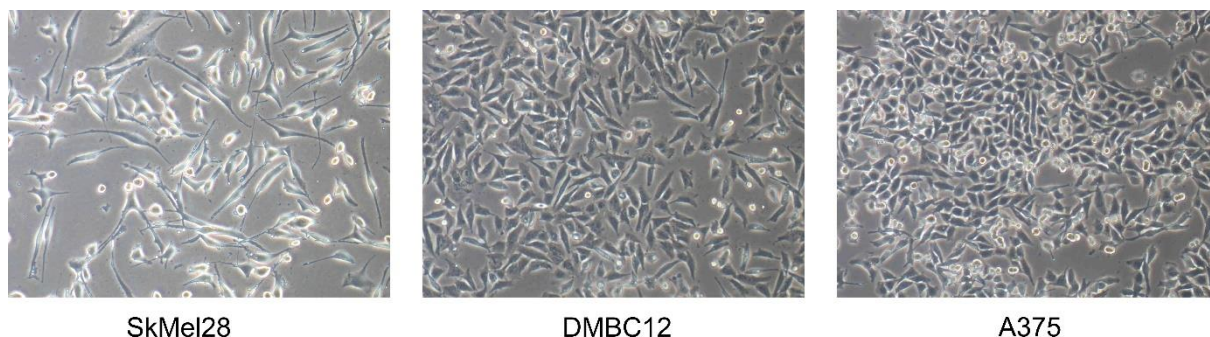
- Ocena uwalniania małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych przez linie komórkowe czerniaka typu dzikiego i z nokautem RAB27A lub RAB27A/B
- Ocena proliferacji, migracji i inwazji linii komórkowych czerniaka typu dzikiego i z nokautem RAB27A lub RAB27A/B
- Ocena ekspresji białek będących produktami protoonkogenów 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

III. Materiały i metody

III.1. Materiały

III.1.1. Linie komórkowe

W niniejszej pracy zostały wykorzystane linie ludzkich komórek czerniaka A375 i SkMel28 pozyskane z American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA. Użyto również linię komórkową DMBC12 otrzymaną od Zakładu Biologii Molekularnej Nowotworów Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Linia ta została wyprowadzona ze zmiany pierwotnej czerniaka guzkowego skóry, o stopniu zaawansowania pT4b, pobranego od pacjentki w Klinice Chirurgii Onkologicznej Katedry Onkologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi [229]. Komórki wszystkich linii charakteryzują się wzrostem adherentnym.



Rycina 6. Zdjęcie obrazu mikroskopowego komórek wykonane w powiększeniu 40x, przy pomocy mikroskopu świetlnego odwróconego Nikon Eclipse TS100.

III.1.2. Odczynniki i inne materiały laboratoryjne

- APS (ang. *ammonium persulfate*), nadsiarczan amonu - SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Niemcy
- Agaroza - SERVA Electrophoresis GmbH
- Azotan srebra - Chempur, Piekary Śląskie, Polska
- Azydek sodu - SERVA Electrophoresis GmbH
- Bibuła Whatman 3MM - GE HealthCare, Chicago, IL, USA
- Błękit trypanu (0,4%) - Merck/Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- BSA (ang. *bovine serum albumin*), surowicza albumina bydlęca - SERVA Electrophoresis GmbH
- cOmplete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail - koktajl inhibitorów proteaz - Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Niemcy
- DMSO (ang. *dimethyl sulfoxide*), dimetylosulfotlenek - Merck/Sigma-Aldrich
- EDTA (ang. *ethylenediaminetetraacetic acid*), wersenian tetrasodowy kwasu etylenodiaminotetraoctowego - Merck/Sigma-Aldrich

- EGTA (ang. *ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid*), glikol etylenowy kwasu tetraoctowego - Merck/Sigma-Aldrich
- Etanol 96% - Polskie Odczynniki Chemiczne (POCH), Gliwice, Polska
- FBS (ang. *fetal bovine serum*), płodowa surowica bydłęca, inaktywowana - EURx, Gdańsk, Polska
- Formaldehyd 36-38 % - Chempur
- Gel Loading Dye Purple (6X) - bufor obciążający do elektroforezy agarozowej - New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
- GelRed - barwnik do elektroforezy kwasów nukleinowych - Biotium, Fremont, CA, USA
- Glicerol - Merck/Sigma-Aldrich
- Glicyna - SERVA Electrophoresis GmbH
- Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail - mieszanka inhibitorów proteaz i fosfataz - Thermo Fisher Scientific, Fremont, CA, USA
- Kwas octowy - Chempur
- Kwas solny - Chempur
- Lipofectamine CRISPRMAX Cas9 Transfection Reagent - Invitrogen/Thermo Fisher Scientific
- L- glutamina (200 mM) - Corning, Corning, NY, USA
- Membrana Immobilon P-PVDF - Millipore/Merck/Sigma-Aldrich
- Metanol - Chempur
- Molecular Biology Grade Water - woda do biologii molekularnej, wolna od DNaz, RNaz i proteaz - Corning
- NaCl (ang. *sodium chloride*), chlorek sodu - SERVA Electrophoresis GmbH
- Opti-MEM I Reduced Serum Medium - Thermo Fisher Scientific
- PBS (ang. *phosphate-buffered saline*), zbuforowany roztwór soli fizjologicznej bez jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} - Corning
- Penicylina/streptomycyna (10000 U/ml penicyliny, 10 mg/ml streptomycyny) - Corning
- Perfect Tricolor Protein Ladder - wzorzec wielkości białek - EURx
- PhosSTOP - inhibitory fosfataz - Roche Diagnostics GmbH
- PMSF (ang. *phenylmethanesulfonyl fluoride*), fluorek fenylometanosulfonylu - Merck/Sigma-Aldrich
- Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix - roztwór do reakcji PCR - New England Biolabs
- Quick-Load® Purple 1 kb Plus DNA Ladder - wzorzec wielkości kwasów nukleinowych - New England Biolabs
- RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*), podłoże do hodowli komórek z dodatkiem L- glutaminy (300 mg/L), d-glukozy (2000 mg/L) - Corning

- SDS (sodium dodecyl sulfate), dodecylosiarczan sodu - SERVA Electrophoresis GmbH
- TEMED (ang. *N,N,N',N'-tetramethylethane-1,2-diamine*), N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina - SERVA Electrophoresis GmbH
- Tiosiarczan sodu - Chempur
- TriPure Isolation Reagent - odczynnik do izolacji RNA - Roche Diagnostics GmbH
- Tris, tris[hydroksymetylo]aminometan, Merck/Sigma-Aldrich
- Triton X-100 - Merck/Sigma-Aldrich
- TrueCut Cas9 Protein v2 - Invitrogen/Thermo Fisher Scientific
- Trypsyna (0,05 %) z dodatkiem 0.53 mM EDTA - Corning
- Tween 20, monolaurynian polioksyetylenosorbitolu - Merck/Sigma-Aldrich
- Węglan potasu - Chempur
- Wodorotlenek sodu, NaOH - Merck/Sigma-Aldrich
- β -merkaptoetanol - Merck/Sigma-Aldrich

III.1.3. Przeciwciała

Pierwszorzędowe do metody Westen blot:

Monoklonalne

- Królicze przeciwciało klasy IgG skierowane przeciwko EGFR - Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
- Królicze przeciwciało klasy IgG skierowane przeciwko GAPDH - Cell Signaling Technology
- Królicze przeciwciało klasy IgG skierowane przeciwko HER3 - Cell Signaling Technology
- Królicze przeciwciało klasy IgG skierowane przeciwko N-kadherynie - Cell Signaling Technology
- Królicze przeciwciało klasy IgG skierowane przeciwko Rab27A - Cell Signaling Technology,
- Królicze przeciwciało klasy IgG skierowane przeciwko Rab27B - Proteintech, Manchester, UK
- Królicze przeciwciało klasy IgG skierowane przeciwko β -aktynie - Cell Signaling Technology
- Mysie przeciwciało klasy IgG skierowane przeciwko Alix - Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA
- Mysie przeciwciało klasy IgG skierowane przeciwko CD63 - Santa Cruz Biotechnology
- Mysie przeciwciało klasy IgG skierowane przeciwko CD81 - Invitrogen/Thermo Fisher Scientific
- Mysie przeciwciało klasy IgG skierowane przeciwko TSG101 - Santa Cruz Biotechnology
- Królicze przeciwciało skierowane przeciwko ufosforylowanej formie AKT (Ser473) - Invitrogen/Thermo Fisher Scientific

Poliklonalne

- Królicze przeciwciało klasy IgG skierowane przeciwko AKT - Invitrogen/Thermo Fisher Scientific
- Królicze przeciwciało klasy IgG skierowane przeciwko ERK1+2 - Invitrogen/Thermo Fisher Scientific

- Królicze przeciwciało klasy IgG skierowane przeciwko ufosforylowanej formie ERK1+2 (Thr202, Tyr204) - Invitrogen/Thermo Fisher Scientific
- Królicze przeciwciało klasy IgG skierowane przeciwko ufosforylowanej formie AKT (Thr308) - Invitrogen/Thermo Fisher Scientific

Drugorzędowe do metody Westen blot:

- Królicze przeciwciało skierowane przeciwko mysim przeciwciałom IgG - Agilent Dako, Santa Clara, CA, USA
- Kozie przeciwciało skierowane przeciwko króliczym przeciwciałom IgG - Agilent Dako

Przeciwciała do cytometrii przepływowej

- Mysie przeciwciało klasy IgG2b skierowane przeciwko EGFR, skoniugowane z fikoerytryną (PE) - Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
- Mysie przeciwciało klasy IgG1 skierowane przeciwko HER2, skoniugowane z fikoerytryną (PE) - Becton Dickinson
- Mysie przeciwciało klasy IgG1 skierowane przeciwko HER3, skoniugowane z Alexa Fluor 647 - Becton Dickinson
- Mysie przeciwciało klasy IgG2b, skoniugowane z fikoerytryną - kontrola izotypowa - Becton Dickinson
- Mysie przeciwciało klasy IgG1, skoniugowane z Alexa Fluor 647 - kontrola izotypowa - Becton Dickinson

III.1.4. Testy i zestawy komercyjne

- Clarity Western ECL Substrate - zestaw do wywoływania chemiluminescencji w metodzie Western Blot - Bio-Rad, Hercules, CA, USA
- CyQUANT Cell Proliferation Assay - zestaw do oceny proliferacji komórek - Invitrogen / Thermo Fisher Scientific
- EnGen Mutation Detection Kit - zestaw do detekcji mutacji genów - New England Biolabs
- Genomic Mini AX - zestaw do izolacji DNA genomowego - A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska
- LightCycler RNA Amplification Kit SYBR Green I - zestaw do reakcji qRT-PCR - Roche Diagnostics GmbH
- Pierce BCA Protein Assay Kit - zestaw do oznaczania poziomu białka - Thermo Fisher Scientific
- Proteome Profiler Human XL Oncology Array - zestaw do wykrywania białek związanych z nowotworem - R&D systems, Minneapolis, MN, USA
- QCM ECMatrix Cell Invasion Assay - zestaw do oceny inwazyjności komórek - Millipore/Merck/Sigma-Aldrich

III.1.5. Bufory i roztwory chemiczne

- Roztwór 30 % akrylamidu i bis-akrylamidu w stosunku 37,5:1 - Bio-Rad
- TAE (Tris-Acetate-EDTA) 10x stężony, bufor do elektroforezy kwasów nukleinowych - EURx
- Protein Loading Buffer Plus 4x stężony - bufor do denaturacji białek redukujący - EURx
- Protein Loading Buffer 4x stężony - bufor do denaturacji białek nieredukujący - EURx
- Bufor do cytometrii przepływowej
 - BSA 5 %
 - Azydek sodu 0,1 %
 - PBS
- Bufor do lizy komórek w celu oceny fosforylacji białek (pH=7,4)
 - Tris 20 mM
 - NaCl 150 mM
 - EDTA 1 mM
 - EGTA 1 mM
 - Triton X-100 1 %
 - PMSF 1 %
 - Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail 1 %
 - PhosSTOP 1 tabletka/10 ml buforu
- Bufor do lizy komórek RIPA (pH=7,4)
 - Tris 50 mM
 - NaCl 150 mM
 - EDTA 2 mM
 - Triton X-100 1 %
 - SDS 0,1 %
 - cOmplete Protease Inhibitor Cocktail 1 tabletka/8 ml buforu
- Bufor do elektroforezy białek (pH=8,3)
 - Tris 25 mM
 - Glicyna 192 mM
 - SDS 0,1 %
- Bufor do transferu białek (pH=8,3)
 - Tris 25 mM
 - Glicyna 192 mM
 - Metanol 10 %
- Bufor do blokowania membrany PVDF - 5 % roztwór BSA w TBST

- Bufor do stripowania membrany
 - SDS 2%
 - Tris-HCl (pH=6,8) 62,5 mM
 - Woda destylowana 67,5 ml
 - β -merkaptoetanol 0,8 ml
- TBS - roztwór soli fizjologicznej buforowanej Tris 10x stężony (pH=7,5)
 - Tris 200 mM
 - NaCl 1,5 M
- TBST
 - TBS 1x stężony
 - Tween20 0,05 %
- Żel agarozowy 2 % w TAE
- Żel poliakrylamidowy rozdzielający
 - Akrylamid/bisakrylamid 30% 5 ml
 - 1,5M Tris-HCl (pH 8.8) 3,75 ml
 - 10% SDS 150 μ l
 - H₂O 6,1 ml
 - 10% APS 75 μ l
 - TEMED 7,5 μ l
- Żel poliakrylamidowy zatężający
 - Akrylamid/bisakrylamid 30% 1,98 ml
 - 0,5M Tris-HCl (pH 6.8) 3,78 ml
 - 10% SDS 150 μ l
 - H₂O 9 ml
 - 10% APS 75 μ l
 - TEMED 15 μ l

III.1.6. Podłoża

- Podłoże hodowlane RPMI 1640 wzbogacone:
 - FBS filtrowany przez filtr o porach 0,2 μ m 10%
 - Penicylina/streptomycyna (P/S) 100U/ml/100 μ g/ml
 - L-glutamina 2 mM
- Podłoże OptiMem do transfekcji z Lipofektaminą

III.1.7. Oligonukleotydy

Tabela 6. Sekwencje miejscowo-specyficzne (ang. *single guide*) RNA (sgRNA) - Dharmacon/Horizon Discovery, Cambridge, UK

Nazwa	Cel	Sekwencja docelowa 5'-3'
sgRNA1A	<i>RAB27A</i>	ATATTTCTCTGCGAGTGCTA
sgRNA2A	<i>RAB27A</i>	TACAGAGCCAGTGGGCCGGA
sgRNA3A	<i>RAB27A</i>	GTTCCATTGCTTCATTATC
sgRNA4A	<i>RAB27A</i>	GCGTTCTTCAGAGATGCTAT
sgRNA1B	<i>RAB27B</i>	TGACTTCCCTCTGATCTGGT
sgRNA2B	<i>RAB27B</i>	TATAGTATTAATTGGCAACA
sgRNA3B	<i>RAB27B</i>	TTGCCAATTAATACTATATC
sgRNA4B	<i>RAB27B</i>	CAAGGACCGAATGGATCTTC
Kontrola pozytywna	<i>PPIB</i>	GGTGTATTTTGACCTACGAAT

Startery wykorzystane do amplifikacji genów metodą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) i ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkrypcją (qRT-PCR) zostały otrzymane przez dr Annę Maciaszek i mgr inż. Barbar Mikołajczyk w Dziale Chemii Bioorganicznej, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych lub zakupione w Genomed S.A. - Warszawa, Polska.

Tabela 7. Sekwencje starterów PCR

Gen	Sekwencja 5'-3'
<i>RAB27A-1</i>	Forward 5'-TTGGCTCTGGTGACAGAATCAC-3' Reverse 5'-TCTCTGCAAATGCCAAGAGTTTG-3'
<i>RAB27A-2</i>	Forward 5'-CAAACATGGTTGTATTCCAGATGGC-3' Reverse 5'-GTAAGTGGCCACTTTCTTGTGG-3'
<i>RAB27A-3</i>	Forward 5'-ATATCTACTGGAAATGCAGTGTGAG-3' Reverse 5'-TTAAGGCAGGTGACAGTACCC-3'
<i>RAB27A-4</i>	Forward 5'-AGATCACAAGCTGGTTCTTGTC-3' Reverse 5'-GGGATAGACTGAAGAGGAGAGC-3'
<i>RAB27B-1</i>	Forward 5'-AAGCAAGAACAGCGCATGGA-3' Reverse 5'-GAACTGTTGCTAGCACATTATAGGT-3'
<i>RAB27B-4</i>	Forward 5'-ATCAGGAAGGGTTATGGGTC-3' Reverse 5'-TGCATAGCAAGAATCTTCAGAGAG-3'
<i>PPIB</i>	Forward 5'-GAACTTAGGCTCCGCTCCTT-3' Reverse 5'-CTCTGCAGGTCAGTTTGCTG-3'

Tabela 8. Sekwencje starterów qRT-PCR

Gen	Sekwencja 5'-3'
RAB27A-1	Forward 5'-GTGCTGTGTGGAAACAAGAGT-3' Reverse 5'-TTTGTCCCATTGGCAGCACT-3'
RAB27A-2	Forward 5'-GCAGGAGAGGTTTCGTAGCTT-3' Reverse 5'-GCATCTGTAGCTGGCTTATCC-3'
RAB27B-1	Forward 5'-AGACGCCATGGGCTTCTTAT-3' Reverse 5'-GTAGGTCTGCCTTGTGCCA-3'
RAB27B-2	Forward 5'-GATGAGCCAACTGCAAGCAAA-3' Reverse 5'-ATTTGTCAGCCAGTCCCGA-3'
GAPDH	Forward, 5'-CATCATCTCTGCCCCCTCTG-3' Reverse, 5'-TCCACGATACCAAAGTTGTC-3'
HER2	Forward, 5'-ATATCCAGGAGGTGCAGGGC-3' Reverse, 5'-TGTTCAAGCGGGTCTCCATTG-3'
HER3	Forward, 5'-CCCTGCCATGAGAACTGCAC-3' Reverse, 5'-TCACTGTCAAAGCCATTGTGAGAT-3'
EGFR	Forward, 5'-CCGCAAAGTGTGTAACGGAA-3' Reverse, 5'-AGTCACCCCTAAATGCCACC-3'

III.1.8. Materiały plastikowe

- Butelki do hodowli komórek o powierzchni hodowlanej 25 cm² i 75 cm² - GenoPlast Biotech S.A., Rokocin, Polska
- Końcówki do pipet automatycznych o pojemnościach 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl - Axygen Scientific, Union City, CA, USA
- Pipety serologiczne, sterylne, jednorazowe, o pojemnościach 5 ml, 10 ml i 25 ml - GenoPlast Biotech S.A.
- Płytki do hodowli komórek 6-, 12-, 24-, 48-, 96-dołkowe - TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Szwajcaria
- Płytki do hodowli komórek 96-dołkowe, czarne do fluorescencji - Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria
- Płytki do reakcji PCR - Axygen
- Probówki cytometryczne - Becton Dickinson
- Probówki do PCR o pojemności 200 µl - Axygen

- Probówki typu eppendorf o pojemności 1,5 ml - Axygen
- Probówki ultrawirówkowe o pojemnościach 14 ml i 38,5 ml - Beckman Coulter, Brea, CA, USA
- Probówki wirówkowe, sterylne o pojemnościach 15 ml i 50 ml - TPP Techno Plastic Products

III.1.9. Aparatura i sprzęt laboratoryjny

- Aparat do qRT-PCR LightCycler 96 System - Roche Diagnostics GmbH
- Blok grzewczy TS-100 SC-20C - Kisker-Biotech GmbH, Steinfurt, Niemcy
- Cytometr przepływowy FACS Calibur - Becton Dickinson
- Czytnik absorbancji, fluorescencji i luminescencji Fluo Star Omega - BMG Labtech, Ortenberg, Niemcy
- Kołyska laboratoryjna - Kisker-Biotech GmbH
- Komora do liczenia komórek Bürkera - Brand, Wertheim, Niemcy
- Mikroskop świetlny odwrócony Nikon Eclipse TS100 - Nikon, Tokio, Japonia
- NanoSight NS3000 instrument - Malvern Panalytical, Malvern, UK
- Spektrofotometr NanoDrop™ ND 1000 - Thermo Fisher Scientific
- System do elektroforezy w żelu agarozowym Axygen horizontal gel box - Axygen
- System do elektroforezy w żelu poliakrylamidowym Mini-Protean Tetra Cell - Bio-Rad
- System do przygotowywania żeli poliakrylamidowych Mini-Protean Tetra Handcast System - Bio-Rad
- System do transferu białek z żelu na membranę Mini Trans-Blot Cell - Bio-Rad
- System do wizualizacji i dokumentacji kwasów nukleinowych w żelach agarozowych oraz białek wybarwionych chemiluminescencyjnie Uvitec Essential V6 - Uvitec, Cambridge, UK
- Termocykler Mastercycler Gradient - Eppendorf, Hamburg, Niemcy
- Ultrawirówka Optima XE - Beckman Coulter
- Wirówka Eppendorf Centrifuge 5415R - Eppendorf
- Wirówka MiniSpinPlus – Eppendorf

III.1.10. Oprogramowanie

- CellQuest Pro - Becton Dickinson - program do analizy wyników cytometrii przepływowej
- NIS-Elements Microscope Imaging Software - Nikon - program do zapisywania obrazu z kamery mikroskopu
- Omega-Data Analysis - BMG LabTech - program do analizy wyników z czytnika płytek
- BioRender - program do przygotowywania rycin
- Inkscape - program do przygotowywania rycin

- ImageJ - program do analizy densytometrycznej białek metodą Western Blot oraz wielkości rysy w teście zarastania rysy
- TIDE - program do oceny wydajności mutacji w sekwencji DNA
- ICE Synthego - program do oceny wydajności mutacji w sekwencji DNA
- National Center for Biotechnology Information (NCBI) Primer-BLAST - program do projektowania starterów do reakcji PCR

III.2. Metody

III.2.1. Hodowla komórek

Komórki linii ludzkiego czerniaka (A375, DMBC12, SkMel28) typu dzikiego (ang. *wild type*, WT), z nokautem *RAB27A* (KO) oraz z nokautem *RAB27A/RAB27B* (ang. *double knockout*, dKO) hodowano w podłożu hodowlanym: RPMI 1640 wzbogaconym 10 % płodową surowicą bydlęcą (FBS), L-glutaminą (2 mM) oraz antybiotykami - penicyliną (100 IU/ml) i streptomycyną (100 µg/ml). Hodowlę prowadzono w inkubatorze zapewniającym stałe warunki hodowli: temperatura 37°C, 5 % CO₂, wilgotność 95 %. Komórki pasażowano po uzyskaniu konfluencji na poziomie ~90 %. Monowarstwę komórek przepłukiwano buforowanym roztworem soli fizjologicznej bez jonów Ca²⁺ i Mg²⁺ (PBS). Następnie odklejano komórki roztworem trypsyny 0,05 % z dodatkiem 0,53 mM EDTA przez 3 min w temperaturze pokojowej. Trypsynę neutralizowano podłożem hodowlanym i komórki wirowano (300 x g, 4 min). Osad komórkowy zawieszano w w/w podłożu hodowlanym. Oceniano żywotność i liczbę komórek w mikroskopie świetlnym stosując barwienie roztworem 0,4% błękitu trypanu. Komórki liczone w komorze Bürkera. Wymaganą liczbę komórek wysiewano na butelki lub płytki hodowlane. Żywotność komórek wykorzystywanych do doświadczeń wynosiła minimum 90%.

III.2.2. Otrzymanie linii komórkowych z nokautem

III.2.2.1. Nokaut metodą CRISPR/Cas9

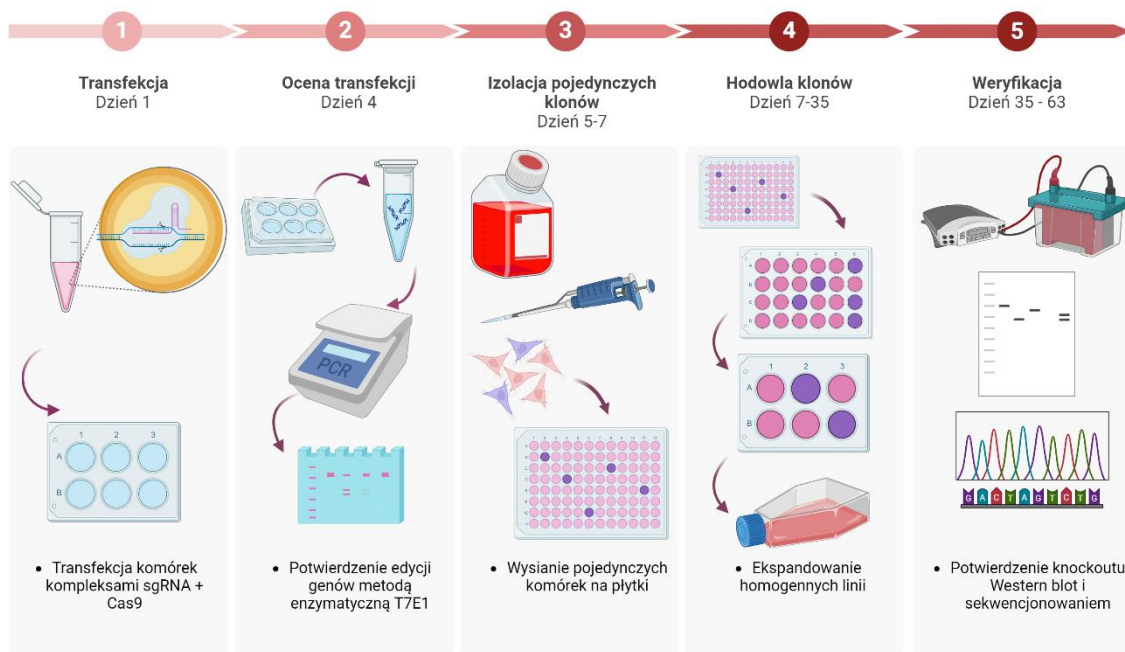
Schemat otrzymania linii komórkowych z nokautem *RAB27A* lub *RAB27A/RAB27B* przedstawiono na rycinie 6. Utworzono kompleksy rybonukleoproteinowe (RNP) zawierające nukleazę Cas9 oraz jednoniciową sekwencję miejscowo-specyficzną (sgRNA) ukierunkowaną na geny *RAB27A* i *RAB27B* w stosunku molowym 1:1 w podłożu Opti-MEM. W celu zwiększenia wydajności wywołania mutacji zastosowano po cztery różne sgRNA ukierunkowane na wybrane geny. Kontrolę pozytywną stanowiło sgRNA ukierunkowane na gen *PPIB*, a kontrolę negatywną sgRNA nieukierunkowane na ludzki genom. Wszystkie sekwencje RNA zostały zawieszane w buforze Tris-HCl (10 mM, pH 7,4) i przechowywane w porcjach w temperaturze -20°C. Do dostarczenia kompleksów RNP użyto odczynnika do transfekcji Lipofectamine CRISPRMAX Cas9, który inkubowano z RNP przez 10 min w temperaturze pokojowej.

Komórki wysiewano 24 godz. przed transfekcją, w gęstości 5×10^5 komórek/dołek, na płytki hodowlane 6-dołkowe. Utworzone kompleksy dodawano do komórek i hodowano przez 72 godz. w temperaturze 37°C , z 5 % CO_2 . Efektywność edycji genów oceniano metodą z użyciem T7 endonukleazy I (T7E1) (punkt III.2.2.3).

Komórki zebrane z płytek 6-dołkowych po transfekcji zawieszano w podłożu hodowlanym RPMI 1640 wzbogaconym 20% FBS, L-glutaminą (2mM) oraz antybiotykami aby uzyskać gęstość 5 komórek/ml i wysiewano na płytki 96-dołkowe. Pojedyncze komórki hodowano do momentu uzyskania około 80% konfluencji, a następnie zbierano namnożone klony i przenoszono je na płytki kolejno 24- i 6-dołkowe. W ten sposób otrzymywano linię homogenną, wywodzącą się z pojedynczej komórki. W kolejnym etapie komórki lizowano oraz weryfikowano obecność białka RAB27A lub RAB27B metodą Western blot (punkt III.2.4.). Klony w których nie wykryto białka poddano sekwencjonowaniu Sangera, w celu dodatkowego potwierdzenia uzyskania nokautu wybranych genów (punkt III.2.2.5).

Aby otrzymać linię komórkową A375 z podwójnym nokautem *RAB27A/RAB27B* komórki A375 z nokautem *RAB27A* transfekowano kompleksem RNP ukierunkowanym na gen *RAB27B*. Kolejne etapy procedury przeprowadzono analogicznie jak opisano powyżej.

Przygotowanie linii komórkowej z nokautem



Rycina 7. Schemat otrzymania linii komórkowych z nokautem genu *RAB27A* lub *RAB27A/RAB27B*

III.2.2.2. Izolacja DNA

Aby ocenić efektywność edycji genów z użyciem T7 endonukleazy I w pierwszej kolejności izolowano DNA oraz amplifikowano fragment zawierający docelową mutację metodą PCR. Produkt PCR poddano trawieniu T7 endonukleazą I (punkt III.2.2.4).

Izolację DNA z komórek po transfekcji systemem CRISPR/Cas9 przeprowadzono przy pomocy komercyjnie dostępnego zestawu Genomic Mini AX. Wszystkie użyte odczynniki znajdowały się w zestawie. Komórki zawieszono w Tris lizowanym buforem lizującym z dodatkiem Proteiny K, inkubowano przez 20 min w temperaturze 50°C, a następnie przez 5 min w temperaturze 70°C. Próby worteksowano przez 20 sek. oraz wirowano przy 16 000 x g przez 3 min. Nadsączano na minikolumny ze złożem wiążącym DNA. Po odwirowaniu (16 000 x g, 1 min) minikolumny dwukrotnie płukano roztworem płuczającym. Po każdym płukaniu kolumny wirowano (16 000 x g, 1 min). Na złożo kolumny nanoszono 100 µl wody wolnej od nukleaz, uprzednio ogrzanej do temperatury 70°C. Po 2 min inkubacji wypłukiwano DNA z minikolumny poprzez wirowanie (16 000 x g, 1 min). Stężenie DNA mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 260 nm, a jego jakość oznaczono przez wyznaczenie i oszacowanie współczynników A260/280 i A260/230 z użyciem aparatu NanoDrop. DNA przechowywano w temperaturze -20°C.

III.2.2.3. Reakcja łańcuchowej polimerazy

PCR przeprowadzono z użyciem odczynnika Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix zgodnie z protokołem producenta. Mieszanina reakcyjna zawierała:

- Matrycę DNA 100 ng
- Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix 12,5 µl
- Startery forward i reverse 0,5 µM + 0,5 µM
- Wodę (Molecular Biology Grade) do objętości końcowej 25 µl

Wstępną denaturację prowadzono w temperaturze 98°C przez 30 sek., a następnie w 35 powtarzających się cyklach o następujących warunkach:

- 98°C, 10 sek. (denaturacja)
- 65-67°C, 30 sek. (przyłączanie starterów)*
- 72°C, 30 sek. (elongacja)

Reakcja była zakończona dodatkową elongacją w temperaturze 72°C przez 2 min.

*Temperaturę określano przy użyciu kalkulatora producenta zestawu do PCR na podstawie sekwencji użytych starterów.

Aby potwierdzić, że uzyskane produkty PCR są spodziewanej wielkości przeprowadzono ich rozdział elektroforetyczny w 2 % żelu agarozowym w 1X buforze TAE, przy napięciu 100 V, przez 60 min. Do prób dodawano bufor obciążający (Gel Loading Dye Purple 6X). Stosowano wzorzec wielkości kwasów

nukleinowych (Quick-Load Purple 1 kb Plus DNA Ladder). Do żelu dodawano fluorescencyjny barwnik do kwasów nukleinowych GelRed, jako nietoksyczną alternatywę bromku etydydy. Żel wizualizowano przy użyciu aparatu Uvitec Essential V6 przy świetle o długości fali 302 nm.

III.2.2.4. Ocena efektywności edycji genów z użyciem T7 endonukleazy I

Obecność mutacji typu insercja/delecja wywołanej cięciem przez Cas9 weryfikowano z wykorzystaniem zestawu EnGen Mutation Detection Kit zgodnie z protokołem producenta. W pierwszym etapie utworzono heterodupleksy w mieszaninie reakcyjnej zawierającej:

- Produkt PCR lub kontrolę pozytywną (z zestawu) 5 µl
- Bufor do reakcji enzymatycznych (z zestawu) 2 µl
- Wodę Molecular Biology Grade 12 µl

Chcąc otrzymać heterodupleksy, mieszaninę denaturowano przez 5 min w 72°C, a następnie pozostawiono do powolnego schłodzenia do temperatury pokojowej celem ponownego przyłączenia nici DNA. Heterodupleksy trawiono T7 endonukleazą I przez 15 min w temperaturze 37°C, a następnie przerywano trawienie przez inkubację z Proteinazą K (5 min, 37°C). Produkty reakcji wizualizowano poprzez rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym jak opisano powyżej (punkt III.2.2.3).

III.2.2.5. Analiza sekwencjonowania

Produkty PCR zostały poddane sekwencjonowaniu Sanger przez firmę Genomed S.A. Wyniki analizowano za pomocą narzędzi komputerowych TIDE oraz ICE Synthego. Narzędzia te porównują elektroforegramy z sekwencjonowania Sanger komórek typu dzikiego i komórek z nokautem. Oceniany jest zakres i częstotliwość mutacji w miejscu docelowym w puli badanych komórek.

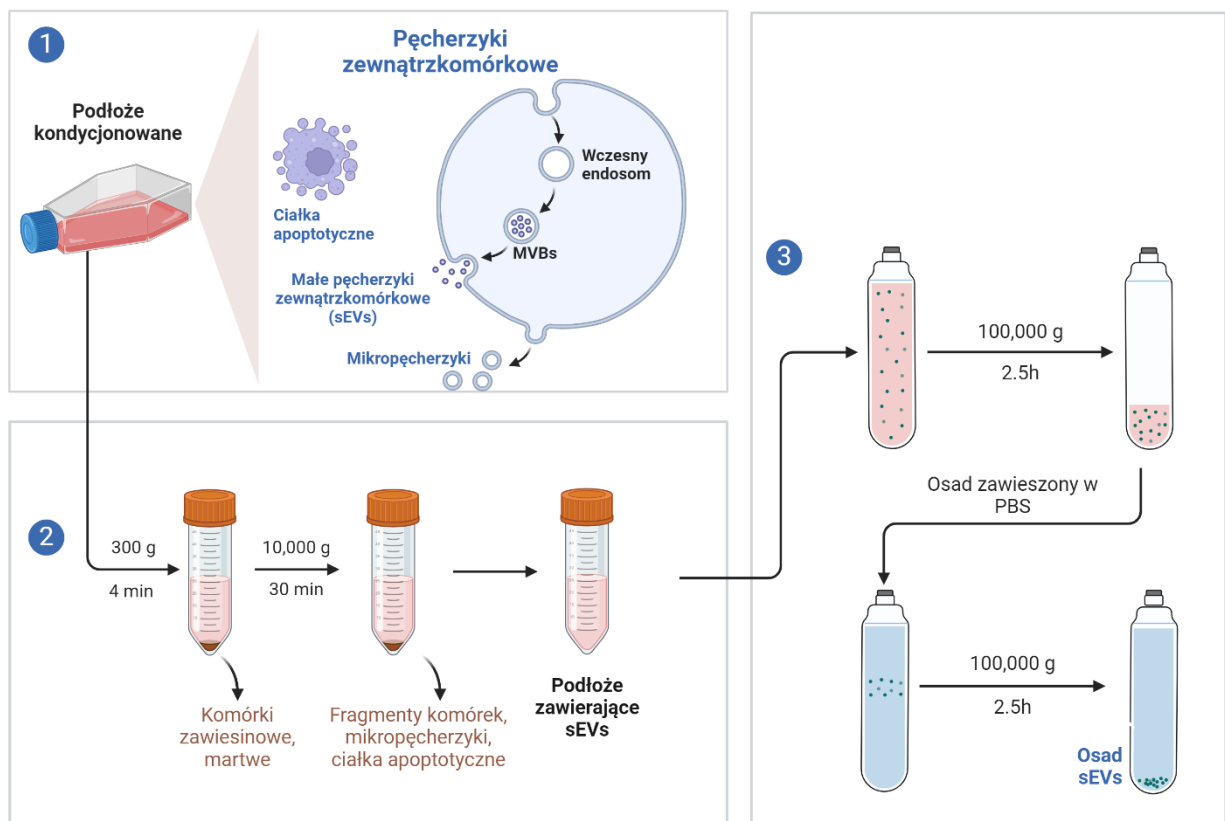
III.2.3. Izolacja małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych

W celu usunięcia małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (sEVs) pochodzących z surowicy, podłoże do hodowli komórek uprzednio oczyszczano poprzez ultrawierowanie w prędkości 100 000 x g przez 2,5 godz.

Małe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe izolowano z komórek typu dzikiego oraz z nokautem *RAB27A* linii A375, DMBC12, SkMel28 oraz komórek z podwójnym nokautem *RAB27A/RAB27B* linii A375. Komórki po pasażu liczone, jak opisano w punkcie III.2.1. Następnie jednakową liczbę komórek każdej linii zawieszano w oczyszczonym medium oraz hodowano w butelkach hodowlanych przez 48 godz. w temperaturze 37°C, 5 % CO₂. Po uzyskaniu ~90-100% konfluencji, z nadmonowarstwy komórek zbierano kondycjonowane podłoże. Komórki natomiast odklejano za pomocą trypsynizacji (punkt III.2.1), ponownie liczone i przygotowywano lizaty komórkowe (III.2.5.1).

Izolację sEVs z podłoża kondycjonowanego prowadzono poprzez serię wirowań różnicujących (Rycina 8). W pierwszej kolejności usuwano komórki odklejone, lub martwe podczas wirowania

w prędkości 300 x g przez 4 min. W kolejnym kroku supernatant wirowano w prędkości 10 000 x g przez 30 min aby wyeliminować fragmenty komórek, mikropęcherzyki oraz ciała apoptotyczne. Uzyskany supernatant ultrawirovano w prędkości 100 000 x g przez 2,5 godz. Tak otrzymany pelet był wzbogacony o małe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe. Osad ten zawieszano w PBS, uprzednio filtrowanym przez filtr o porach 0,2 μm i ponownie ultrawirovano (100 000 x g, 2,5 godz.) aby pozbyć się pozostałości podłoża hodowlanego. Ostatecznie każdy osad sEVs zawieszano w jednakowej objętości filtrowanego PBS i porcjowano. Porcje sEVs pochodzące z jednej izolacji wykorzystywano do badań różnymi metodami.



Rycina 8. Schemat izolacji małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych.

III.2.4. Analiza wielkości i liczby sEVs oraz stężenia całkowitego białka

III.2.4.1. Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

Analiza wielkości oraz liczby pęcherzyków została przeprowadzona z pomocą doktora Mariusza Gadzinowskiego. Wykorzystano aparat NanoSight NS3000 wyposażony w oprogramowanie NTA 3.4 Build 3.4.003. Uzyskane zawiesiny sEVs rozcieńczano 100X w PBS filtrowanym przez filtr o porach 0,2 μm . Analizę przeprowadzono przy następujących parametrach: natężenie przepływu - 50, poziom kamery - 12, próg detekcji - 5, ujęcie - 45 s, liczba ujęć - 3, temperatura - 25°C, liczba klatek - 1124, 100-150 cząsteczek/klatkę. Dla każdej linii komórkowej liczbę sEVs przeliczano na 10^6 komórek, z których zbierano podłoże kondycjonowane.

III.2.4.2 Oznaczenie ilości białka w sEVs metodą z wykorzystaniem kwasu bitynchinowego

Całkowite stężenie białka w sEVs zawieszonych w PBS oznaczano przy użyciu komercyjnego zestawu BCA Protein Assay Kit, zgodnie z zamieszczonym protokołem producenta. Na płytkę 96-dołkową nanoszono badane sEVs oraz krzywą standardową z wzorcowego roztworu BSA. Następnie dodawano odczynnik BCA i płytkę inkubowano przez 30 min w temperaturze 37°C. Wartość absorbancji odczytywano przy długości fali 562 nm przy użyciu czytnika Fluo Star Omega i oprogramowania Omega-Data Analysis. Na podstawie krzywej standardowej wyznaczano równanie krzywej, z którego przeliczano wartość absorbancji na stężenie białka w badanych próbach.

III.2.4.3. Półilościowa analiza białek w sEVs - barwienie srebrem

Pęcherzyki zawieszone w PBS denaturowano buforem obciążającym (Protein Loading Buffer 4x) przez 5 min w temperaturze 95°C. Równe objętości zawiesiny sEVs nanoszono na żel poliakrylamidowy 10%. Rozdział elektroforetyczny przeprowadzano w buforze do elektroforezy, przy użyciu systemu do elektroforezy Mini-Protean Tetra Cell, przy napięciu 180 V, przez 1,5 godz.

Białka, które rozdzielono elektroforetycznie w żelu, wybarwiano azotanem srebra celem ich wizualizacji i porównania ilości w sEVs pochodzących z komórek WT i KO. Po elektroforezie żele utrwalano w 30 % etanolu i 10 % kwasie octowym przez 60 min, następnie płukano w 20 % etanolu przez 10 min, oraz w wodzie destylowanej przez kolejne 10 min. Kolejno, żele umieszczano w roztworze tiosiarczanu sodu (0,2 mg/ml) na 60 sek., oraz dwukrotnie płukano wodą destylowaną. Barwienie przeprowadzano roztworem azotanu srebra (10 mg/ml) przez 30 min. Po dwukrotnym płukaniu wodą destylowaną reakcję wywoływano roztworem zawierającym węglan potasu (30 mg/ml), tiosiarczan sodu (10 µg/ml) oraz formaldehyd (0,04 %). W momencie uzyskania intensywnych prążków przerywano proces przekładając żel do mieszaniny 10 % etanolu i 5 % kwasu octowego. Wybarwiony żel fotografowano.

III.2.5. Ocena poziomu białek i stopnia ich ufosforylowania w komórkach i/lub w sEVs.

III.2.5.1. Przygotowanie lizatów komórkowych

Zawiesinę komórek odwirowywano (300 x g, 4 min) oraz dwukrotnie przepłukiwano zimnym PBS. Osad komórek lizowano buforem RIPA. Komórki, w których oznaczano poziom fosforylacji białek sygnałowych odwirowywano j.w. i lizowano w alternatywnym buforze, opisanym w punkcie III.1.5. Liza komórek była prowadzona na lodzie przez 30 min, następnie lizaty odwirowywano (14 000 x g, 15 min, 4°C). Supernatant zbierano i przechowywano w -20°C.

III.2.5.2. Rozdział białek w żelu poliakrylamidowym

Całkowite stężenie białka w lizatach komórkowych oznaczano korzystając z komercyjnego zestawu BCA Protein Assay Kit, jak opisano w punkcie III.2.4.2.

Lizaty komórkowe lub sEVs zawieszane w filtrowanym PBS były denaturowane buforem obciążającym, redukującym lub nieredukującym przez 5 min w temperaturze w 95°C. Bufor nieredukujący (Protein Loading Buffer 4x) stosowano do lizatów i sEVs przeznaczonych do oceny poziomu białek CD63 lub CD81. W przypadku pozostałych białek wykorzystywano bufor redukujący (Protein Loading Buffer Plus 4x). Lizaty zawierające równą ilość białka, lub równe objętości zawiesiny sEVs наносono na żel 10% poliakrylamidowy. Rozdział elektroforetyczny przeprowadzano przez 1,5 godz. w buforze do elektroforezy, przy użyciu systemu do elektroforezy Mini-Protean Tetra Cell, stosując napięcie 180 V. Jako standard (wzorzec mas) używano Perfect Tricolor Protein Ladder.

III.2.5.3. Western blot

Białka lizatów lub sEVs rozdzielone elektroforetycznie w żelu poliakrylamidowym przenoszono na membranę PVDF, którą uprzednio aktywowano metanolem. Zestaw transferowy składał się z podwójnej warstwy bibuły Whatman 3MM, żelu poliakrylamidowego, membrany PVDF oraz kolejnej warstwy bibuły. Transfer białek prowadzono metodą „na mokro” przy użyciu systemu Mini Trans-Blot Cell (270 mA, przez 90 min).

Membranę blokowano w buforze TBST z dodatkiem 5 % BSA, przez 60 min, w temperaturze pokojowej, z delikatnym mieszaniem na kołyszce laboratoryjnej. Następnie membrany inkubowano z przeciwciałami pierwszorzędowymi (w rozcieńczeniu wskazanym w tabeli 9), w buforze blokującym przez 18 godz., w temperaturze 4°C, z delikatnym kołysaniem.

Tabela 9. Rozcieńczenie przeciwciał wykorzystywanych w metodzie Western blot

Gospodarz	Przeciwciało	Rozcieńczenie
Królik	Anty-AKT	1:1000
	Anty-AKT (Thr308)	1:1000
	Anty-AKT (Ser473)	1:250
	Anty-EGFR	1:1000
	Anty-ERK1+2	1:1000
	Anty-ERK1+2 (Thr202, Tyr204)	1:1000
	Anty-GAPDH	1:2500
	Anty-HER3	1:500
	Anty-N-kadheryna	1:1000
	Anty-RAB27A	1:1000
	Anty-RAB27B	1:500
	Anty-B-aktyna	1:3000

Mysz	Anty-Alix	1:1000
	Anty-CD63	1:1000
	Anty-CD81	1:1000
	Anty-TSG101	1:1000

Kolejno membrany przepłukiwano trzykrotnie przez 5 min buforem TBST z delikatnym mieszaniem i inkubowano z drugorzędowymi przeciwciałami. Stosowano skoniugowane z peroksydazą chrzanową: królicze przeciwciała skierowane przeciwko mysim IgG, lub kozie przeciwciała skierowane przeciwko króliczym IgG. Przeciwciała drugorzędowe były rozcieńczone w buforze blokującym w stosunku 1:5000, a inkubację prowadzono przez 60 min, w temperaturze pokojowej, z kołysaniem. Proces zakończono ponownym trzykrotnym płukaniem (po 5 min) buforem TBST. Reakcję chemiluminescencji wywoływano odczynnikami Clarity Western ECL Substrate. Białka wizualizowano przy użyciu aparatu Uvitec Essential V6.

Membrany stripowano buforem do stripowania (20 min, temperatura pokojowa), następnie płukano jednokrotnie buforem TBST (10 min, temperatura pokojowa) i ponownie blokowano buforem blokującym przez 60 min. Kolejne etapy metody Western blot wykonywano jak opisano powyżej.

III.2.5.4. Profil proteomiczny onkoprotein

Komórki badanych linii typu dzikiego oraz z nokautem analizowano pod kątem poziomu 84 onkoprotein przy użyciu zestawu Proteome Profiler Human XL Oncology Array zgodnie z protokołem producenta. Wszystkie użyte odczynniki były obecne w zestawie. Lizaty komórkowe przygotowywano przy użyciu odpowiednich buforów dołączonych do zestawu. Membrany nitrocelulozowe, z naniesionymi biotynylowanymi przeciwciałami w postaci punktów w duplikatach, blokowano w buforze blokującym (60 min, temperatura pokojowa). Następnie inkubowano je z lizatami komórkowymi przez 18 godz., w temperaturze 4°C, z delikatnym mieszaniem na kołysce laboratoryjnej. W kolejnym etapie membrany przepłukiwano trzykrotnie (po 10 min) buforem płuczającym oraz inkubowano z koktajlem przeciwciał drugorzędowych przez 60 min, w temperaturze pokojowej z delikatnym mieszaniem. Membrany ponownie przepłukiwano (3 x 10 min) z nadmiaru przeciwciał oraz inkubowano z rozcieńczonym roztworem streptawidyny wyznakowanej peroksydazą chrzanową, wiążącą się do biotynylowanych przeciwciał (30 min, temperatura pokojowa, z delikatnym kołysaniem). Po dodaniu odczynnika wywołującego chemiluminescencję białka związane z przeciwciałami wizualizowano przy użyciu aparatu Uvitec Essential V6.

III.2.5.5. Analiza densytometryczna

Analizę densytometryczną prążków lub punktów na zdjęciach z aparatu Uvitec Essential V6 przeprowadzano z użyciem programu komputerowego ImageJ. Pole powierzchni pod krzywą każdego

prążka lub punktu zostało zmierzone, a następnie przeliczone jako względną wartość w odniesieniu do kontroli. Kontrolę dla lizatów komórkowych linii z nokautem stanowiły lizaty z linii typu dzikiego. Kontrolę równego stężenia białek w badanych lizatach w metodzie Western blot stanowiły białka GAPDH lub β -aktyna. Membrany z zestawu Proteome Profiler Human Oncogene Protein Array posiadały po trzy punkty referencyjne, każdy naniesiony w duplikatach.

III.2.6. Ocena poziomu mRNA za pomocą qRT-PCR

III.2.6.1. Izolacja RNA

Całkowity RNA komórkowy został wyizolowany przy użyciu TriPure Isolation Reagent zgodnie z instrukcjami producenta. Komórki zawieszano w 1 ml buforu do lizy, a następnie dodano 0.2 ml chloroformu i dokładnie wymieszano. Po 15 min inkubacji, próbki wirowano (12 000 x g, 15 min, 4°C) w celu rozdzielania faz. Górną, przezroczystą fazę wodną przenoszono do nowych probówek typu eppendorf. Dodawano 0,5 ml izopropanolu, zworteksowano i mieszaninę inkubowano przez 10 min. Po odwirowaniu (12 000 x g, 15 min, 4°C) usuwano supernatant. Osad zawierający RNA przepłukiwano 1 ml 75% etanolu poprzez worteksowanie oraz odwirowano (7500 x g, 5 min, 4°C). Usuwano etanol oraz pozostawiono osady do wyschnięcia w komorze laminarnej na 10 min. Osady zawieszano w wodzie wolnej od nukleaz i inkubowano przez 15 min w temperaturze 56°C. Stężenie otrzymanego RNA oznaczano spektrofotometrycznie przy długości fali 260, a jego czystość poprzez pomiar absorbancji przy długościach fali 260/230 nm i 260/280 nm za pomocą pomiaru aparatu NanoDrop™ ND 1000. RNA przechowywano w temperaturze -20°C do czasu dalszej analizy.

III.2.6.2. qRT-PCR

Ilościową reakcję łańcuchową polimerazy z odwrotną transkrypcją przeprowadzono przy użyciu zestawu LightCycler RNA Amplification Kit SYBR Green I zgodnie z protokołem producenta. Sekwencje starterów zostały zaprojektowane za pomocą programu Primer3.

Mieszanina reakcyjna zawierała:

- | | |
|-----------------------------|-----------------|
| • RNA | 250 ng |
| • Startery | 2,5 mM + 2,5 mM |
| • Reaction Mix SYBR Green I | 2 μ l |
| • Enzyme Mix | 0,2 μ l |
| • MgCl ₂ 5 mM | 0,8 μ l |

Reakcje prowadzono w następujących etapach:

- odwrotna transkrypcja matrycy DNA - 55°C, 10 min
- deaktywacja odwrotnej transkryptazy - 95°C, 30 sek.
- amplifikacja cDNA (45 cykli):

- denaturacja - 95°C, 10 sek.
- annealing - 60°C, 10 sek.
- elongacja - 72°C, 10 sek.

Wartości graniczne cyklu (Ct) normalizowano do genu referencyjnego (GAPDH). Względną ekspresję genów obliczano przy użyciu wzoru $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$. Produkty analizowano za pomocą oceny temperatur mięknięcia oraz elektroforezy w żelu agarozowym.

III.2.7. Cytometria przepływowa

Osad komórkowy ($\geq 10^4$ komórek) przepłukiwano dwukrotnie zimnym PBS, a następnie zawieszano w 250 μ l buforu do cytometrii zawierającego PBS wzbogacony 2 %, BSA i 0,1 % azydkiem sodu. Komórki znakowano mysim przeciwciałem IgG2b przeciwko EGFR skoniugowanym z PE, mysim przeciwciałem IgG1 przeciwko HER2 skoniugowanym z PE, mysim przeciwciałem IgG1 przeciwko HER3 skoniugowanymi z Alexa Fluor 647, lub odpowiadającymi im kontrolami izotypowymi (mysie przeciwciała klasy IgG2b, skoniugowane z PE oraz mysie przeciwciała klasy IgG1, skoniugowane z Alexa Fluor 647), przez 60 min, na lodzie, w ciemności. Następnie komórki wirowano (180 x g, 4 min), a osady przepłukiwano zimnym buforem do cytometrii. Po ponownym odwirowaniu komórki zawieszano w 400 μ l buforu do cytometrii. Kontrolę autofluorescencji stanowiły komórki nieznakowane zawieszane w buforze do cytometrii. Ekspresję powierzchniowych receptorów oceniano przy użyciu cytometru przepływowego FACSCalibur. Otrzymane wyniki analizowano na podstawie średniego poziomu fluorescencji (ang. *mean fluorescence intensity*, MFI) w programie CellQuest Pro.

III.2.8. Ocena proliferacji komórek

Proliferaację komórek mierzono przy użyciu testu CyQUANT Cell Proliferation Assay zgodnie z protokołem producenta. Komórki w liczbie $1,5 \times 10^3$ zawieszane w podłożu hodowlanym wysiewano do dołków czarnej płytki 96-dołkowej i hodowano przez 72 godz. w temperaturze w 37°C, 5 % CO₂. Po tym czasie usuwano podłoże i dodawano barwnik fluorescencyjny wiążący się DNA. Płytki inkubowano przez 30 min, w temperaturze 37°C z 5 % CO₂. Wraz z namnażaniem komórek następuje przyrost ilości komórkowego DNA oraz zwiększona intensywność fluorescencji. Fluorescencję mierzono przy długości fali 480/520 nm na czytniku mikroplatek FLUOstar Omega z oprogramowaniem Omega-Data Analysis. Uzyskane wyniki przedstawiono jako procent proliferacji obliczony według wzoru:

$$\% \text{ proliferacji} = \left(\frac{\text{fluorescencja próby} - \text{fluorescencja tła}}{\text{fluorescencja kontroli} - \text{fluorescencja tła}} \right) \times 100$$

III.2.9. Ocena migracji komórek

Migrację komórek oceniano testem zarastania rasy. Komórki (1×10^5 komórek/dotek w podłożu hodowlanym) wysiewano na płytce 24-dołkowej i hodowano przez 24 godz. (37°C, 5 % CO₂) do uzyskania

95% konfluencji. Za pomocą sterylnej końcówki pipety o pojemności 200 μ l tworzący rysę w monowarstwie komórek. Następnie monowarstwę dwukrotnie przemywano PBS w celu usunięcia oderwanych komórek. Dodawano podłoże hodowlane RPMI 1640 wzbogacone 1% FBS i antybiotykami (bez L-glutaminy) i komórki hodowano przez 24 godz. w temperaturze 37°C z 5 % CO₂. Postęp zarastania rysy dokumentowano od momentu jej wykonania (czas 0) do 6, 12 i 24 godzin hodowli za pomocą kamery podłączonej do mikroskopu Eclipse TS100. Zdjęcia wykonywano przy powiększeniu 400x. Powierzchnię rysy mierzono za pomocą oprogramowania ImageJ. Wartości wyznaczano według wzoru:

$$\text{powierzchnia rysy [\%]} = \frac{\text{powierzchnia rysy po 6/12/24 godz.}}{\text{powierzchnia rysy w czasie 0}} \times 100$$

III.2.10. Ocena inwazyjności komórek

Inwazyjność komórek badano przy użyciu testu QCM ECMatrix Cell Invasion zgodnie z protokołem producenta. Komórki hodowano przez 24 godz. (37°C, 5 % CO₂) w podłożu RPMI 1640 z dodatkiem antybiotyków, ale pozbawionym surowicy oraz L-glutaminy. Następnie przygotowywano zawiesiny komórek w w/w podłożu, o gęstości zależnej od linii komórkowej. Komórki A375, RAB27A KO A375 i RAB27A/B dKO A375 - 0,35x10⁶ komórek/ml, SkMel28, RAB27A KO SkMel28 - 0,5x10⁶ komórek/ml, DMBC12, RAB27A KO DMBC12 - 1x10⁶ komórek/ml.

Przygotowane zawiesiny komórkowe nanoszono na obecne w zestawie wkłady z dnem z membrany poliwęglanowej o porach wielkości 8 μ m pokrytej warstwą białek macierzy zewnątrzkomórkowej pochodzących z guza myszy Engelbreth Holm-Swarm. Warstwa białek macierzy zewnątrzkomórkowej blokuje pory membrany uniemożliwiając swobodne przejście nieinwazyjnych komórek nowotworowych. Inwazyjne komórki degradują macierz i migrują przez pory do spodniej warstwy membrany. Wkłady z naniesionymi komórkami umieszczano w dołkach płytki 24-dołkowej. Do dołków nanoszono podłoże RPMI 1640 z antybiotykami wzbogacone o 10% FBS (czynnik chemotaktyczny dla komórek), lub pozbawione FBS (kontrola negatywna). Po 48 godz. hodowli w temperaturze 37°C, z 5% CO₂ usuwano podłoże z wkładów i z dołków płytki. Komórki znajdujące się na spodzie membrany odklejało i lizowano za pomocą buforu zawierającego barwnik fluorescencyjny. Fluorescencję mierzono przy długości fali 480/520 nm na czytniku FLUOstar Omega. Procent inwazyjności komórek oszacowano według wzoru:

$$\% \text{ inwazyjności} = \left(\frac{\text{fluorescencja próby} - \text{fluorescencja tła}}{\text{fluorescencja kontroli} - \text{fluorescencja tła}} \right) \times 100$$

III.2.12. Analiza statystyczna

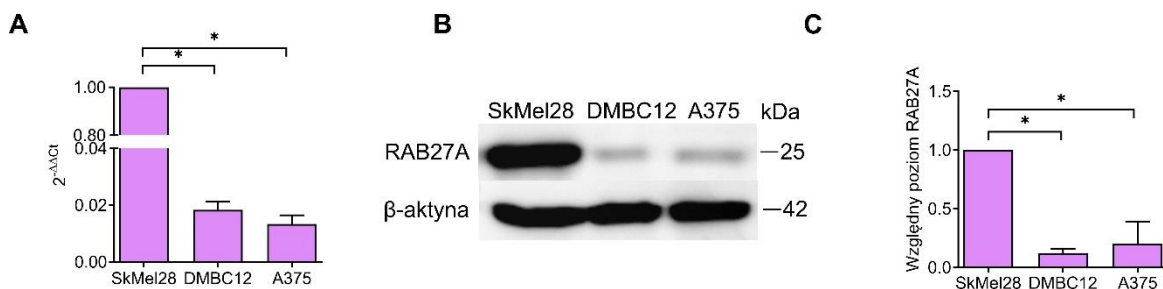
Analizę statystyczną uzyskanych wyników, bez względu na zastosowaną technikę analityczną, rozpoczynano od badania prób pod kątem występowania wartości odstających (test Grubbsa) oraz

oceny normalności danych rozkładów empirycznych (test W Shapiro-Wilka). We wszystkich analizowanych zbiorach dane przyjmowały rozkład normalny co skutkowało zastosowaniem, w dalszej analizie, odpowiednich testów parametrycznych. Następnie weryfikowano jednorodność wariancji testem Levene'a oraz testem Browna-Forsythe'a. Do określenia różnic lub ich braku pomiędzy dwiema próbkami niezależnymi (DMBC12 WT vs. DMBC12 KO; SkMel28 WT vs. SkMel28 KO) używano testu t-Studenta dla zmiennych niepowiązanych lub, w niektórych przypadkach, testu Cochran-Coxa (test t dla niejednorodnych wariancji). Do określenia różnic między średnimi trzech prób (A375 WT vs. A375 KO vs. A375 dKO) stosowano jednokierunkowy test ANOVA (wskazujący na ogólną, statystycznie istotną różnicę pomiędzy średnimi grup) wraz z porównaniami post-hoc (w celu wskazania między którymi grupami zachodzi statystycznie znamienne różnica) testem rozsądnej istotnej różnicy (RIR) Tukeya lub RIR Tukeya dla nierównych licznosci. Otrzymane wyniki przedstawiono jako średnie \pm odchylenie standardowe (ang. *standard deviation*, SD). Wszystkie analizy statystyczne zostały wykonane przy użyciu oprogramowania Statistica ver. 8.0. Różnice pomiędzy średnimi uznawano za istotne statystycznie dla poziomu ufności $p < 0,05$ i oznaczono na rycinach jako: *.

IV. Wyniki

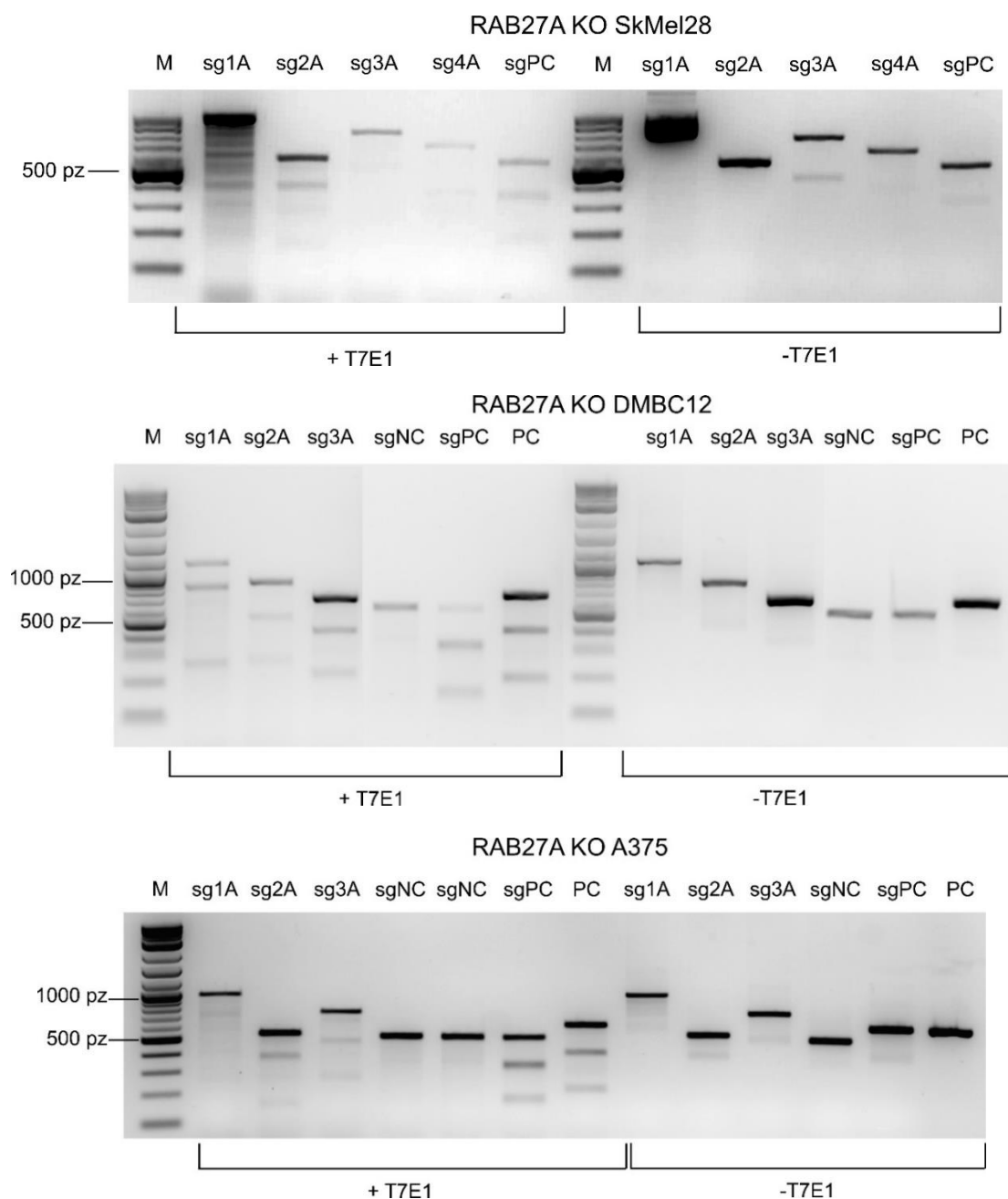
IV.1. Otrzymanie linii komórkowych czerniaka z nokautem *RAB27A* i *RAB27A/B*

Badania rozpoczęto od porównania bazowej ekspresji *RAB27A* w komórkach czerniaka linii A375, DMBC12 i SkMel28. Analiza metodą qRT-PCR wykazała, że najwyższy poziom mRNA *RAB27A* jest obecny w komórkach SkMel28, podczas gdy znacznie niższe poziomy zaobserwowano w komórkach A375 i DMBC12 (Rycina 9A). Wyniki uzyskane za pomocą techniki Western blot potwierdziły, że poziom białka *RAB27A* jest najwyższy w komórkach SkMel28 (Rycina 9B,C).



Rycina 9. Poziom ekspresji mRNA i białka *RAB27A* w liniach komórkowych czerniaka SkMel28, DMBC12 i A375 oceniany przy użyciu odpowiednio qRT-PCR (A) i Western blot (B,C). (A) Dane przedstawiono jako średnie \pm SD (* $p < 0,05$, $n \geq 3$). (B) Reprezentatywny Western blot. (C) Wyniki zaprezentowano jako względny poziom białka na podstawie analizy densytometrycznej intensywności sygnału. Dane przedstawiono jako średnie \pm SD (* $p < 0,05$, $n \geq 5$).

Aby ocenić rolę *RAB27A* w komórkach czerniaka postanowiono wyciszyć ekspresję tego genu w komórkach linii A375, DMBC12 i SkMel28 za pomocą systemu CRISPR/Cas9. Wydajność transfekcji i powstanie mutacji wywołanych cięciem przez endonukleazę Cas9 zweryfikowano metodą enzymatyczną T7E1 opartą na trawieniu produktu PCR. T7 Endonukleaza I rozpoznaje i przecina DNA w miejscu wystąpienia więcej niż jednej niesparowanej pary zasad. Tę właściwość wykorzystuje się do trawienia heterodupleksów, które powstają na skutek sparowania nici DNA niezmodyfikowanej z nicią modyfikowaną genetycznie. Podczas rozdzielania elektroforetycznego obserwuje się dwa krótsze fragmenty DNA, powstałe po przecięciu produktu PCR w miejscu wystąpienia mutacji, oraz dłuższy fragment nie zawierający mutacji. Na podstawie intensywności prążków powstałych po cięciu T7E1, w porównaniu do niestrawionego produktu można oszacować efektywność edycji (Rycina 10).

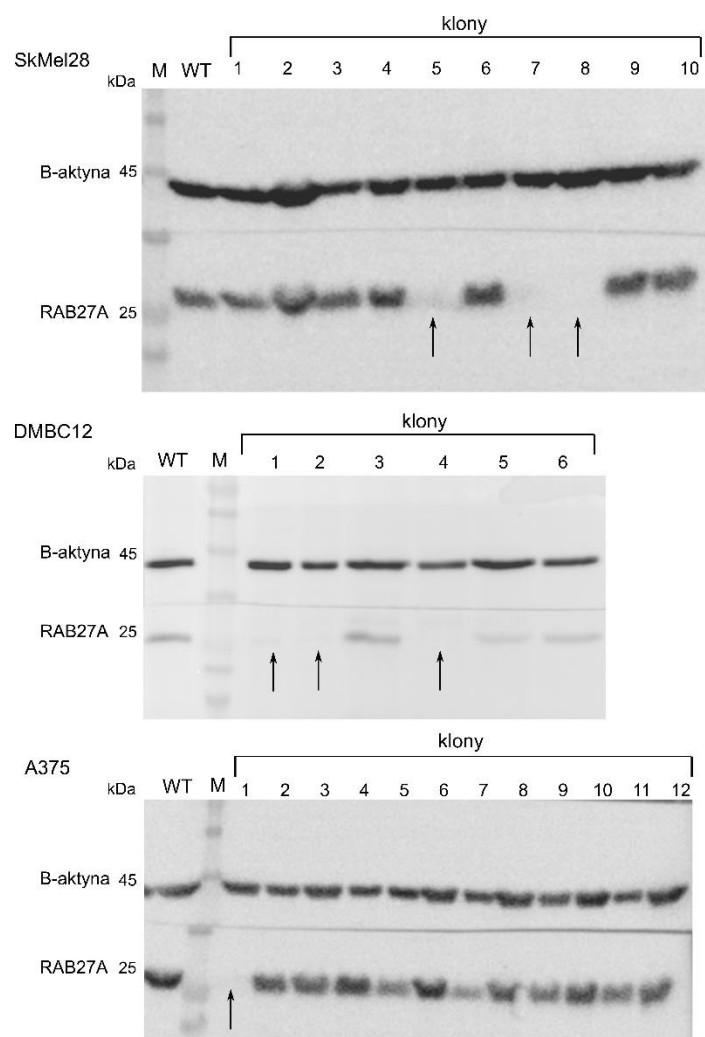


Rycina 10. Produkty PCR przed (-T7E1) i po (+T7E1) trawieniu T7 endonukleazą I. SgNC - kontrola negatywna sgRNA, sgPC - kontrola pozytywna sgRNA, PC - kontrola pozytywna enzymu, sg1A-sg4A - sgRNA ukierunkowane na gen *RAB27A*

Widoczne na żelu dodatkowe prążki potwierdzają powstanie dwóch krótszych fragmentów DNA na skutek trawienia produktu PCR w miejscu mutacji przez T7E1. Oznacza to, że doszło do powstania mutacji w miejscu docelowym w genie *RAB27A*. Efektywność edycji poszczególnych sgRNA była różna w zależności od linii komórkowej. W przypadku linii SkMel28 sg4A wydaje się być najbardziej efektywnym sgRNA. Z kolei w komórkach DMBC12 było to sg1A, a w komórkach A375 sg3A. Kontrola

pozytywna (sgPC) potwierdziła skuteczność cięcia nukleazą Cas9, natomiast kontrola negatywna (sgNC) potwierdziła, że jest to reakcja miejscowo specyficzna. Transfekcje przeprowadzono jeden raz.

Następnie wyprowadzono linie wywodzące się z pojedynczych komórek, w których zweryfikowano obecność nokautu *RAB27A* poprzez ocenę poziomu białka metodą Western blot. Sprawdzono po 200-400 klonów każdej z badanych linii w celu zidentyfikowania linii z zahamowaną syntezą białka *RAB27A*. Komórki linii, w których nie wykryto białka *RAB27A* (zaznaczone strzałkami na rycinie 11) poddano sekwencjonowaniu Sangera, w celu potwierdzenia wystąpienia mutacji w miejscu docelowym.



Rycina 11. Przykładowy Western blot przedstawiający ocenę poziomu białka *RAB27A* w klonach komórek linii SkMel28, DMBC12 i A375 z nokautem *RAB27A*, w porównaniu do kontroli - komórek linii typu dzikiego (WT). Strzałkami oznaczono klony wybrane do sekwencjonowania.

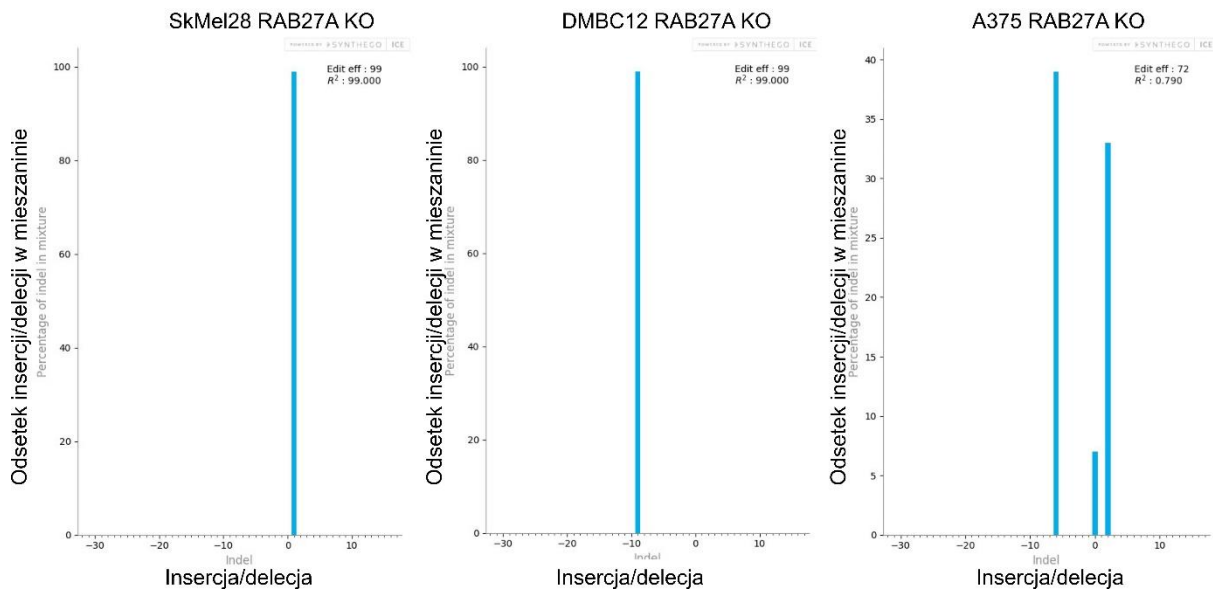
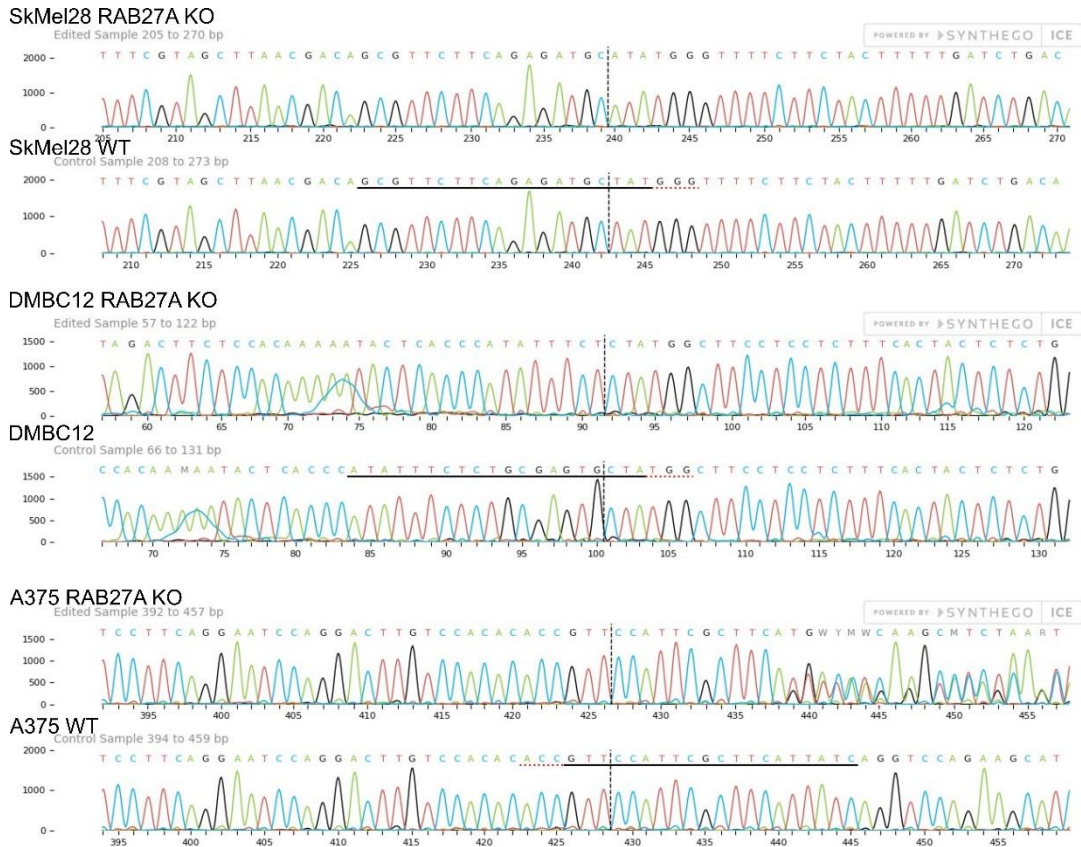
Wyniki sekwencjonowania w postaci elektroforegramów analizowano z użyciem programów komputerowych TIDE i ICE Synthego. Na podstawie porównania sekwencji DNA linii typu dzikiego i linii modyfikowanych genetycznie oceniano zakres i częstotliwość mutacji w miejscu docelowym w puli

badanych komórek. Wyniki analizy sekwencji przedstawiono w tabeli 10. Do dalszych badań wybrano linie komórek o mutacji homogennej lub o najwyższym odsetku puli komórek zmodyfikowanych, czyli klony oznaczone '*'. Obecne mutacje w miejscu cięcia oraz odsetek insercji/delecji w mieszaninie w klonach wybranych do dalszych badań przedstawiono na rycinach 12 i 13. Linię A375 *RAB27A* KO stanowi mieszanina komórek, z których część posiada delecję 6 nukleotydów, a część insercję 1 nukleotydu. W przypadku tej linii wydajność edycji mierzona dwoma algorytmami różniła się. Komórki linii DMBC12 niemal w 100% posiadają delecję 9 nukleotydów, a komórki SkMel28 insercję 1 nukleotydu.

Tabela 10. Ocena wydajności edycji *RAB27A* w klonach linii A375 *RAB27A* KO, DMBC12 *RAB27A* KO, SkMel28 *RAB27A* KO.

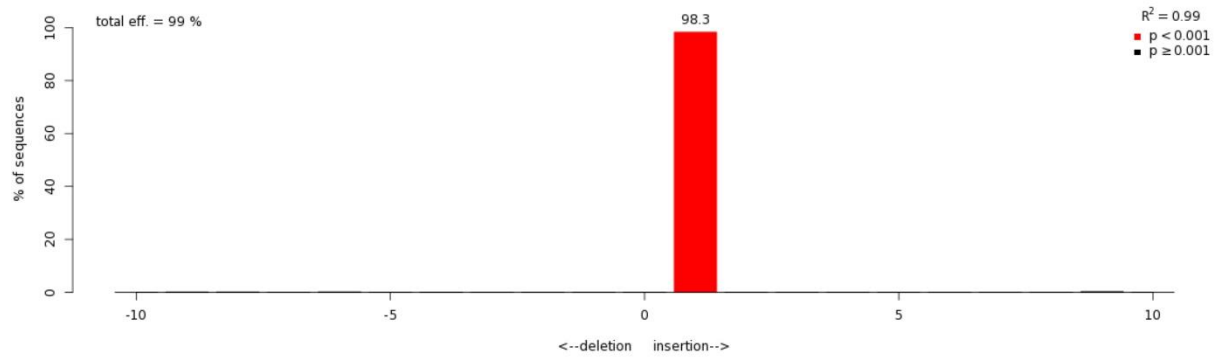
Linia	Klon	Wydajność edycji met. TIDE	Wydajność edycji met. ICE Synthego
SkMel28 <i>RAB27A</i> KO	#1*	99%	99%
	#2	91,10%	90%
	#3	41,50%	89%
	#4	26,40%	72%
	#5	78,80%	96%
DMBC12 <i>RAB27A</i> KO	#1*	98,8%	99%
	#2	48,1 %	87%
A375 <i>RAB27A</i> KO	#1*	96%	72%
	#2	92,85%	80%

Klony oznaczone '*' zostały wybrane do dalszych badań

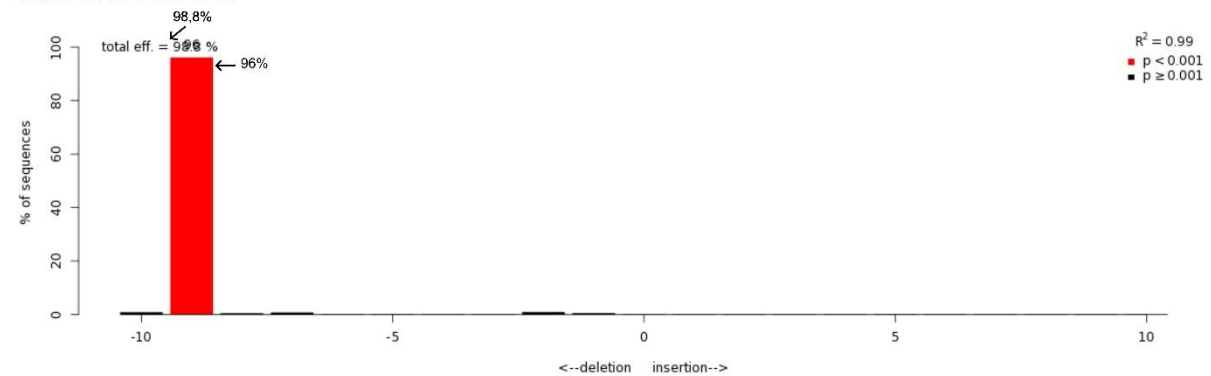


Rycina 12. Analiza mutacji typu insercja/delecja w wybranych klonach z nokautem *RAB27A* przeprowadzona w programie ICE Synthego.

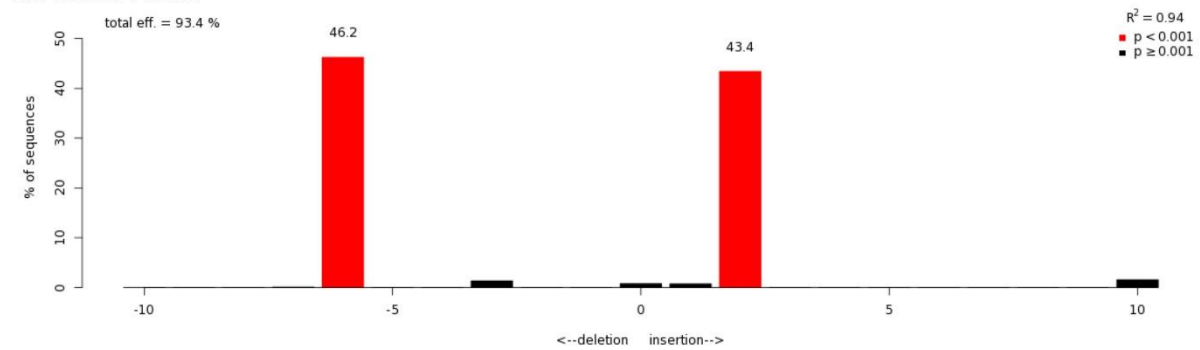
SkMe128 RAB27A KO



DMBC12 RAB27A KO

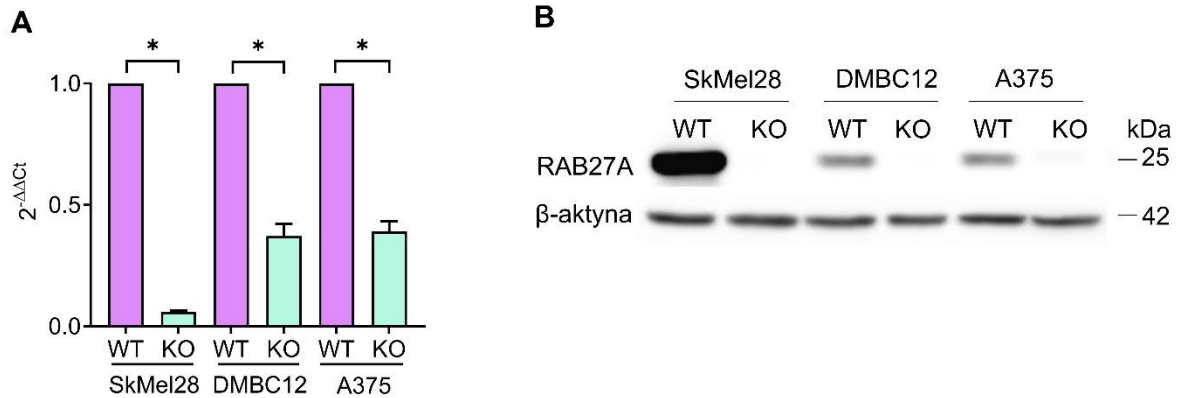


A375 RAB27A KO



Rycina 13. Analiza mutacji typu insercja/delecja w wybranych klonach z nokautem *RAB27A* przeprowadzona w programie TIDE.

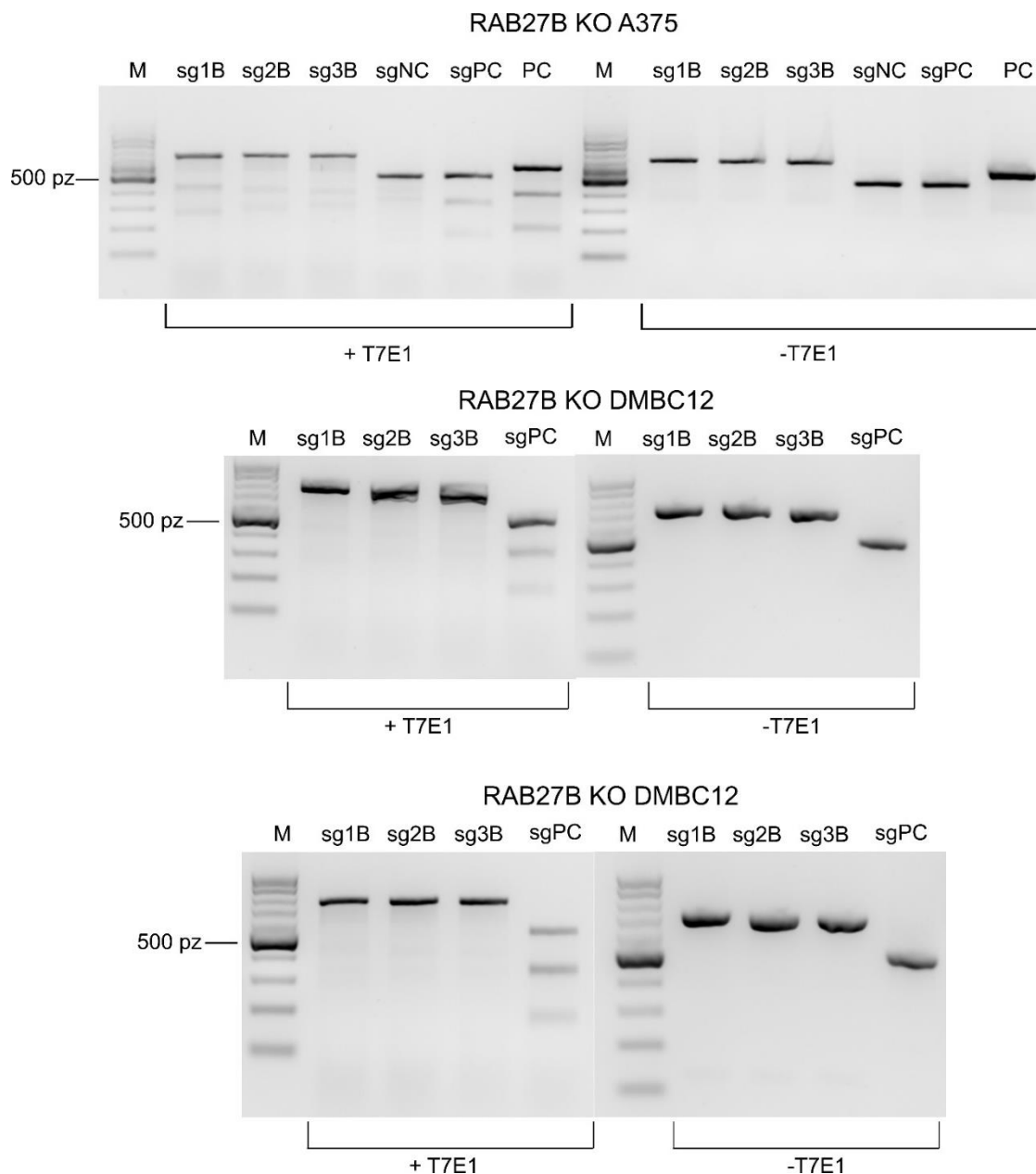
Ponowna analiza poziomu białka metodą Western blot potwierdziła wyciszenie *RAB27A* w wyselekcjonowanych klonach. Zaobserwowano również obniżenie ekspresji mRNA *RAB27A* w wyselekcjonowanych klonach w porównaniu do linii dzikich (WT) (Rycina 14).



Rycina 14. Potwierdzenie wyciszenia *RAB27A* w wyselekcjonowanych klonach linii SkMel28, DMBC12 i A375. Poziomy mRNA *RAB27A* (A) i białka *RAB27A* (B) w komórkach oceniano metodami odpowiednio qRT-PCR i Western blot. (A) Dane przedstawiono jako średnie \pm SD z 3 niezależnych izolacji mRNA, * $p < 0,05$. (B) Reprezentatywny Western blot z 3 niezależnych lizatów komórkowych.

Aby wykluczyć możliwość kompensacji funkcji jednej izoforym *RAB27* przez drugą, postanowiono wyciszyć również *RAB27B*. W celu otrzymania linii z podwójnym nokautem (dKO) *RAB27A/B* transfekowano komórki A375 *RAB27A* KO kompleksem RNP ukierunkowanym na *RAB27B*. Wykonano również dwie próby uzyskania podwójnego nokautu w komórkach linii DMBC12. Jednakże, w przypadku tej linii transfekcja była nieskuteczna, co mogło być spowodowane efektem letalnym dodatkowej mutacji dla komórek DMBC12.

Efekty edycji *RAB27B* ponownie badano metodą T7E1 (Rycina 15) oraz sekwencjonowaniem Sangera (Rycina 16 i 17). Krótsze odcinki DNA powstałe po trawieniu T7 endonukleazą I potwierdzają obecność mutacji typu insercja/delecja w miejscu docelowym genu *RAB27B* w komórkach linii A375 *RAB27A* KO. Najbardziej efektywnym sgRNA było sg1B. Pomimo wykrytych mutacji w kontroli pozytywnej w komórkach DMBC12 *RAB27B* KO, dwukrotna transfekcja sgRNA ukierunkowanym na gen *RAB27B* była nieskuteczna.



Rycina 15. Produkty PCR przed (-T7E1) i po (+T7E1) trawieniu endonukleazą I T7. SgNC - kontrola negatywna sgRNA, sgPC - kontrola pozytywna sgRNA, PC - kontrola pozytywna enzymu. sg1B-sg3B - sgRNA kierowane na gen *RAB27B*.

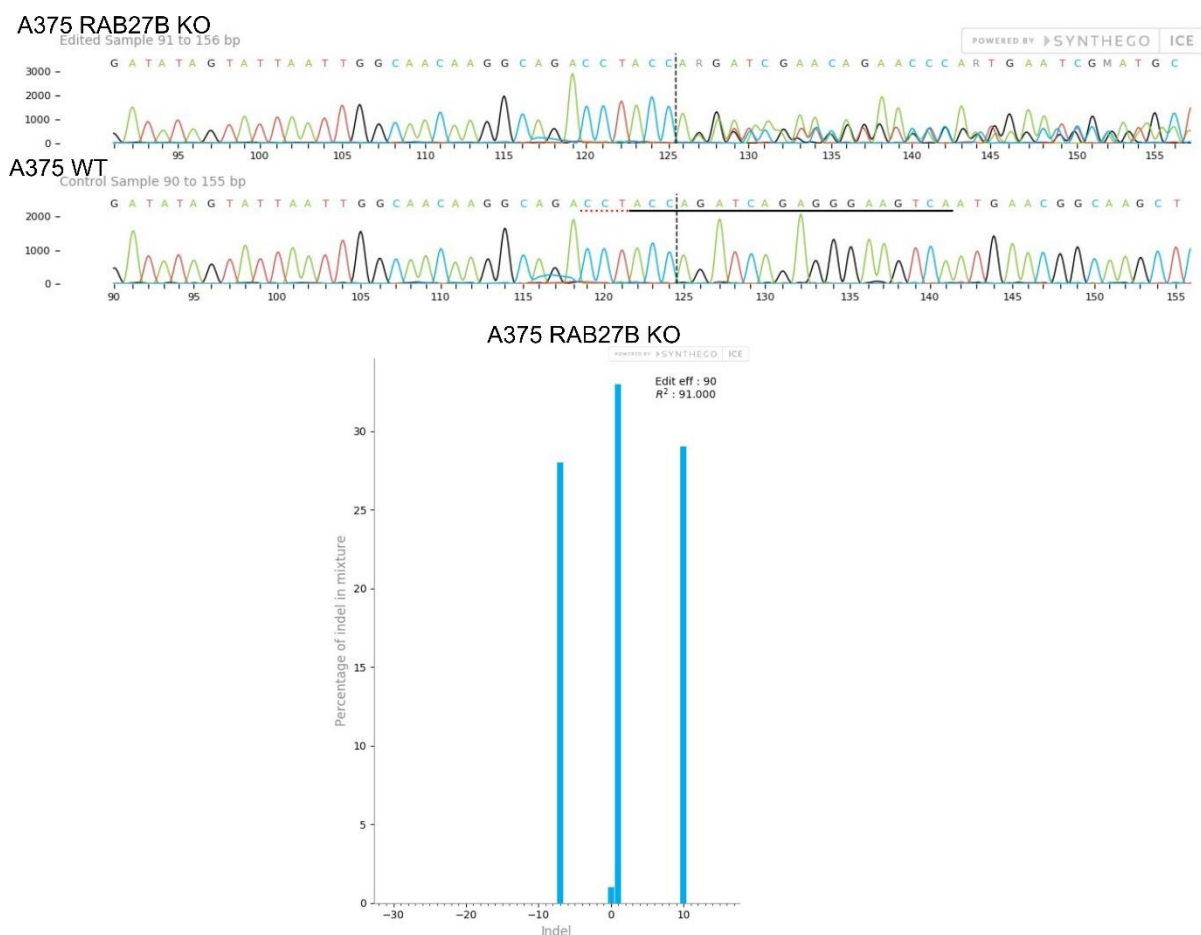
Po izolacji i ekspandowaniu klonów wywodzących się z pojedynczych komórek A375 *RAB27A/B* KO analizowano poziom *RAB27B* metodą Western blot aby potwierdzić uzyskanie nokautu. Klony w których nie wykryto białka były poddane sekwencjonowaniu Sangera, w celu potwierdzenia wystąpienia mutacji w miejscu docelowym. Wyniki sekwencjonowania w postaci elektroforegramów analizowano z użyciem programów komputerowych TIDE i ICE Synthego analogicznie jak opisano powyżej. Wyniki analizy sekwencji przedstawiono w tabeli 11. Do dalszych badań wybrano linię komórek o najwyższym odsetku puli komórek zmodyfikowanych, oznaczoną *. W wybranej linii część

komórek w mieszaninie posiadała delecje 7 nukleotydów, insercje 1 i/lub 10 nukleotydów. Obecne mutacje w miejscu cięcia oraz odsetek insercji/delecji w mieszaninie w klonie #1 przedstawiono na rycinach 16 i 17.

Tabela 11. Ocena wydajności edycji *RAB27B* w klonach linii A375 *RAB27A/B* KO.

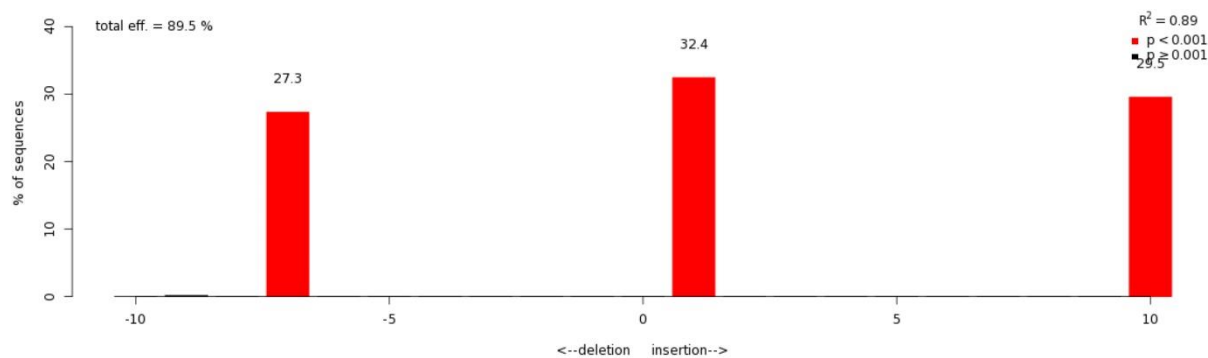
Klon	Wydajność met.	Wydajność met.
	TIDE	ICE Synthego
#1*	89,3%	90%
#2	33,2%	34%
#3	51,2%	89%
#4	55,7%	55%

Klon oznaczony '*' został wybrany do dalszych badań.



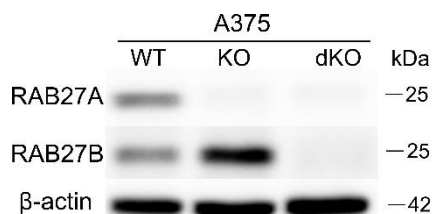
Rycina 16. Analiza mutacji typu insercja/delecja w linii A375 z nokautem *RAB27B* przeprowadzona w programie ICE Synthego.

A375 RAB27B KO



Rycina 17. Analiza mutacji typu insercja/delecja w linii A375 z nokautem RAB27B przeprowadzona w programie TIDE.

Ponowna analiza poziomu białka metodą Western blot w wybranym klonie #1 potwierdziła znaczące, wyciszenie RAB27B. Nokaut RAB27A spowodował zauważalny wzrost poziomu białka RAB27B (Rycina 18).



Rycina 18. Potwierdzenie wyciszenia *RAB27B* w linii A375 *RAB27A/B* KO na podstawie poziomu białka. Przedstawiono reprezentatywny Western blot z 3 niezależnych lizatów komórkowych.

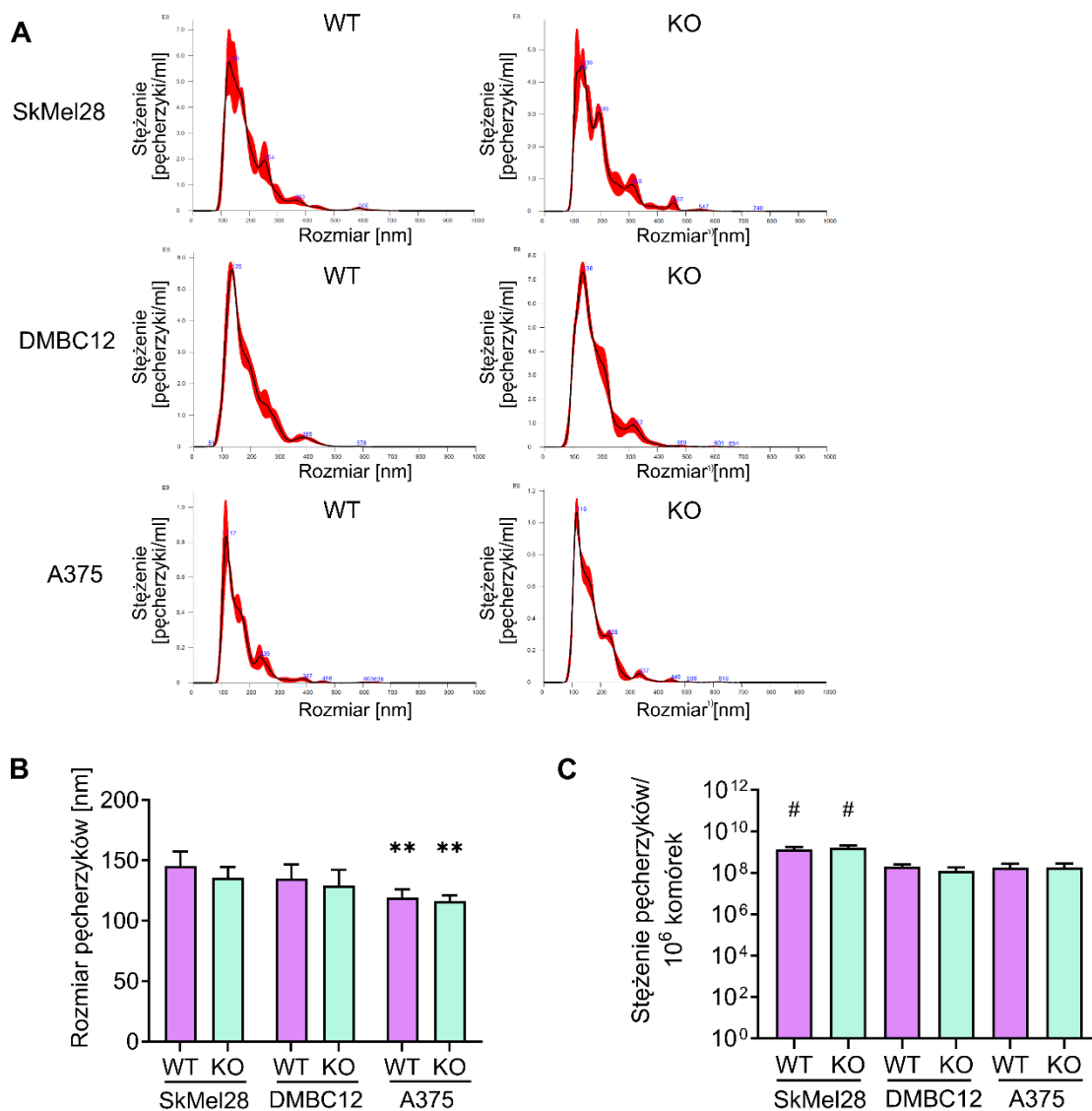
IV.2 Ocena udziału białek Rab27A i Rab27B w uwalnianiu sEVs przez ludzkie komórki czerniaka

Z danych literaturowych wiadomo, że RAB27A i RAB27B uczestniczą w regulacji wydzielania małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych przez komórki niezmięcone patologicznie, ale również przez komórki nowotworowe. A zatem wyciszenie tych genów hipotetycznie może prowadzić do zmiany w ilości i właściwościach uwalnianych sEVs. W niniejszej pracy porównano zdolność do wydzielania sEVs w ludzkich komórkach czerniaka linii A375, DMBC12 i SkMel28 typu dzikiego oraz z nokautem *RAB27A* lub *RAB27A/B*.

Liczbę i rozmiar sEVs zmierzono za pomocą metody NTA (Rycina 19). W zależności od linii komórkowej, ich średnia wielkość wahała się od ~119 do ~145 nm, co jest zgodne z charakterystycznymi wymiarami typowymi dla małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Średni rozmiar cząstek był porównywalny pomiędzy sEVs pochodzącymi od komórek typu dzikiego i *RAB27A* KO linii A375 i DMBC12. Komórki SkMel28 *RAB27A* KO wydawały się wydzielać mniejsze pęcherzyki, niż komórki typu dzikiego, jednak różnica nie osiągnęła istotności statystycznej ($p=0,25$). Średnica sEVs

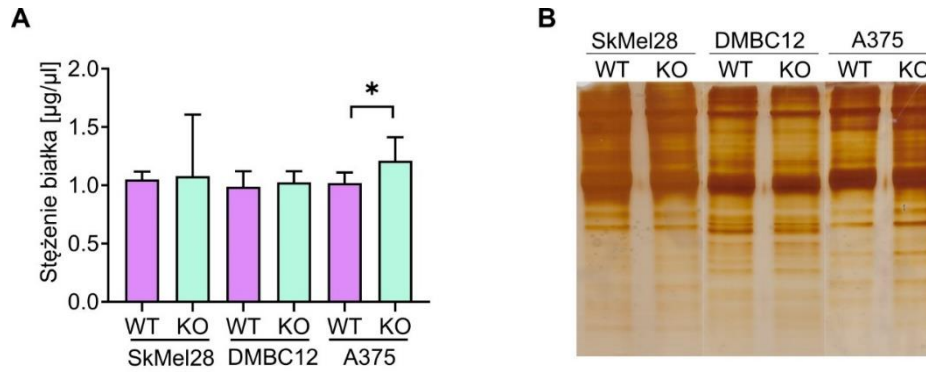
uwalnianych przez komórki A375 typu dzikiego i *RAB27A* KO była znacząco mniejsza w porównaniu do sEVs pochodzących z DMBC12 i SkMel28 typu dzikiego i *RAB27A* KO.

Analizując liczbę sEVs, w przeliczeniu na milion komórek je wydzielających, zauważono, że komórki linii SkMel28, typu dzikiego i *RAB27A* KO, uwalniają ich znacznie więcej w porównaniu do komórek A375 i DMBC12 typu dzikiego i *RAB27A* KO. Liczba małych pęcherzyków izolowanych z podłoża kondycjonowanego komórek typu dzikiego i *RAB27A* KO linii A375 (średnio $1,74-1,88 \times 10^8$ pęcherzyków/ 10^6 komórek) i SkMel28 (średnio $1,40-1,68 \times 10^9$ pęcherzyków/ 10^6 komórek) była podobna. Zaobserwowano mniej sEVs wydzielanych przez komórki DMBC12 *RAB27A* KO w porównaniu z typem dzikim, jednakże różnica ta nie była istotna statystycznie ($p=0,33$) (Rycina 19A, C).



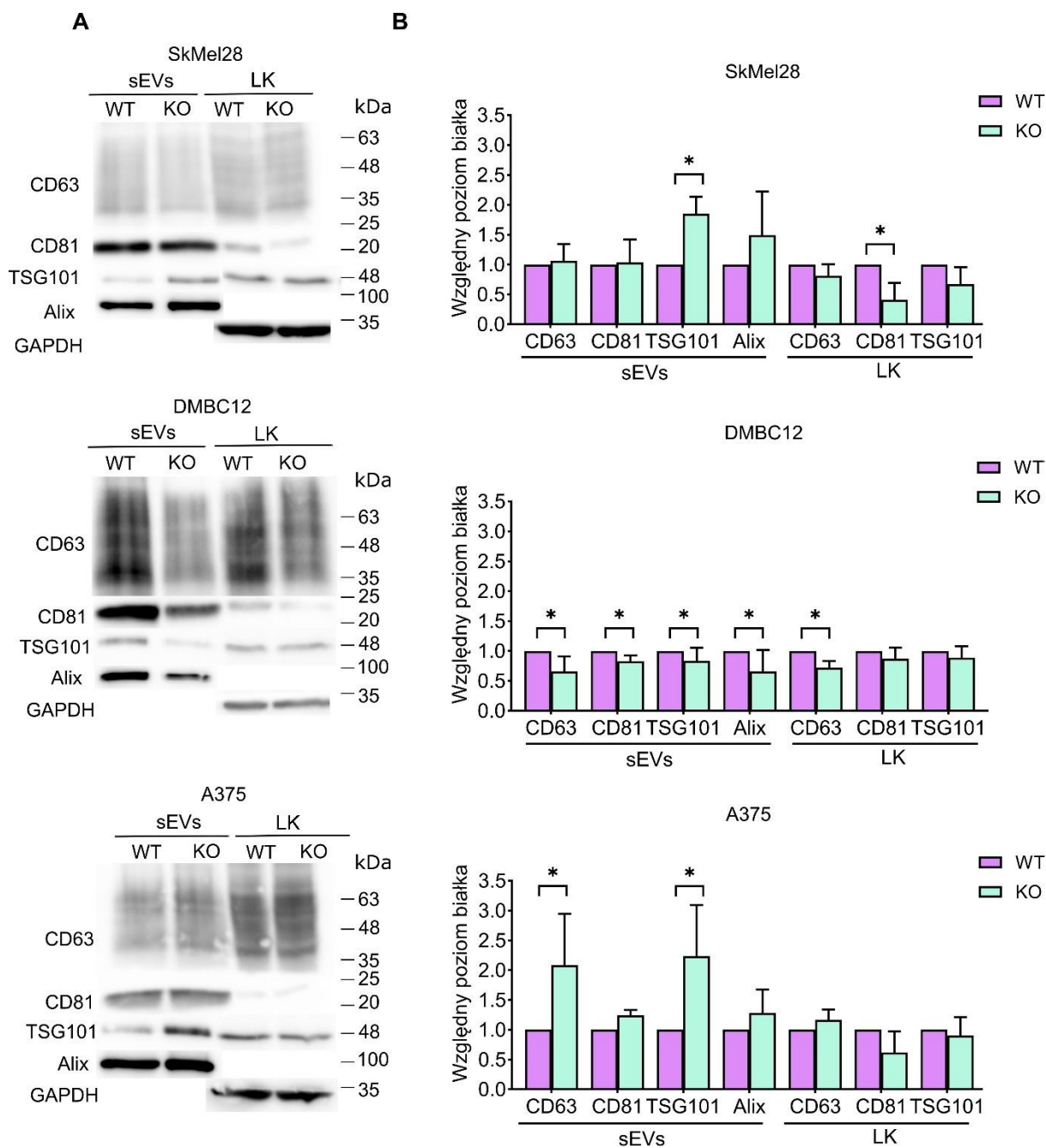
Rycina 19. Rozmiar oraz ilość wydzielanych sEVs przez komórki linii czerniaka analizowano za pomocą NTA. WT - typ dziki, KO - nokaut. (A) Przedstawiono reprezentatywne diagramy obrazujące rozkład wielkości sEVs oraz ich stężenie w 1 ml zawiesiny. Rozmiar (B) i stężenie (C) sEVs w przeliczeniu na 10⁶ komórek przedstawiono jako średnią ± SD, n≥4, ** sEVs WT i KO A375 vs. sEVs WT i KO SkMel28 i DMBC12, p<0,05. # sEVs WT i KO SkMel28 vs. sEVs WT i KO DMBC12 i A375, p<0,05.

Całkowite stężenie białka w małych pęcherzykach wydzielanych przez komórki WT i *RAB27A* KO linii SkMel28 i DMBC12, mierzone metodą BCA, było porównywalne. Jednak zawartość białka w sEVs pochodzących z komórek A375 *RAB27A* KO była znamienne wyższa niż w sEVs uwalnianych przez komórki typu dzikiego (Rycina 20A). Podobne wyniki otrzymano po wybarwieniu azotanem srebra białek pęcherzyków rozdzielonych w żelu poliakrylamidowym. Ponownie zaobserwowano proporcjonalną zawartość białka pomiędzy sEVs WT i KO dla linii SkMel28 i DMBC12 oraz zwiększoną ilość białka w sEVs z komórek A375 KO (Rycina 20B).



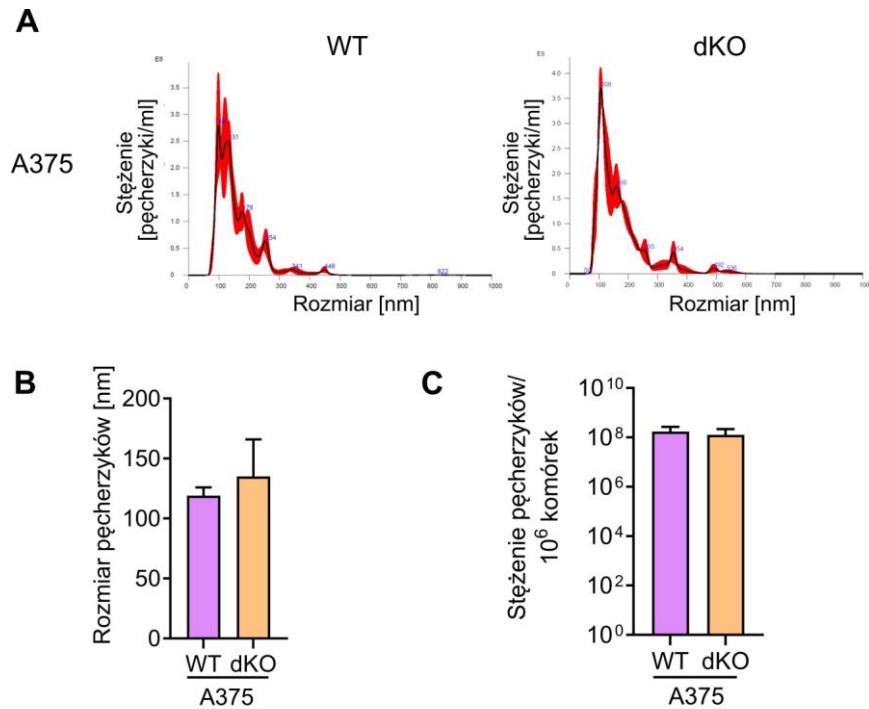
Rycina 20. Zawartość białka w sEVs komórek linii SkMel28, DMBC12 lub A375 typu dzikiego (WT) i *RAB27A* KO (KO). (A) Całkowite stężenie białka mierzono metodą BCA i wyniki przedstawiono jako średnią \pm SD (* $p < 0,05$, $n \geq 4$). (B) Ilość białka w sEVs oceniano także za pomocą barwienia azotanem srebra w żelu poliakrylamidowym. Przedstawiono reprezentatywny obraz żelu z 3 niezależnych analiz sEVs.

Następnie przeanalizowano poziom tetraspanin (CD63, CD81) i białek ESCRT (Alix i TSG101) w sEVs i lizatach komórkowych metodą Western blot (Rycina 21). Poziomy CD63 i CD81 wykryte w sEVs z komórek WT i *RAB27A* KO linii SkMel28 były zbliżone, podczas gdy ilość TSG101 była znacząco zwiększona. Niewielki wzrost Alix w sEVs z SkMel28 *RAB27A* KO nie był istotny statystycznie. Poziom tetraspaniny CD81 był obniżony w komórkach SkMel28 *RAB27A* KO, podczas gdy pozostałe markery w lizatach komórkowych były na porównywalnym poziomie. W sEVs wydzielanych przez komórki DMBC12 *RAB27A* KO zaobserwowano znamienne niższą ekspresję CD63, CD81, Alix i TSG101, w stosunku do sEVs pochodzących z komórek WT. Mniejsza ilość CD63 została również wykryta w komórkach DMBC12 *RAB27A* KO, w porównaniu do komórek typu dzikiego, podczas gdy inne markery pozostały na podobnym poziomie. W przypadku sEVs uwalnianych przez komórki A375 *RAB27A* KO zauważono znaczący wzrost ilości CD63 i TSG101, ale poziom pozostałych markerów pozostał niezmienny, porównując z sEVs komórek dzikich tej samej linii. Intensywność sygnału białek CD63, CD81 i TSG101 była zbliżona w komórkach A375 WT i *RAB27A* KO. Poziom białka Alix w lizatach komórkowych wszystkich badanych linii był na granicy detekcji, co nie pozwoliło na jego właściwą analizę densytometryczną.



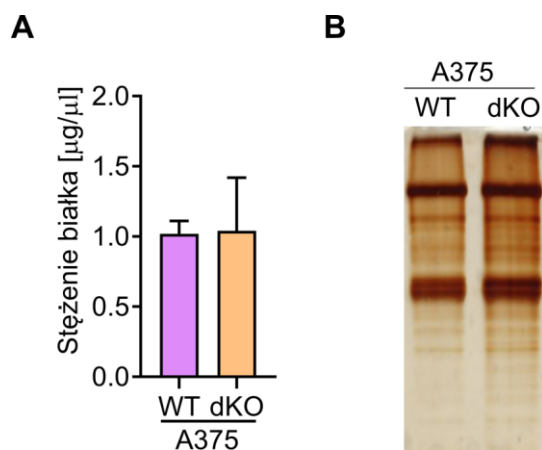
Rycina 21. Poziom białek CD63, CD81, Alix i TSG101 w sEVs i lizatach komórkowych (LK) linii SkMel28, DMBC12 lub A375 typu dzikiego (WT) i *RAB27A* KO (KO). Równą ilość białka z lizatów komórkowych lub równą objętość sEVs analizowano metodą Western blot. (A) Reprezentatywny Western blot (B) Analiza densytometryczna intensywności sygnału, dane przedstawiono jako wartości średnie \pm SD (* $p < 0,05$, $n \geq 6$). Wyniki normalizowano do wartości dla komórek typu dzikiego danej linii.

Aby zbadać czy wyciszenie ekspresji obu izoform RAB27 wpłynie na liczbę i cechy uwalnianych małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych analizowano sEVs wydzielane przez komórki A375 z podwójnym KO *RAB27A/B*. Zaobserwowano, że ich wielkość oraz liczba była porównywalna z sEVs uwalnianymi przez komórki typu dzikiego (Rycina 22A,B,C).



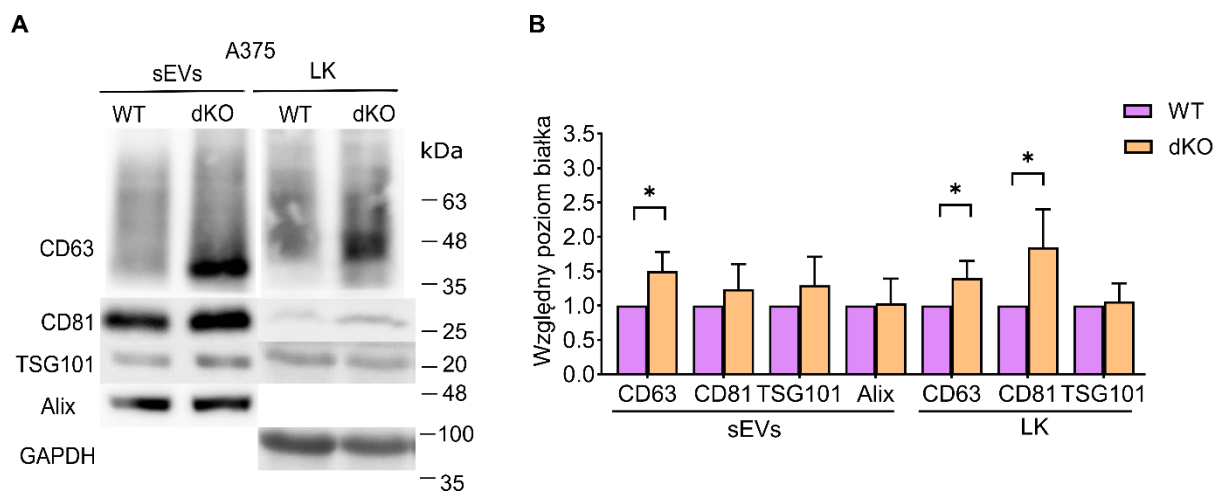
Rycina 22. Rozmiar oraz ilość wydzielanych sEVs przez komórki linii A375 typu dzikiego (WT) i *RAB27A/B* KO (dKO) analizowano za pomocą NTA. (A) Przedstawiono reprezentatywne diagramy obrazujące rozkład wielkości sEVs oraz ich stężenie w 1 ml zawiesiny. (B) Rozmiar i (C) stężenie sEVs w przeliczeniu na 10⁶ komórek przedstawiono jako średnią \pm SD (n=4).

Całkowite stężenie białka, mierzone metodą BCA, w sEVs uwalnianych przez komórki A375 *RAB27A/B* KO było wyższe, jednak różnica nie osiągnęła istotności statystycznej. Ilość białka wybarwionego srebrem po rozdziale w żelu poliakrylamidowym również była większa w sEVs pochodzących z komórek dKO (Rycina 23).



Rycina 23. Zawartość białka w sEVs komórek linii A375 typu dzikiego (WT) i *RAB27A/B* KO (dKO). (A) Całkowite stężenie białka oceniano metodą BCA i wyniki przedstawiono jako średnią \pm SD (* $p < 0,05$, $n=4$). (B) Ilość białka w sEVs oceniano także za pomocą barwienia srebrem w żelu poliakrylamidowym. Przedstawiono reprezentatywny obraz żelu z 3 niezależnych analiz sEVs.

Przeanalizowano także poziom białek charakterystycznych dla małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w lizatach oraz sEVs uwalnianych przez komórki A375 z podwójnym nokautem *RAB27A/B* (Rycina 24). Ponownie poziom CD63 był podwyższony w sEVs uwalnianych z komórek A375 dKO. Natomiast w przeciwieństwie do pojedynczego KO, ilość TSG101 w sEVs wydzielanych przez komórki A375 dKO nie była większa względem sEVs pochodzących z komórek WT. Zaobserwowano również wzrost poziomu CD63 i CD81 w lizatach komórkowych A375 *RAB27A/B* KO. Intensywność sygnału pozostałych markerów w lizatach komórkowych i w sEVs była porównywalna pomiędzy komórkami WT i dKO.



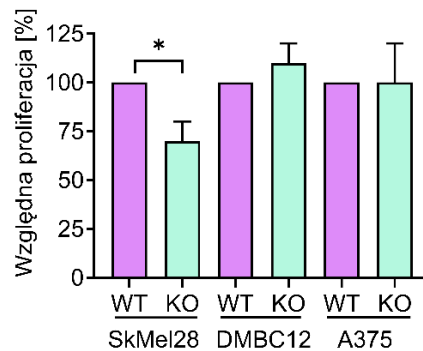
Rycina 24. Poziom białek CD63, CD81, Alix, TSG101 w sEVs i lizatach komórkowych (LK) linii A375 typu dzikiego (WT) i z *RAB27A/B* KO (dKO). Równą ilość białka z lizatów komórkowych lub równą objętość sEVs analizowano metodą Western blot. (A) Reprezentatywny Western blot (B) Analiza densytometryczna intensywności sygnału, dane przedstawiono jako wartości średnie \pm SD (* $p < 0,05$, $n \geq 6$). Wyniki normalizowano do wartości dla komórek typu dzikiego.

Podsumowując, opisane powyżej wyniki wskazują, że *RAB27A* nie wpływa bezpośrednio na liczbę sEVs wydzielanych przez komórki badanych linii ludzkiego czerniaka (A375, DMBC12 i SkMel28), niezależnie od jego wyjściowego/bazowego poziomu. Co ciekawe, utrata *RAB27A* prowadzi do istotnych zmian w zawartości białek w sEVs, jednakże nie zaobserwowano jednoznacznej tendencji w modyfikacji składu białkowego pęcherzyków. Zmiany ilościowe w zawartości charakterystycznych dla pęcherzyków markerów wywołane wyciszeniem *RAB27A* ściśle zależą od rodzaju linii komórkowej. Ponadto, powyższe dane wskazują, że dodatkowe wyciszenie *RAB27B* w komórkach A375 *RAB27A* KO nie modyfikuje znacząco wydzielania małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych i ich zawartości.

IV.3. Analiza aktywności funkcjonalnej komórek czerniaka dzikich i z nokautem *RAB27*

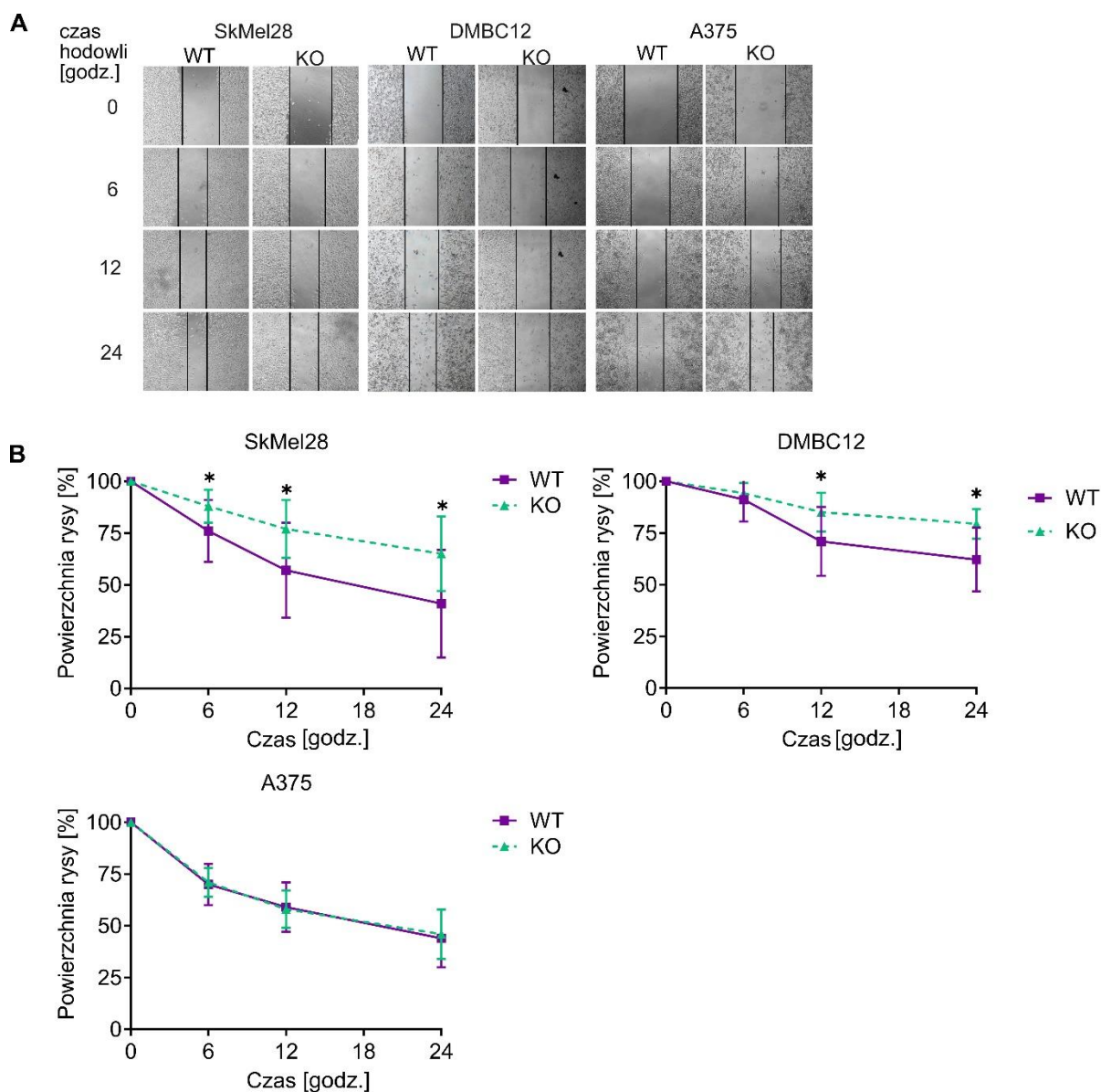
IV.3.1. Ocena proliferacji, migracji i inwazji komórek

Charakterystykę otrzymanych komórek czerniaka z wyciszeniem *RAB27A* lub *RAB27A/B* KO rozpoczęto od analizy ich proliferacji. Wyniki przedstawione na rycinie 25 pokazują, że spośród trzech badanych linii jedynie proliferacja komórek SkMel28 *RAB27A* KO była zahamowana w porównaniu do komórek WT.



Rycina 25. Proliferacja komórek linii SkMel28, DMBC12 oraz A375, typu dzikiego (WT) i *RAB27A* KO (KO). Wyniki były normalizowane względem wartości dla komórek typu dzikiego danej linii. Wartości przedstawiono jako średnią \pm SD (* $p < 0,05$, $n = 3$).

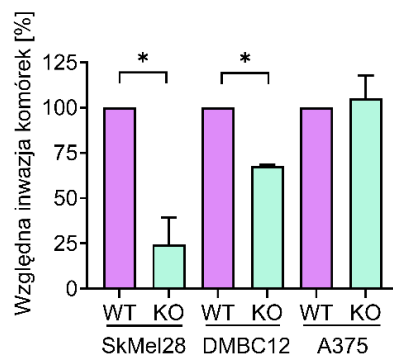
Kolejny etap badań polegał na ocenie dwuwymiarowej migracji komórek za pomocą testu zarastania rysy. Wyniki zaprezentowane na rycinie 26 pokazują, że migracja komórek *RAB27A* KO linii DMBC12 i SkMel28 była znacząco wolniejsza, w porównaniu do odpowiadających im kontroli. Natomiast komórki *RAB27A* KO A375 zarastały rysę w tempie zbliżonym do komórek typu dzikiego.



Rycina 26. Migracja komórek linii SkMel28, DMBC12 oraz A375, typu dzikiego (WT) i *RAB27A* KO (KO). (A) Reprezentatywny obraz mikroskopowy przedstawiający zarastanie rysy. (B) Powierzchnia rysy została zmierzona w różnych punktach czasowych i normalizowana do powierzchni początkowej w czasie 0. Dane przedstawiono jako wartości średnie (\pm SD) (* WT vs KO, $p < 0,05$, $n \geq 4$).

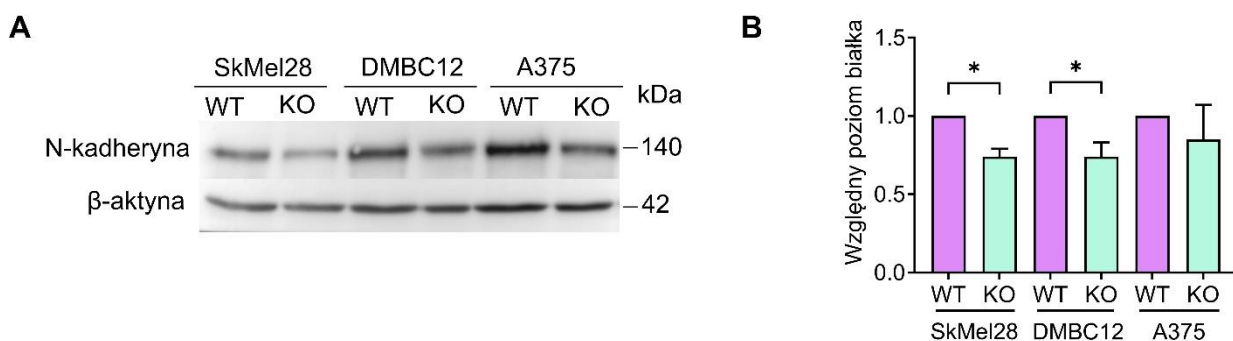
W celu uzyskania pełniejszego obrazu inwazyjnego fenotypu komórek czerniaka, przeanalizowano ich zdolność do inwazji przez warstwę białek macierzy zewnątrzkomórkowej (Rycina 27). Zaobserwowano znaczący spadek liczby komórek *RAB27A* KO linii DMBC12 i SkMel28 przechodzących przez membranę pokrytą białkami ECM w porównaniu do komórek typu dzikiego. Obserwacja ta jak również dane z zarastania rysy wskazują, że potencjał migracyjny i inwazyjny komórek DMBC12 i SkMel28 istotnie zależy od obecności białka *RAB27A*. Jednakże, w przypadku

komórek A375 wyciszenie RAB27A nie zahamowało ich zdolności do degradacji białek macierzy zewnątrzkomórkowej i migracji w kierunku czynnika chemotaktycznego jakim był FBS.



Rycina 27. Inwazja komórek linii SkMel28, DMBC12 oraz A375 typu dzikiego (WT) i RAB27A KO (KO) przez białka macierzy zewnątrzkomórkowej. Wyniki były normalizowane względem wartości dla komórek typu dzikiego danej linii. Dane przedstawiono jako wartości średnie (\pm SD), * $p < 0,05$, $n \geq 4$.

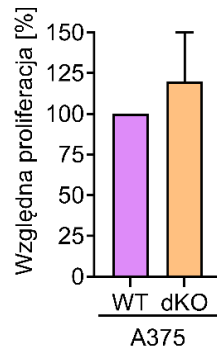
W kolejnym etapie pracy oceniono ilość N-kadheryny, markera mezenchymalnego, metodą Western blot (Rycina 28). Niższe poziomy tego białka zaobserwowano w komórkach RAB27A KO linii DMBC12 i SkMel28, co dodatkowo sugeruje, że RAB27A uczestniczy w regulacji inwazyjności tych linii komórkowych. Widoczny na zdjęciu Western blot obniżony poziom N-kadheryny w komórkach A375 KO nie był statystycznie znamiennej.



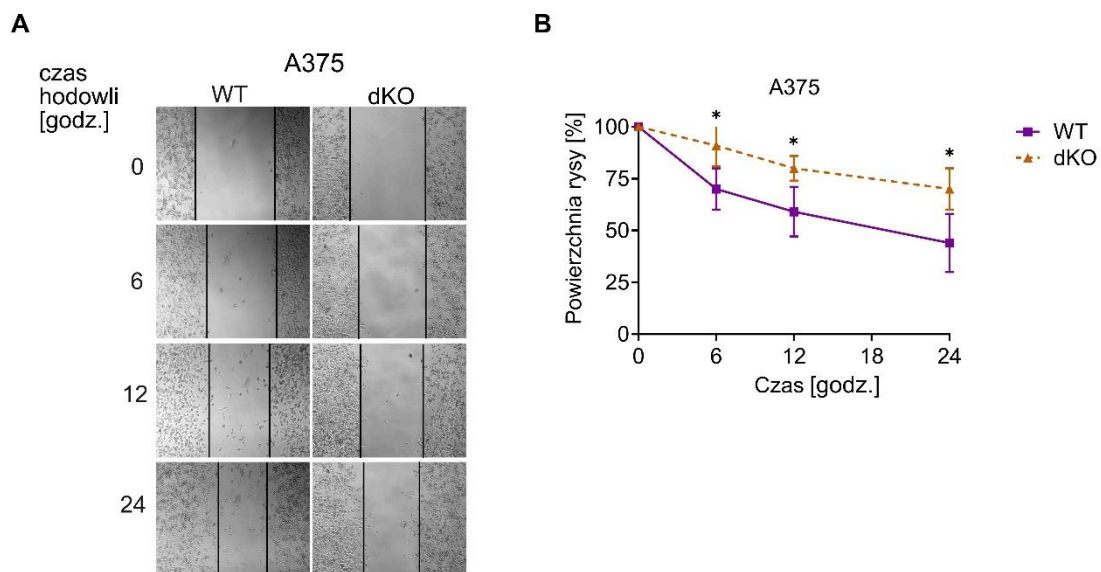
Rycina 28. Poziom N-kadheryny w lisatach komórkowych linii SkMel28, DMBC12 oraz A375, typu dzikiego (WT) i RAB27A KO (KO) oceniono metodą Western blot. (A) Reprezentatywny Western blot. (B) Analiza densytometryczna intensywności sygnału, dane przedstawiono jako wartości średnie \pm SD (* $p < 0,05$, $n \geq 4$). Wyniki były normalizowane względem wartości dla komórek typu dzikiego danej linii.

Otrzymane wyniki wskazują, że RAB27A jest zaangażowany w proces migracji i inwazji komórek linii DMBC12 i SkMel28, ale nie linii A375, co sugeruje, że jego potencjalna rola w promowaniu powstawania przerzutów przez komórki czerniaka jest ściśle zależna od ich rodzaju. Ze względu na brak znaczącego wpływu wyciszenia ekspresji RAB27A na funkcjonowanie komórek linii A375 zbadano proliferację, migrację i inwazję komórek A375 z podwójnym KO RAB27A/B. Podobnie jak w przypadku

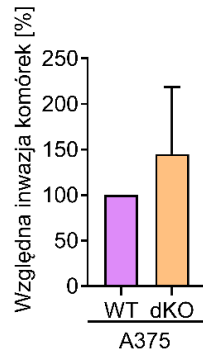
pojedynczego KO, utrata obu izoform RAB27 nie wpłynęła na proliferację komórek A375, co przedstawiono na rycinie 29. Zaobserwowano jednak istotne zmniejszenie tempa migracji komórek A375 z podwójnym KO *RAB27A/B* (Rycina 30). Mimo to zdolność do inwazji przez warstwę macierzy zewnątrzkomórkowej nie została zmieniona (Rycina 31).



Rycina 29. Proliferacja komórek linii A375 typu dzikiego (WT) i *RAB27A/B* dKO (dKO). Wyniki były normalizowane względem wartości dla komórek typu dzikiego. Wartości przedstawiono jako średnią \pm SD (* $p < 0,05$, $n=3$).

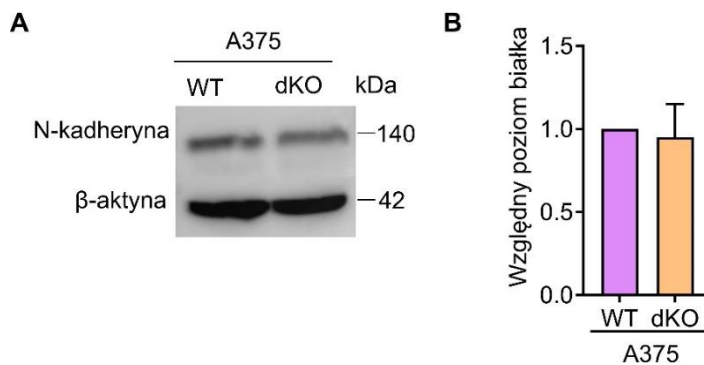


Rycina 30. Migracja komórek linii A375, typu dzikiego (WT) i *RAB27A/B* dKO (dKO). (A) Reprezentatywny obraz mikroskopowy przedstawiający zarastanie rasy. (B) Powierzchnia rasy została zmierzona w różnych punktach czasowych i normalizowana do powierzchni początkowej w czasie 0. Dane przedstawiono jako wartości średnie (\pm SD) (* WT vs KO, $p < 0,05$, $n=4$).



Rycina 31. Inwazja komórek linii A375 typu dzikiego (WT) i *RAB27A/B* dKO (dKO) przez białka macierzy zewnątrzkomórkowej. Wyniki były normalizowane względem wartości dla komórek typu dzikiego. Dane przedstawiono jako wartości średnie (\pm SD) (* $p < 0,05$, $n=4$).

Oceniono także poziom markera mezenchymalnego, N-kadheryny, metodą Western blot (Rycina 32). Poziom białka był porównywalny w komórkach linii A375 *RAB27A/B* KO z komórkami typu dzikiego.

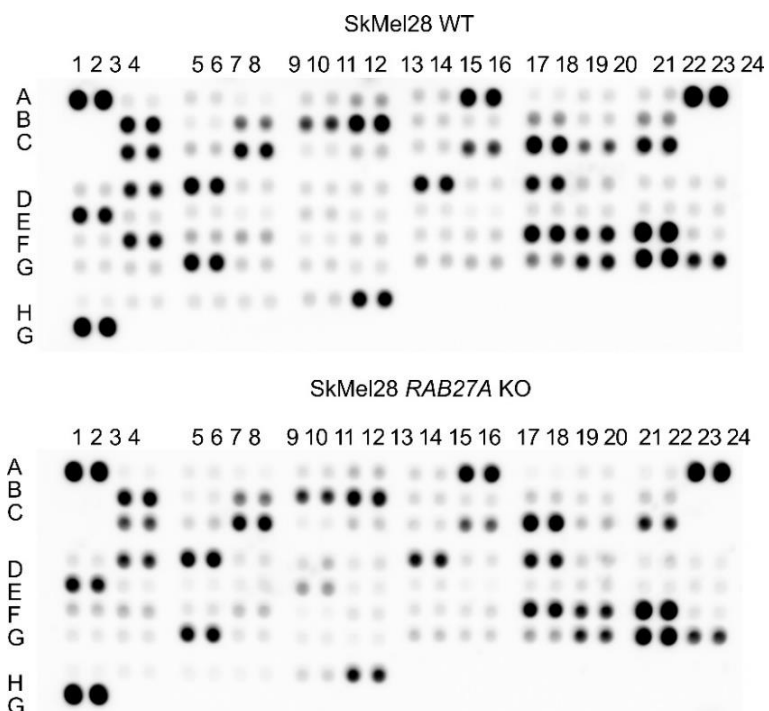


Rycina 32. Poziom N-kadheryny w lizatach komórkowych linii A375, typu dzikiego (WT) i *RAB27A/B* dKO (dKO) oceniono metodą Western blot. (A) Reprezentatywny Western blot. (B) Analiza densytometryczna intensywności sygnału, dane przedstawiono jako wartości średnie \pm SD (* $p < 0,05$, $n=4$). Wyniki były normalizowane względem wartości dla komórek typu dzikiego.

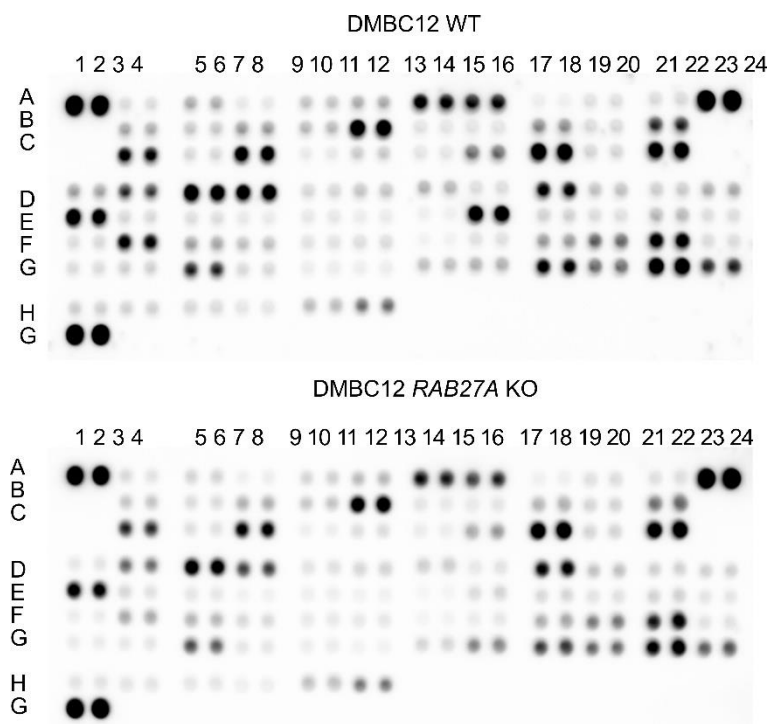
Podsumowując, brak obu izoform białka RAB27 w komórkach linii A375 hamuje ich zdolność do migracji, ale ich proliferacja oraz inwazja macierzy zewnątrzkomórkowej pozostają niezmiennie.

IV.3.2. Profil proteomiczny onkoprotein

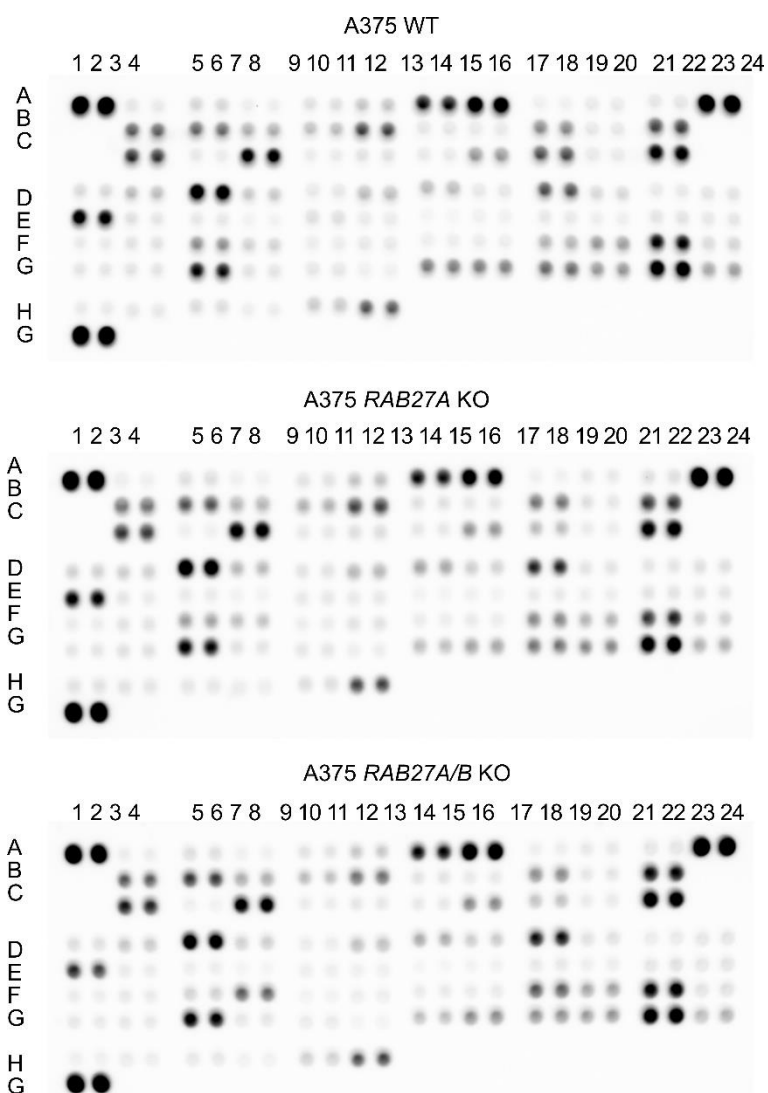
Aby sprawdzić potencjalne różnice w poziomie wewnątrzkomórkowych białek zaangażowanych w nowotworzenie i/lub progresję nowotworową w liniach czerniaka WT i KO przeprowadzono ich analizę z wykorzystaniem testu Proteome Profiler zawierającego membrany z naniesionymi 84 przeciwciałami w duplikatach (Rycina 33A,B,C).



Rycina 33A. Obraz membran Proteome Profiler Array przedstawiający intensywność sygnału białek w lizatach komórkowych linii SkMel28 typu dzikiego (WT) i z nokautem (KO) *RAB27A*.



Rycina 33B. Obraz membran Proteome Profiler Array przedstawiający intensywność sygnału białek w lizatach komórkowych linii DMBC12 typu dzikiego (WT) i z nokautem (KO) *RAB27A*.



Rycina 33C. Obraz membran Proteome Profiler Array przedstawiający intensywność sygnału białek w lizatach komórkowych linii A375 typu dzikiego (WT) i z nokautem (KO) *RAB27A* lub *RAB27A/B*.

Analiza densytometryczna intensywności sygnału punktów na membranach wykazała znaczące różnice w poziomie białek w lizatach pochodzących z komórek *RAB27A* KO lub *RAB27A/B* KO w stosunku do komórek typu dzikiego. Do analizy wybrano białka, których sygnał przekraczał wartość 3000 OD, a różnica pomiędzy WT, a KO wynosiła co najmniej 20% (Tabela 12). Następnie pogrupowano białka według ich funkcji (Rycina 34). Białka ulegające zwiększonej lub zmniejszonej ekspresji posiadają różne funkcje, począwszy od cząsteczek adhezyjnych, przez regulatory angiogenezy, odpowiedzi immunologicznej, EMT, składników ECM czy proteaz oraz ich inhibitorów. Znaczące różnice zaobserwowano także w białkach sygnałowych, uczestniczących w procesach apoptozy, regulacji cyklu komórkowego czy receptorów kinaz.

Porównując komórki WT i KO zaobserwowano, że w linii SkMel28 *RAB27A* KO nastąpiło obniżenie poziomu 62 białek oraz podwyższenie poziomu 2 białek. W komórkach DMBC12 *RAB27A* KO obserwowano zmniejszoną ilość 42 białek i zwiększoną ilość 1 białka. Z kolei w komórkach KO linii A375

poziom 13 białek był obniżony, a 8 białek podwyższony. Do białek, których poziom był obniżony we wszystkich trzech badanych liniach czerniaka z wyciszeniem ekspresji *RAB27A* należą: dekoryna, FOXO1, serpina 5, tenascyna C i urokinaza. W przypadku białek GM-CSF, HIF1 α , HNF-3 β i MMP3 ich ilość była obniżona w komórkach KO linii SkMel28 i DMBC12, natomiast zwiększona w komórkach KO linii A375. Z kolei poziom kallikreiny 6 był wyższy tylko w komórkach KO SkMel28, a niższy w pozostałych dwóch liniach. Odwrotna sytuacja wystąpiła w przypadku serpiny E1, jej ilość była mniejsza w komórkach KO SkMel28, a większa w komórkach KO DMBC12 i A375. Istotne zmiany wystąpiły także w poziomie receptorów z rodziny HER. W komórkach KO linii SkMel28 i DMBC12 obniżony był poziom EGFR i HER2, z kolei w komórkach KO linii A375 pojawił się znaczący spadek poziomu HER3.

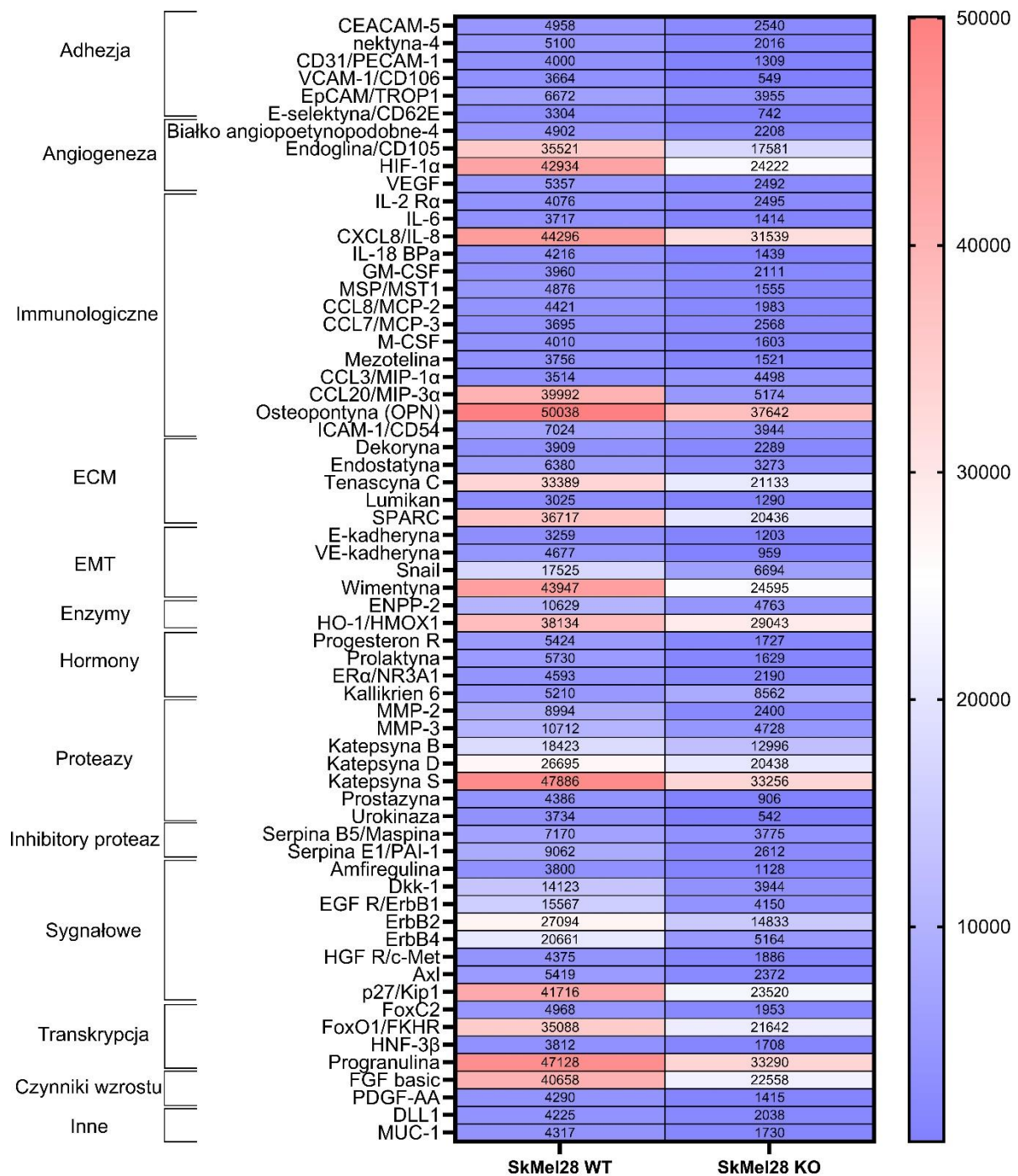
Tabela 12. Różnice pomiędzy poziomem białek w liszaczach pochodzących z komórek SkMel28, DMBC12, A375 typu dzikiego (WT) i *RAB27A* KO (KO).

Punkt	Białko	SkMel28 KO/ SkMel28 WT	DMBC28 KO/ DMBC28 WT	A375 KO/ A375 WT
A1,A2	Punkty referencyjne	0%	-11%	-1%
A3,A4	α -fetoproteina		-18%	40%
A5,A6	Amfiregulina	-70%	-52%	-18%
A9,A10	Białko angiopoetynopodobne 4	-55%	-29%	-3%
A11,A12	ENPP-2/autotaksyna	-55%	-23%	8%
A13,A14	Axl	-56%	-18%	-6%
A15,A16	BCL-x	-16%	-27%	-9%
A19,A20	E-kadheryna	-63%	0%	
A21,A22	VE-kadheryna	-79%	-19%	17%
A23,A24	Punkty referencyjne	-11%	-7%	2%
B3,B4	CapG	-15%	-24%	4%
B5,B6	Anhydraza węglanowa IX		-31%	14%
B7,B8	Katepsyna B	-29%	-15%	23%
B9,B10	Katepsyna D	-23%	-13%	19%
B11,12	Katepsyna S	-31%	-8%	7%
B13,14	CEACAM-5	-49%	-43%	3%
B15,16	Dekoryna	-41%	-50%	-20%
B17,18	Dkk-1	-72%	-41%	12%
B19,20	DLL1	-52%	-11%	2%
B21,22	EGF R/ErbB1	-73%	-30%	3%
C3,4	Endogлина/CD105	-51%	-21%	2%
C5,6	Endostatyna	-49%	-25%	
C11,12	EpCAM/TROP1	-41%	-50%	12%
C13,14	ER α /NR3A1	-52%	-43%	
C15,16	ErbB2	-45%	-40%	-6%
C17,18	ErbB3/Her3	-8%	-4%	-70%

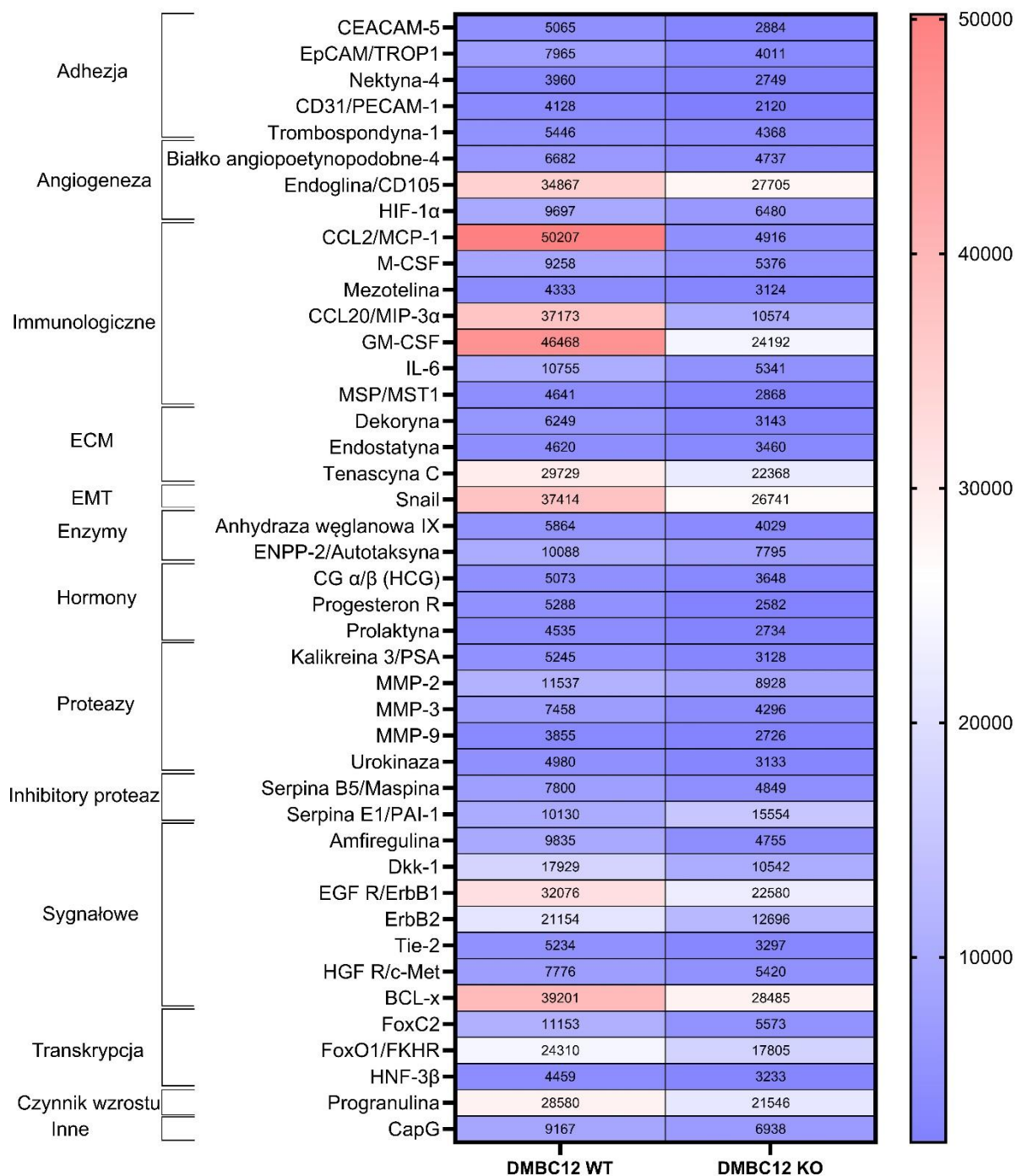
C19,20	ErbB4	-75%	-9%	
C21,22	FGF basic	-45%	2%	7%
D1,2	FoxC2	-61%	-50%	17%
D3,4	FoxO1/FKHR	-38%	-27%	-33%
D7,8	GM-CSF	-47%	-48%	33%
D9,10	CG α/β (HCG)	7%	-28%	5%
D11,12	HGF R/c-Met	-57%	-30%	2%
D13,14	HIF-1 α	-44%	-33%	23%
D15,16	HNF-3 β	-55%	-27%	75%
D17,18	HO-1/HMOX1	-24%	2%	17%
D19,20	ICAM-1/CD54	-44%	-8%	-36%
D21,222	IL-2 R α	-39%	-17%	
D23,24	IL-6	-62%	-50%	10%
E1,2	CXCL8/IL-8	-29%	-18%	-11%
E3,4	IL-18 Bpa	-66%	-6%	-25%
E5,6	Kalikreina 3/PSA	-74%	-40%	-9%
E7,8	Kalikreina 5		-50%	
E9,10	Kalikreina 6	64%	-34%	-39%
E13,14	Lumikan	-57%		
E15,16	CCL2/MCP-1		-90%	
E17,18	CCL8/MCP-2	-55%	-18%	-17%
E19,20	CCL7/MCP-3	-30%	-15%	-16%
E21,22	M-CSF	-60%	-42%	-5%
E23,24	Mezotelina	-59%	-28%	0%
F1,2	CCL3/MIP-1 α	28%	-53%	
F3,4	CCL20/MIP-3 α	-87%	-72%	-8%
F5,6	MMP-2	-73%	-23%	-7%
F7,8	MMP-3	-56%	-42%	35%
F9,10	MMP-9		-29%	
F11,12	MSP/MST1	-68%	-38%	13%
F13,14	MUC-1	-60%		
F15,16	Nektyna-4	-60%	-31%	
F17,18	Osteopontyna (OPN)	-25%	-14%	59%
F19,20	p27/Kip1	-44%	-17%	-34%
F21,22	p53	-13%	-11%	-21%
F23,24	PDGF-AA	-67%	-15%	5%
G1,2	CD31/PECAM-1	-67%	-49%	-8%
G3,4	Progesteron R/NR3C3	-68%	-51%	6%
G5,6	Progranulina	-29%	-25%	-2%
G7,8	Prolaktyna	-72%	-40%	-9%
G9,10	Prostazyna/Prss8	-79%		-12%
G11,12	E-selektyna/CD62E	-78%		
G13,14	Serpina B5/maspina	-47%	-38%	-57%
G15,16	Serpina E1/PAI-1	-71%	54%	-34%
G17,18	Snail	-62%	-29%	-15%

G19,20	SPARC	-44%	-9%	4%
G21,22	Surwiwina	-15%	-19%	-1%
G23,24	Tenascyna C	-37%	-25%	-23%
H1,2	Trombospondyna-1		-20%	70%
H3,4	Tie-2		-37%	12%
H5,6	Urokinaza	-85%	-37%	-31%
H7,8	VCAM-1/CD106	-85%	-37%	
H9,10	VEGF	-53%	-1%	-42%
H11,12	Wimentyna	-44%	-13%	12%
I1,2	Punkty referencyjne	7%	-3%	1%

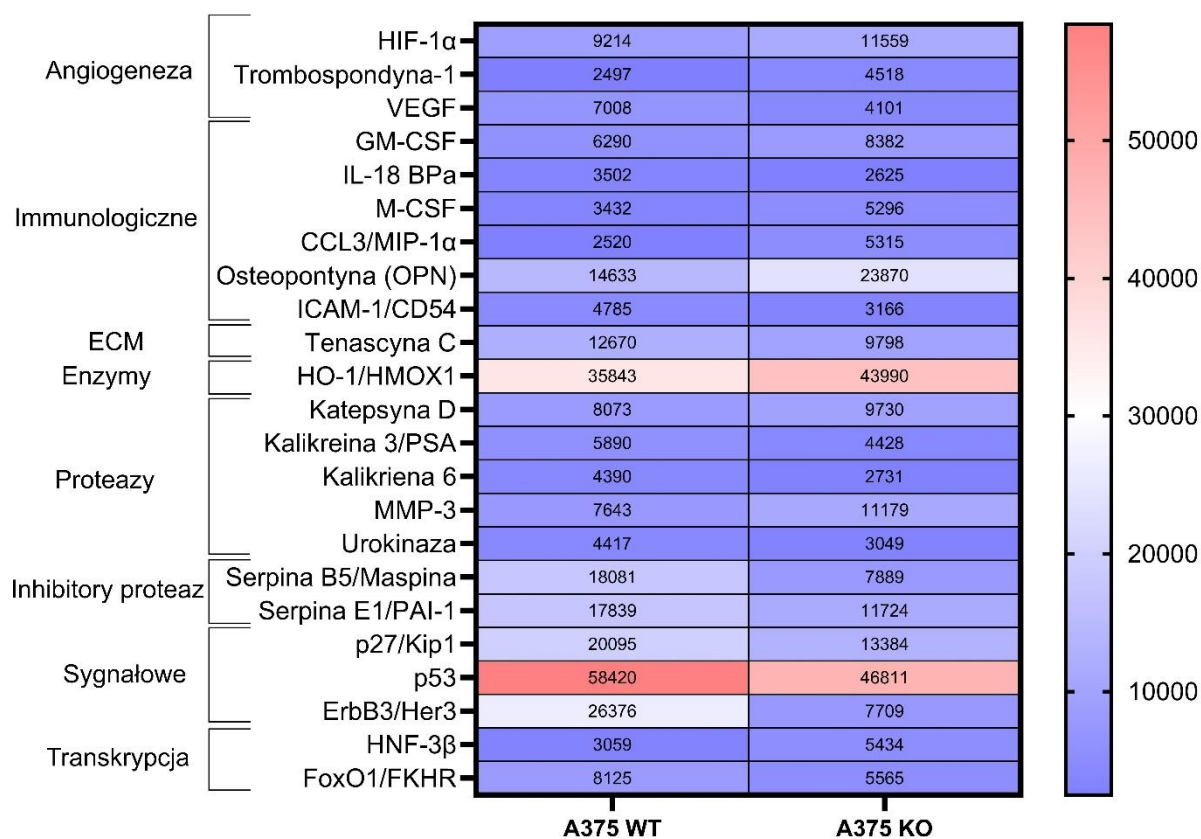
Wyniki przedstawiono jako procentową różnicę pomiędzy średnią OD z dwóch replikatów technicznych lizatów z komórek KO w stosunku do lizatów z komórek typu dzikiego. W tabeli uwzględniono białka, których wartość $OD \geq 3000$. Na czerwono zaznaczono wzrost poziomu białka $\geq 20\%$, a na niebiesko spadek poziomu białka $\geq 20\%$.



Rycina 34A. Poziom białek w lizatach komórkowych SkMel28 typu dzikiego (WT) i *RAB27A* KO (KO). Białka grupowano według ich funkcji. Wyniki przedstawiono jako średnią z analizy densytometrycznej dwóch replikatów technicznych. Na wykresach uwzględniono białka, których wartość OD ≥ 3000 , a różnica pomiędzy typem dzikim, a KO wynosiła $\geq 20\%$.



Rycina 34B. Poziom białek w lizatach komórkowych DMBC12 typu dzikiego (WT) i *RAB27A* KO (KO). Białka grupowano według ich funkcji. Wyniki przedstawiono jako średnią z analizy densytometrycznej dwóch replikatów technicznych. Na wykresach uwzględniono białka, których wartość OD ≥ 3000 , a różnica pomiędzy typem dzikim, a KO wynosiła $\geq 20\%$.



Rycina 34C. Poziom białek w lizatach komórkowych A375 typu dzikiego (WT) i *RAB27A* KO (KO). Białka grupowano według ich funkcji. Wyniki przedstawiono jako średnią z analizy densytometrycznej dwóch replikatów technicznych. Na wykresach uwzględniono białka, których wartość OD ≥ 3000 , a różnica pomiędzy typem dzikim, a KO wynosiła $\geq 20\%$.

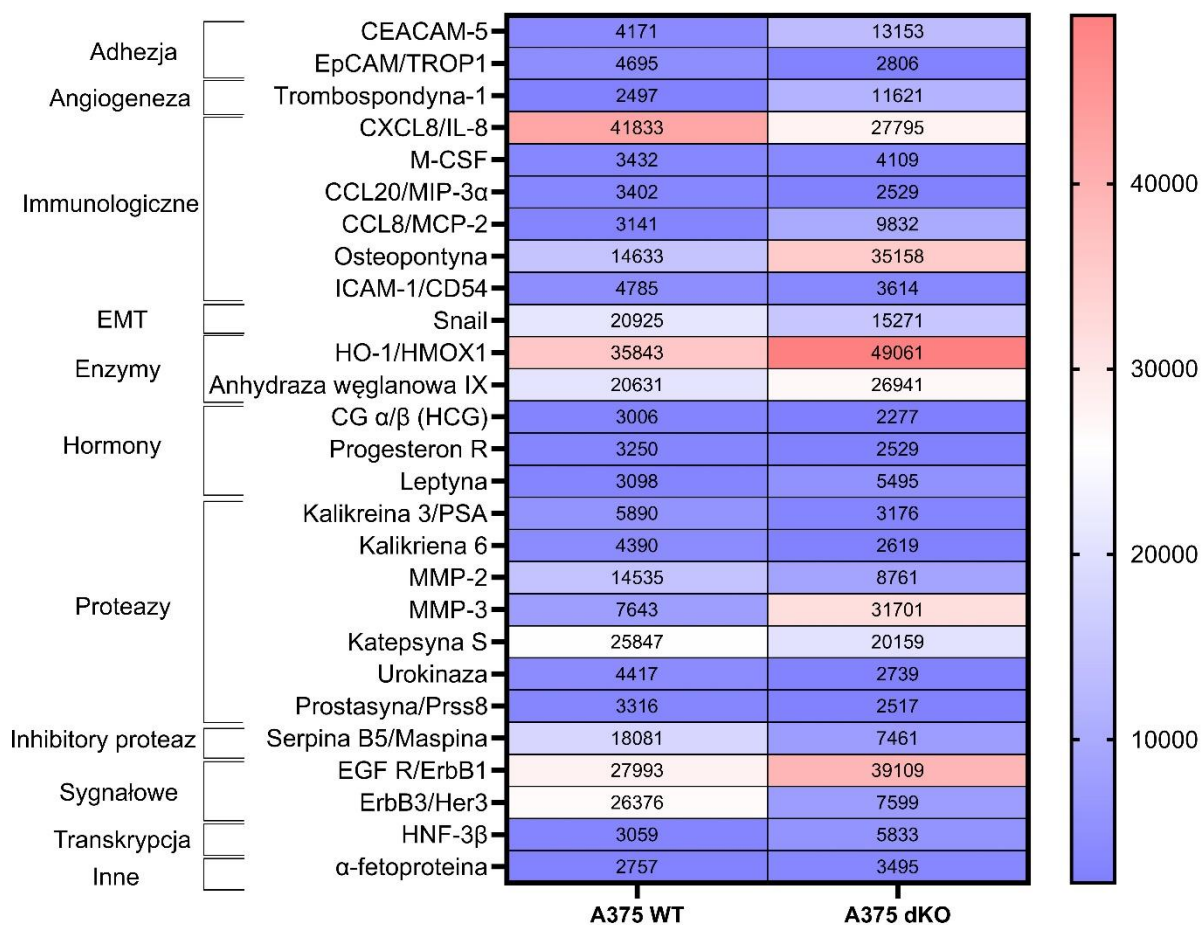
W komórkach linii A375 *RAB27A/B* KO wykryto zwiększoną ilość 6 białek i zmniejszoną ilość 25 białek w porównaniu do komórek typu dzikiego. Co ciekawe, zaobserwowano znaczące zmiany pomiędzy poziomem białek w komórkach A375 z pojedynczym i podwójnym KO (Tabela 13, Rycina 35). Ilość α -fetoproteiny i trombospondyny w komórkach KO była wyższa, względem komórek typu dzikiego, a w komórkach dKO niższa. Poziomy katepsyny D, GM-CSF i HIF-1 α , które były znacząco większe w komórkach *RAB27A* KO, w komórkach *RAB27A/B* KO spadły do poziomu zbliżonego do tego w komórkach typu dzikiego. Z kolei ilość anhidrazy węglanowej, EGFR, HO-1, MMP3 i p53 wzrosły w komórkach dKO w porównaniu do komórek WT i KO. Istotny spadek, względem komórek typu dzikiego i z pojedynczym KO, wystąpił w przypadku białek: angiopoetyny, katepsyny S, EpCam, CG α/β , CXCL8, kallikreiny 8, CCL20, MMP-2, MSP, PDGF-AA, CD31, progesteronu R, prostasyny, Snail i Tie2. Ilość FOXO1, p27, serpiny E1 i VEGF była większa, niż w komórkach KO, natomiast nadal mniejsza, niż w komórkach typu dzikiego. Zwiększona ekspresja osteopontyny, obserwowana w komórkach KO, wzrosła dodatkowo w komórkach dKO.

Tabela 13. Różnice pomiędzy poziomem białek w lizatach pochodzących z komórek A375 typu dzikiego (WT), *RAB27A* KO (KO) i *RAB27A/B* KO (dKO).

Punkt	Białko	A375 KO/ A375 WT	A375 dKO/ A375 WT
A1,A2	Punkty referencyjny	-1%	-6%
A3,A4	α -fetoproteina	40%	-48%
A5,A6	Amfiregulina	-18%	16%
A9,A10	Białko angiopoetynopodobne-4	-3%	-24%
A11,A12	ENPP-2/Autotaksyna	8%	-16%
A13,A14	Axl	-6%	-9%
A15,A16	BCL-x	-9%	-2%
A21,A22	VE-kadheryna	17%	9%
A23,A24	Punkty referencyjne	2%	3%
B3,B4	CapG	4%	-5%
B5,B6	Anhydraza węglanowa IX	14%	30%
B7,B8	Katepsyna B	23%	4%
B9,B10	Katepsyna D	19%	-10%
B11,12	Katepsyna S	7%	-27%
B13,14	CEACAM-5	3%	-8%
B15,16	Dekoryna	-20%	-28%
B17,18	Dkk-1	12%	-4%
B19,20	DLL1	2%	-5%
B21,22	EGF R/ErbB1	3%	37%
C3,4	Endoglina/CD105	2%	10%
C11,12	EpCAM/TROP1	12%	-29%
C15,16	ErbB2	-6%	3%
C17,18	ErbB3/Her3	-70%	-72%
C21,22	FGF basic	7%	16%
D1,2	FoxC2	17%	-12%
D3,4	FoxO1/FKHR	-33%	-18%
D7,8	GM-CSF	33%	-8%
D9,10	CG α/β (HCG)	5%	-23%
D11,12	HGF R/c-Met	2%	-7%
D13,14	HIF-1 α	23%	8%
D15,16	HNF-3 β	75%	95%
D17,18	HO-1/HMOX1	17%	38%
D19,20	ICAM-1/CD54	-36%	-20%
D23,24	IL-6	10%	11%
E1,2	CXCL8/IL-8	-11%	-35%
E3,4	IL-18 Bpa	-25%	-34%
E5,6	Kalitreina 3/PSA	-9%	-36%
E9,10	Kalikreina 6	-39%	-55%
E17,18	CCL8/MCP-2	-17%	-7%
E19,20	CCL7/MCP-3	-16%	-2%

E21,22	M-CSF	-5%	11%
E23,24	Mezotelina	0%	17%
F3,4	CCL20/MIP-3 α	-8%	-28%
F5,6	MMP-2	-7%	-62%
F7,8	MMP-3	35%	295%
F11,12	MSP/MST1	13%	-28%
F17,18	Osteopontyna (OPN)	59%	141%
F19,20	p27/Kip1	-34%	-11%
F21,22	p53	-21%	13%
F23,24	PDGF-AA	5%	-19%
G1,2	CD31/PECAM-1	-8%	-22%
G3,4	Progesteron R	6%	-20%
G5,6	Progranulina	-2%	9%
G7,8	Prolaktyna	-9%	-16%
G9,10	Prostazyna/Prss8	-12%	-25%
G13,14	Serpina B5/Maspina	-57%	-59%
G15,16	Serpina E1/PAI-1	-34%	-17%
G17,18	Snail	-15%	-31%
G19,20	SPARC	4%	-6%
G21,22	Surwiwina	-1%	2%
G23,24	Tenascyna C	-23%	-21%
H1,2	Trombospondyna-1	70%	-12%
H3,4	Tie-2	12%	-23%
H5,6	Urokinaza	-31%	-37%
H9,10	VEGF	-42%	-19%
H11,12	Wimentyna	12%	3%
I1,2	Punkty referencyjne	1%	1%

Wyniki przedstawiono jako procentową różnicę pomiędzy średnią OD z dwóch replikatów technicznych lizatów z komórek KO w stosunku do lizatów z komórek typu dzikiego. W tabeli uwzględniono białka, których wartość $OD \geq 3000$. Na czerwono zaznaczono wzrost poziomu białka $\geq 20\%$, a na niebiesko spadek poziomu białka $\geq 20\%$.



Rycina 35. Poziom białek w lizatach pochodzących z komórek A375 typu dzikiego (WT) i *RAB27A/B* KO (dKO). Białka grupowano według ich funkcji. Wyniki przedstawiono jako średnią z analizy densytometrycznej dwóch replikatów technicznych. Na wykresach uwzględniono białka, których wartość $OD \geq 3000$, a różnica pomiędzy typem dzikim, a KO wynosiła $\geq 20\%$.

Analiza metodą Proteome Profiler pozwoliła ocenić szeroki wpływ wyciszenia *RAB27A* lub *RAB27A/B* na ekspresję wielu białek. Warto podkreślić, że 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.

IV.3.3. Ocena ekspresji białek z rodziny HER

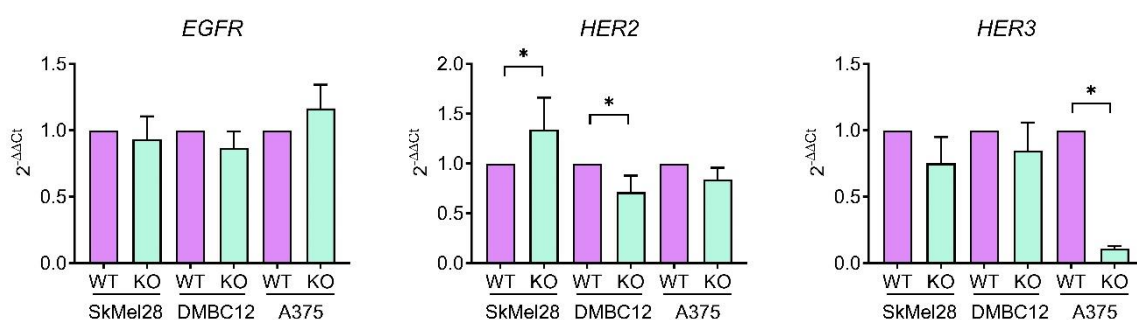
Ze względu na istotną rolę białek z rodziny ludzkich receptorów naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *human epidermal growth factor receptors*, HER) w szlakach sygnałowych w nowotworach postanowiono zwalidować wyniki otrzymane przy użyciu Proteome Profiler. W tym celu zbadano ekspresję receptorów HER2, HER3 oraz EGFR metodami RT-PCR, cytometrią przepływową i Western

blot. Mimo wielu prób z użyciem różnych przeciwciał nie udało się wykryć HER2 metodą Western blot w żadnej z badanych linii komórkowych.

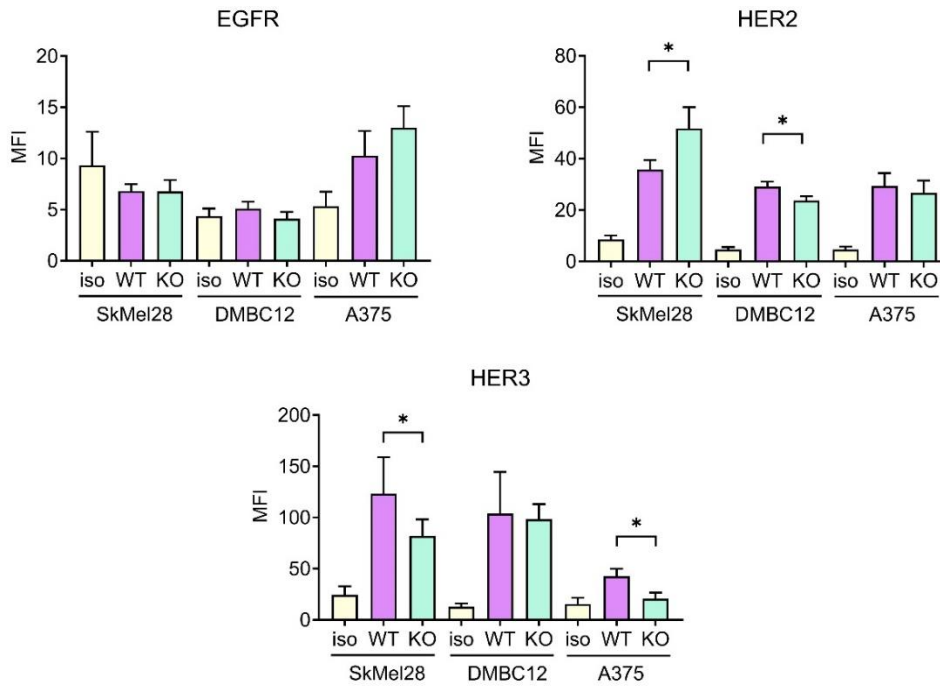
Nokaut *RAB27A* w komórkach linii SkMel28 spowodował wzrost poziomu mRNA *HER2*, natomiast poziom mRNA *EGFR* i *HER3* pozostał bez zmian (Rycina 36). Zaobserwowano także wzrost powierzchniowej ekspresji HER2 w komórkach z *RAB27A* KO (Rycina 37). Z kolei ocena ilości receptorów przy pomocy cytometrii przepływowej oraz Western blot wykazała, że ekspresja HER3 uległa zmniejszeniu w komórkach SkMel28 KO, w porównaniu do komórek WT, co jest zgodne z wynikiem z Proteome Profiler (Rycina 37 i 38). Natomiast EGFR był niewykrywalny za pomocą przeciwciał zastosowanych w wyżej wymienionych technikach.

W komórkach *RAB27A* KO linii DMBC12 poziom mRNA *HER2*, ale nie *EGFR* i *HER3*, był obniżony, w stosunku do linii typu dzikiego (Rycina 36). Natomiast w badaniu ekspresji receptorów na poziomie białka zaobserwowano widoczny na zdjęciu Western blot spadek ilości HER3 w komórkach linii DMBC12, choć w metodzie cytometrii przepływowej spadek ten nie osiągnął istotności statystycznej (Rycina 37 i 38). Śladowy poziom EGFR nie różnił się pomiędzy komórkami KO i WT (Rycina 37). Co ciekawe, obserwacje te są nieco odmienne od tych uzyskanych metodą Proteome Profiler. W profilu białkowym (Tabela 12) wystąpił spadek poziomu EGFR i HER2, natomiast brak istotnych zmian w HER3.

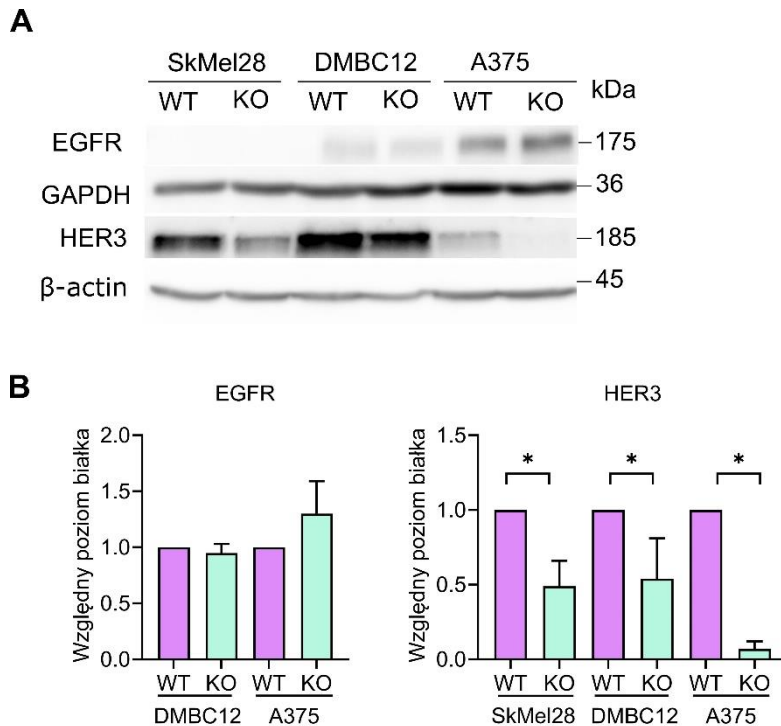
Komórki linii A375 *RAB27A* KO wykazywały znaczący spadek ilości HER3, potwierdzony wszystkimi metodami, natomiast ekspresja HER2 nie uległa zmianie (Rycina 36, 37, 38), co jest zgodne z wynikami z Proteome Profiler. W odróżnieniu od pozostałych linii komórki A375 KO wykazywały zwiększony poziom EGFR, mierzony metodami cytometrii przepływowej i Western blot, jednak różnice nie osiągnęły istotności statystycznej (Rycina 37 i 38).



Rycina 36. Poziom mRNA *EGFR*, *HER2* i *HER3* w komórkach SkMel28, DMBC12, A375 typu dzikiego (WT) i *RAB27A* KO (KO) oceniony RT-PCR. Wyniki były normalizowane względem wartości dla komórek typu dzikiego danej linii. Wartości przedstawiono jako średnią \pm SD, * $p < 0,05$, $n = 3$.

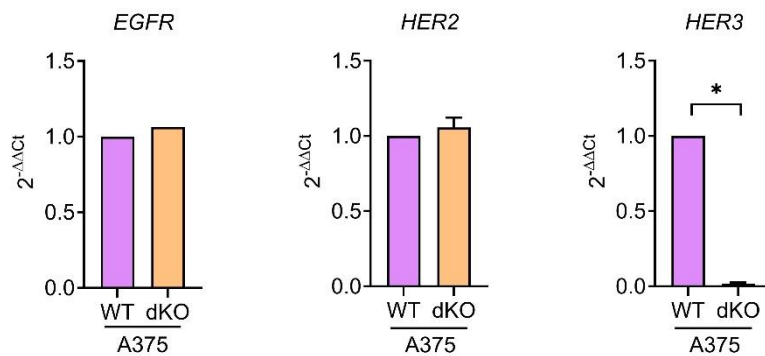


Rycina 37. Ekspresja powierzchniowa receptorów z rodziny HER na komórkach SkMel28, DMBC12, A375 typu dzikiego (WT) i *RAB27A* KO (KO) oceniony metodą cytometrii przepływowej. Wartości przedstawiono jako średnią \pm SD, * $p < 0,05$, $n \geq 3$. Iso - kontrola izotypowa

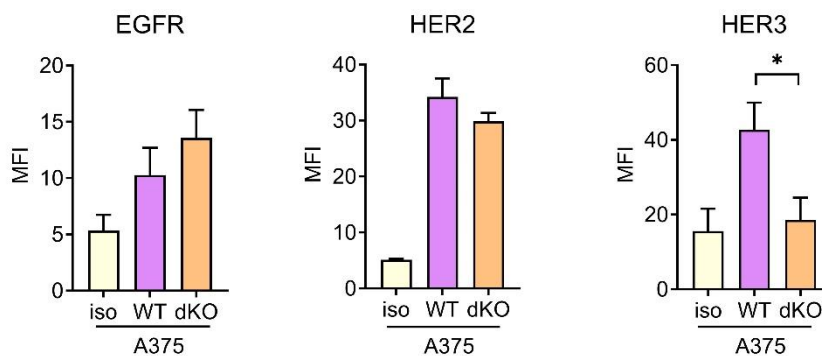


Rycina 38. Poziom EGFR i HER3 w lizatach z komórek linii SkMel28, DMBC12 oraz A375, typu dzikiego (WT) i *RAB27A* KO (KO) oceniony metodą Western blot. (A) Reprezentatywny Western blot. (B) Analiza densytometryczna intensywności sygnału, dane przedstawiono jako wartości średnie \pm SD, $p < 0,05$, $n \geq 5$. Wyniki były normalizowane względem wartości dla komórek typu dzikiego danej linii.

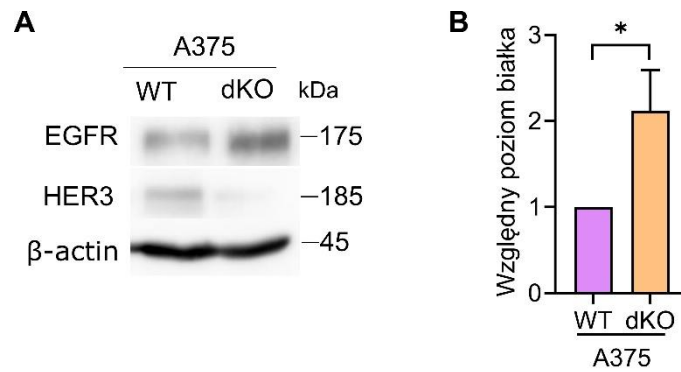
Następnie zbadano ekspresję receptorów z rodziny HER w komórkach z podwójnym KO *RAB27A/B* linii A375 i porównano z ich ekspresją w komórkach typu dzikiego. Nie zaobserwowano istotnych różnic w poziomie mRNA i białka HER2, natomiast ilość mRNA oraz białka HER3 była znacząco niższa w komórkach dKO, co potwierdzono metodami RT-PCR, cytometrią przepływową i WB (Rycina 39, 40 i 41). Obserwacje te są zgodne z wynikami otrzymanymi metodą Proteome Profiler. Zawartość mRNA EGFR w komórkach dKO była zbliżona do komórek typu dzikiego, natomiast zaobserwowano znamiennej wzrost poziomu tego receptora w lizatach białkowych, podobnie jak w przypadku metody Proteome Profiler. Jednakże obserwowany wzrost powierzchniowej ekspresji EGFR na komórkach dKO mierzony cytometrią przepływową nie osiągnął istotności statystycznej.



Rycina 39. Poziom mRNA *EGFR*, *HER2* i *HER3* w komórkach A375 typu dzikiego (WT) i *RAB27A/B* KO (dKO) oceniony RT-PCR. Wyniki były normalizowane względem wartości dla komórek typu dzikiego danej linii. Wartości przedstawiono jako średnią \pm SD, * $p < 0,05$, $n = 3$.



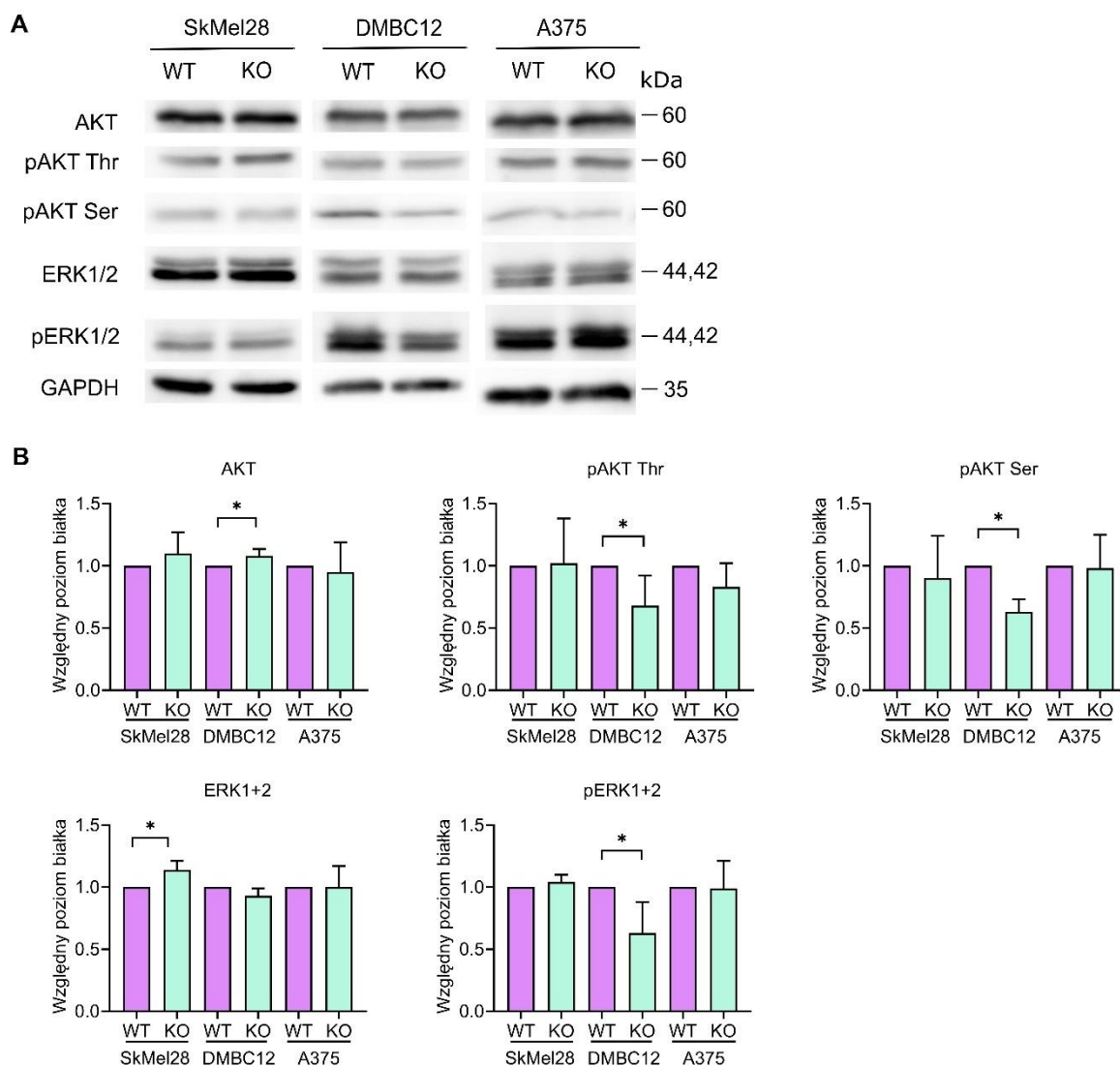
Rycina 40. Ekspresja powierzchniowa receptorów z rodziny HER na komórkach A375 typu dzikiego (WT) i *RAB27A/B* KO (dKO) oceniony metodą cytometrii przepływowej. Wartości przedstawiono jako średnią \pm SD, * $p < 0,05$, $n \geq 3$. Iso - kontrola izotypowa



Rycina 41. Poziom EGFR i HER3 w lizatach z komórek linii A375 typu dzikiego (WT) i *RAB27A/B* KO (dKO) oceniony metodą Western blot. (A) Reprezentatywny Western blot. (B) Analiza densytometryczna intensywności sygnału, dane przedstawiono jako wartości średnie \pm SD, $p < 0,05$, $n = 5$. Wyniki były normalizowane względem wartości dla komórek typu dzikiego.

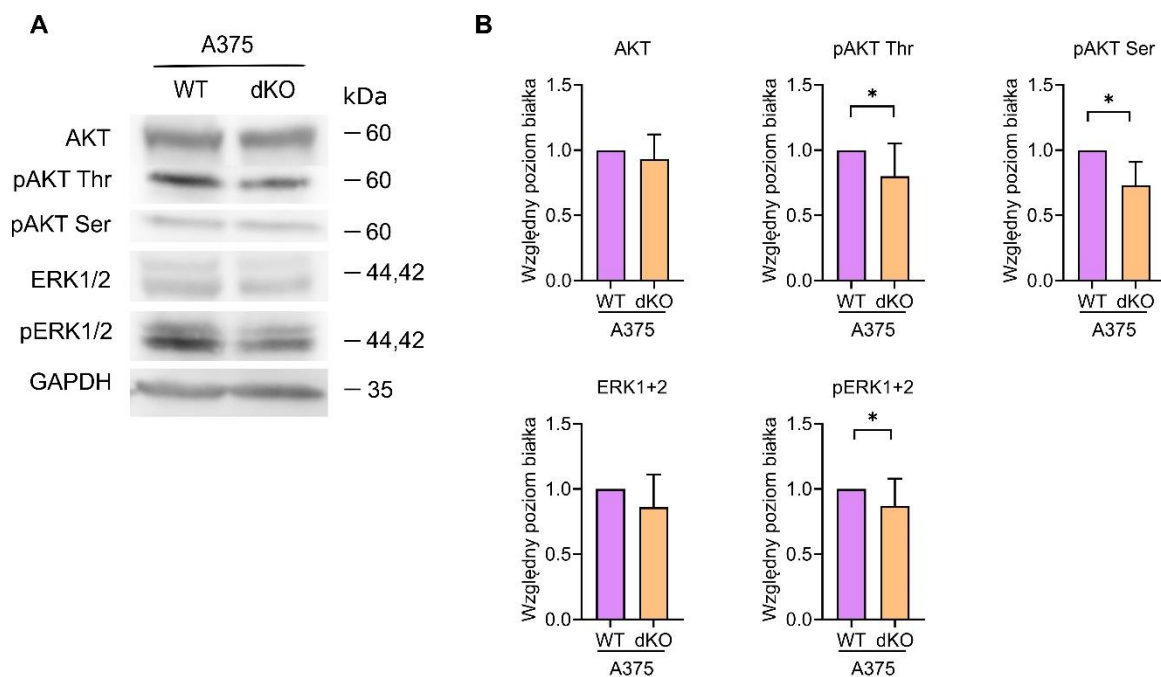
IV.3.4. Ocena poziomu i stopnia ufosforylowania białek sygnałowych AKT i ERK

Receptory z rodziny HER (ERBB) aktywują różne ścieżki sygnałowe, jednak przede wszystkim pobudzają szlak PI3K/AKT oraz RAS/RAF/MEK/ERK. Aby ocenić jak wywołane wyciszeniem *RAB27A* zmiany w poziomie HER2, HER3 czy EGFR w komórkach wpłynęły na funkcje sygnałowe tych receptorów zbadano poziom fosforylacji białek AKT oraz ERK1/2, co przedstawiono na rycinie 42. Wyniki wskazują, że wyciszenie *RAB27A* zahamowało fosforylację reszt treoninowej i serynowej białka AKT oraz reszt tyrozynowej i treoninowej białek ERK1/2 jedynie w komórkach linii DMBC12 KO. Natomiast w komórkach linii SkMel28 i A375 nie zaobserwowano takich zmian. Co ciekawe wykryto wzrost ekspresji białek ERK1/2 w komórkach SkMel28 KO.



Rycina 42. Poziom białek AKT i ERK1/2 i stopień ich ufosforylowania w lizatach komórkowych linii SkMel28, DMBC12 oraz A375, typu dzikiego (WT) i *RAB27A* KO (KO) oceniony metodą Western blot. pAKT Thr - ufosforylowana reszta treoninowa 308 białka AKT; pAKT Ser - ufosforylowana reszta serynowa 473 białka AKT; pERK1/2 - ufosforylowane reszty treoninowa 185 i tyrozynowa 187 białek ERK1 i ERK2 (A) Reprezentatywny Western blot. (B) Analiza densytometryczna intensywności sygnału, dane przedstawiono jako wartości średnie \pm SD, $p < 0,05$, $n \geq 4$. Wyniki były normalizowane względem wartości dla komórek typu dzikiego.

Następnie zbadano poziom białek AKT, ERK1 i ERK2 oraz stopień ich fosforylacji w komórkach A375 *RAB27A/B* KO. Wyciszenie obu izoform *RAB27* skutkowało zahamowaniem fosforylacji reszt treoninowej i serynowej białka AKT oraz reszt tyrozynowej i treoninowej białek ERK1/2.



Rycina 43. Poziom białek AKT i ERK1/2 i stopień ich ufosforylowania w lizatach komórkowych linii A375, typu dzikiego (WT) i *RAB27A/B* KO (dKO) oceniony metodą Western blot. pAKT Thr - ufosforylowana reszta treoninowa 308 białka AKT; pAKT Ser - ufosforylowana reszta serynowa 473 białka AKT; pERK1/2 - ufosforylowane reszty treoninowa 185 i tyrozynowa 187 białek ERK1 i ERK2 (A) Reprezentatywny Western blot. (B) Analiza densytometryczna intensywności sygnału, dane przedstawiono jako wartości średnie \pm SD, $p < 0,05$, $n \geq 4$. Wyniki były normalizowane względem wartości dla komórek typu dzikiego.

V. Dyskusja

Znaczenie RAB27A i RAB27B w chorobach nowotworowych jest potwierdzone licznymi badaniami *in vitro* oraz *in vivo* [208, 230]. Na skutek wyciszenia ekspresji jednej lub obu izoform RAB27 obserwowano ograniczenie wzrostu, migracji czy inwazji komórek wielu typów nowotworów, a także zahamowanie wzrostu guza i powstawania przerzutów w modelach zwierzęcych [133, 149, 191, 205]. Ponadto, wysoki poziom mRNA i/lub białka RAB27A lub RAB27B w tkankach może stanowić czynnik diagnostyczny, świadczący o istnieniu komórek nowotworowych. Ilość RAB27 w tkankach czy płynach ustrojowych może stanowić także wskaźnik prognostyczny dla pacjentów z nowotworami różnego typu, m.in. czerniakiem [190, 191, 210, 212-216, 218-222, 224-227].

Jedną z kluczowych funkcji RAB27 jest regulacja uwalniania małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, które pośredniczą w komunikacji międzykomórkowej. Sekrecja sEVs jest czynnikiem sprzyjającym onkogenezie i progresji nowotworu. Można więc przypuszczać, że poprzez wyciszenie ekspresji RAB27A i/lub RAB27B dojdzie do zmniejszenia ilości pęcherzyków uwalnianych przez komórki nowotworowe, co w konsekwencji zmieni ich aktywność biologiczną w kierunku zahamowania progresji choroby. Taki efekt obserwowano w badaniach prowadzonych na komórkach lub modelach zwierzęcych różnego typu nowotworów, np. raka szyjki macicy [91], prostaty [167], czy piersi [215]. Jednakże rola RAB27 w sekrecji sEVs z komórek czerniaka i w ich funkcjonowaniu zależnym od tego zjawiska nie jest w pełni zdefiniowana. Ponadto, z danych literaturowych wynika, że RAB27 w komórkach nowotworowych uczestniczy też w sekrecji czynników o działaniu pronowotworowym i proinwazyjnym w sposób niezależny od sEVs [133, 205]. Nie mniej intrygującą rolą RAB27, ale stosunkowo mało poznaną, jest jego udział w przekazywaniu sygnałowym w komórce.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej była ocena wpływu RAB27A na funkcjonowanie komórek trzech linii czerniaka (A375, DMBC12 i SkMel28) poprzez wyciszenie ekspresji (nokaut) tego genu metodą CRISPR/Cas9. W pierwszym etapie badań scharakteryzowano małe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe uwalniane przez komórki KO w porównaniu do komórek typu dzikiego. Wykazano, że ich liczba, rozmiar, oraz całkowite stężenie białka nie uległy zmianie na skutek wyciszenia RAB27A we wszystkich badanych liniach. Obserwowany brak znaczenia RAB27A w uwalnianiu sEVs nie zależy od jego bazowego poziomu, ponieważ w komórkach SkMel28, cechujących się najwyższym stężeniem mRNA i białka, obserwowano efekt tożsamy z pozostałymi liniami. Aby wykluczyć możliwość kompensacji utraty jednej izoformy RAB27 przez drugą utworzono linię komórkową A375 z wyciszoną ekspresją RAB27A i RAB27B, jednak ponownie nie zaobserwowano zahamowania uwalniania sEVs. Wyniki te, choć zaskakujące biorąc pod uwagę badania prowadzone na różnych typach nowotworów, są zgodne z tymi uzyskanymi na komórkach czerniaka przez Guo i wsp [191]. Badacze wykazali, że wyciszenie ekspresji RAB27A z użyciem shRNA w ludzkich komórkach czerniaka linii WM164 i WM983C

nie wpłynęło na liczbę oraz całkowite stężenie białka uwalnianych sEVs. Z drugiej strony, zastosowanie tej samej metody na komórkach czerniaka linii SkMel28 przez Peinado i wsp. [133] oraz na liniach WM35 i A375 przez Li i wsp. [149] skutkowało znaczącym zahamowaniem wydzielania sEVs. Wyniki te są przeciwstawne od danych prezentowanych w tej rozprawie doktorskiej. Można by przypuszczać, że różnica może wynikać z zastosowania innych metod wyciszenia ekspresji genu *RAB27A*, jednakże w publikacji Guo i wsp. [191] przedstawiono porównanie interferencji RNA z użyciem shRNA oraz siRNA z nokautem techniką CRISPR/Cas9. Żadna z trzech metod wyciszenia *RAB27A* w mysich komórkach czerniaka linii B16-F10 nie zmniejszyła uwalniania sEVs, co pozwala przypuszczać, że efekt ten nie jest jednak zależny od metodologii.

Istnieje wiele potencjalnych przyczyn sprzeczności pomiędzy obserwacjami poczynionymi w prezentowanej rozprawie doktorskiej, a danymi literaturowymi. Po pierwsze, proces powstawania i wydzielania małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych jest złożony i angażuje wiele białek, w tym różne GTPazy z rodziny RAB, m.in. RAB3A, RAB7, RAB11, RAB35 czy RAB37. Dodatkowo RAB3A oddziałuje z tymi samymi białkami efektorowymi co RAB27, a więc potencjalnie oba białka mogą działać komplementarnie [174]. Wiadomo także, że funkcje poszczególnych białek z rodziny RAB różnią się w zależności od komórki [91, 231]. Dlatego istnieje możliwość, że utrata funkcji tylko jednego z białek z rodziny RAB nie jest w stanie wystarczająco wpłynąć na złożoną maszynę biogenezy i sekrecji sEVs, aby zaobserwować ten efekt w warunkach eksperymentalnych. Ponadto, stosowane przez autorów publikacji metody służące do oznaczania ilości uwalnianych sEVs (jak przedstawiono w Tabeli 4, w rozdziale I.3.1) różnią się między sobą diametralnie, co utrudnia obiektywne porównanie uzyskanych wyników.

Pomimo, że wyciszenie *RAB27A* nie zmniejszyło liczby sEVs uwalnianych przez komórki czerniaka linii SkMel28, DMBC12 i A375, zaobserwowano pewne fluktuacje w poziomie białek charakterystycznych dla pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. W sEVs wydzielanych z komórek SkMel28 *RAB27A* KO różnice te były najmniejsze, ponieważ nastąpił jedynie wzrost poziomu TSG101 względem sEVs typu dzikiego. Zwiększenie poziomu tego białka oraz tetraspaniny CD63 było także zauważalne w pęcherzykach z komórek A375 *RAB27A* KO. Z kolei na skutek podwójnego nokautu *RAB27A* i *RAB27B* komórki A375 nadal uwalniały sEVs o większej zawartości CD63, ale nie TSG101. Białka CD81 i Alix w sEVs z komórek A375 KO i dKO pozostawały na tym samym poziomie, co w sEVs WT. Co ciekawe, odwrotny efekt zauważono w sEVs z komórek DMBC12 *RAB27A* KO, ponieważ poziom wszystkich badanych białek był znacząco niższy, niż w pęcherzykach z komórek typu dzikiego. Wynik ten jest szczególnie interesujący, ponieważ autorzy wielu publikacji stwierdzali ograniczenie sekrecji sEVs wyłącznie na podstawie spadku poziomu białek ocenianego metodą Western blot (jak pokazano w Tabeli 4 w rozdziale I.3.1.). Li i wsp. [149] uznali, że wyciszenie ekspresji *RAB27A* ograniczyło sekrecję sEVs z komórek czerniaka linii WM35 i A375 w oparciu o zmniejszenie poziomów CD63, CD9 i TSG101

w pęcherzykach. A więc niższa ekspresja białek obserwowana w sEVs z komórek DMBC12 *RAB27A* KO teoretycznie mogłaby sugerować ograniczoną sekrecję pęcherzyków z tych komórek. Z drugiej strony, całkowite stężenie białka oraz liczba sEVs z komórek DMBC12 *RAB27A* KO nie uległy zmianie, co pozwala wnioskować, że jednak nie nastąpiło zmniejszenie całkowitej liczby uwalnianych pęcherzyków. Natomiast prawdopodobnie zmieniła się kompozycja ich białek. Różnice w poziomie CD63 i TSG101 przy braku spadku liczby sEVs obserwowano również w ludzkich komórkach czerniaka WM164 i mysich komórkach czerniaka B16-F10 z knockdownem/nokautem *RAB27A* [191]. Przeprowadzone badania możnaby w przyszłości poszerzyć o analizę proteomiczną sEVs, aby bardziej precyzyjnie ocenić wpływ wyciszenia *RAB27* na zmianę ładunku pęcherzyków.

Przedstawione wyniki wskazują, że *RAB27A* może nie być kluczowym regulatorem sekrecji sEVs w ocenianych komórkach czerniaka linii SkMel28, DMBC12 i A375. Należy jednak podkreślić, że doświadczenia prowadzone na pęcherzykach zewnątrzkomórkowych wciąż stanowią pewne wyzwanie, począwszy od metod izolacji po ich detekcję. Sam rozmiar w skali nano stanowi znaczące ograniczenie w dostępie sprzętu pozwalającego na wykrycie tak małych cząstek, a zawartość kwasów nukleinowych czy białek w sEVs jest istotnie mniejsza niż w komórkach, a więc potrzeba stosunkowo dużych ilości pęcherzyków, aby uzyskać odpowiednią ilość materiału do eksperymentu, na przykład badania białek metodą Western blot. Stanowi to poważną przeszkodę w opracowaniu technologii, która pozwalałaby na analizę pojedynczych pęcherzyków [232].

Głównym problemem w badaniach nad pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi jest ich ogromna i niedoceniana różnorodność. Wiele przeszkód w zrozumieniu funkcji EVs wynika z trudności w rozdzieleniu złożonej populacji pęcherzyków na podklasy o określonych rozmiarach, składzie czy szlakach biogenezy [59, 233]. Pomimo wielu publikacji na temat małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, większość badań została przeprowadzona *in vitro* przy użyciu linii komórkowych, lub pęcherzyków izolowanych z płynów ustrojowych, a wiadomym jest, że warunki hodowli mogą wpływać na ich cechy biochemiczne i biofizyczne [234]. Rodzi to wątpliwość czy sEVs zachowywałyby się podobnie w warunkach *in vivo*. Pęcherzyki izolowane z materiałów, takich jak podłoże hodowlane czy płyny ustrojowe, mogą być „zanieczyszczone” innymi cząsteczkami o podobnej wielkości lub gęstości. Dodatkowo, warunki hodowli komórek takie jak temperatura, stężenie CO₂, czas, a także żywotność i gęstość komórek czy składniki podłoża bezpośrednio wpływają na ilość, skład i funkcje wydzielanych pęcherzyków [234]. Substancje wzbogacające podłoża, takie jak surowica np. bydlęca/cielęca, są bogate w EVs, które będą stanowiły zanieczyszczenie dla pęcherzyków pochodzących z badanych komórek, izolowanych z podłoża hodowlanego. Składniki podłoża hodowlanego mogą być wychwytywane przez komórki i ładowane do ich pęcherzyków [235]. Żywotność komórek również znacząco wpływa na ilość i rodzaj uwalnianych pęcherzyków, ponieważ komórki umierające wydzielają więcej EVs. Pęcherzyki uwalniane przez zaledwie kilka procent

umierających komórek mogą przewyższać liczbę EVs wydzielanych przez żywe komórki [236]. Z tych powodów powtarzalność danych pozostaje wyzwaniem w badaniach nad pęcherzykami. Ponadto, niewielkie odchylenia w protokole izolacji mogą skutkować zebraniem różnych populacji pęcherzyków. W badaniach prowadzonych na komórkach SkMel28 przez Peinado i wsp. [133] oraz na liniach WM35 i A375 przez Li i wsp. [149] sEVs izolowano z podłoża hodowlanego poprzez ultrawierowanie przy prędkości 100 000 x g przez 70 min. Z kolei badane w tej pracy doktorskiej pęcherzyki izolowano przez ultrawierowanie w tej samej prędkości, ale przez 2,5 godz. Można by rozważać czy krótszy czas wirowania mógłby spowodować, że autorzy publikacji otrzymali mniej sEVs uwalnianych przez komórki z wyciszonym *RAB27A*. Z drugiej strony przeciwstawne wyniki prezentowane przez Guo i wsp. [191] również otrzymano z badań nad sEVs izolowanymi przez ultrawierowanie w prędkości 100 000 x g przez 70 min, co wyklucza to wyjaśnienie.

Należy także podkreślić, że pęcherzyki z jednej hodowli komórkowej mogą posiadać różne rozmiary, skład, czy funkcje. Na przykład mysie komórki czerniaka linii B16F10 wydzielały subpopulacje małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych o mniejszej i większej gęstości, o średnich wielkościach odpowiednio 117 nm i 66 nm, które różniły się profilem RNA i białek. Badane subpopulacje wywoływały zmiany w ekspresji różnych genów [237]. Późniejsze badania pokazały, że komórki tej samej linii uwalniają trzy subpopulacje pęcherzyków, najmniejsze, o średnicy ~35 nm, które nazwano egzomerami ze względu na brak zewnętrznej struktury błonowej, oraz małe i duże egzosomy o rozmiarach w zakresach odpowiednio 60-80 nm i 90-120 nm. Subpopulacje pęcherzyków różniły się profilem białek, lipidów, DNA i RNA oraz właściwościami biofizycznymi. Ponadto, po podaniu sEVs z komórek B16F10 myszom ich biodystrybucja w organach była różna, co sugeruje różne funkcje biologiczne [238]. Należy jednak zauważyć, że nie da się jednoznacznie określić powodów różnic wielkości pęcherzyków. Nie wiadomo czy jedna komórka wydziela pęcherzyki o różnych rozmiarach, czy też różnice w wielkości wynikają z uwalniania pęcherzyków przez różne komórki w hodowli, a może repertuar pęcherzyków uwalnianych przez daną komórkę zmienia się w czasie [233].

Do jednej z najczęściej stosowanych metod do ilościowej i jakościowej oceny zawartości sEVs w zawieszynie jest Western blot. Jednakże białka uznawane powszechnie za charakterystyczne dla małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych nie są obecne w jednakowym stopniu we wszystkich ich subpopulacjach, dlatego nie istnieje jeden, uniwersalny marker sEVs. Na przykład białka szoku cieplnego HSP70, flotilliny czy MHC klasy I i II uważane były przez długi czas za charakterystyczne dla małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych izolowanych poprzez ultrawierowanie, jednak później wykryto je również w większych cząstkach wydzielanych przez komórki dendrytyczne, wyodrębnionych po wirowaniu przy niższych prędkościach. Stężenie tetraspanin (CD9, CD63 i CD81) było największe w osadzie zebranym po ultrawierowaniu (100 000 x g), ale CD9 i CD63 były obecne również w osadach po wirowaniu przy 2000 i 10 000 x g [79]. Na tej podstawie Kowal i wsp. [79] wyróżnili cztery

subpopulacje małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych izolowanych poprzez ultrawierowanie. Były to (I) sEVs wzbogacone o tetraspaniny CD9, CD63, CD81 i białka ESCRT - prawdopodobnie egzosomy; (II) sEVs wzbogacone tylko o CD9, ale nie posiadające CD63 i CD81 - mikropęcherzyki pochodzące z błony komórkowej; (III) sEVs nie posiadające żadnej z tetraspanin; (IV) sEVs wzbogacone o ECM lub składniki surowicy, nie wywodzące się ze szlaku endosomalnego. Autorzy sugerują aby obecność CD9, CD63 i CD81 była kryterium uznania małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych za egzosomy. Według tej zasady prezentowany w rozprawie doktorskiej spadek poziomu CD63 i CD81 w sEVs uwalnianych przez komórki DMBC12 *RAB27A* KO może wskazywać na zmniejszenie populacji pęcherzyków kategorii I, przy jednoczesnym zwiększeniu populacji pęcherzyków nie posiadających tych tetraspanin, jednak o tej samej wielkości.

Z drugiej strony, istnieją także badania przeczące obecności CD63 i CD9 jako niezbędnych markerów do identyfikacji sEVs, ponieważ ich skład białkowy jest niezwykle heterogenny. Przeprowadzono analizę proteomiczną małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez panel NCI-60, który obejmuje 60 linii komórkowych, należących do 9 typów nowotworów. Spośród 6071 zidentyfikowanych białek, wspólnych dla wszystkich linii było tylko 213. Poziom 25 białek był skorelowany z ilością uwalnianych sEVs. Do uniwersalnych markerów sEVs należały m.in. CD81, Alix i HSC70. Natomiast uznawane powszechnie za markery tetraspaniny CD63 i CD9, TSG101, syntenina-1 i flotillina-1 były obecne w około $\frac{2}{3}$ badanych prób. Proteomy pęcherzyków tworzyły klastry w zależności od typu tkanki z której się wywodzą, a więc stanowiły odzwierciedlenie ich komórek progenitorowych. Na przykład białko premelanosomowe (PMEL) było obecne w sEVs izolowanych z 9 linii komórkowych czerniaka, natomiast nie występowało w pęcherzykach z komórek nowotworowych innego typu. Profil transkryptomyczny i proteomiczny pęcherzyków był dosyć zbliżony do komórkowego. Natomiast w kilku liniach komórkowych obserwowano znaczące różnice między składem pęcherzyków, a komórek [239].

W innym badaniu izolowano małe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe z 497 próbek pochodzących z ludzkich i mysich: linii komórkowych, tkanek, osocza, surowicy, szpiku kostnego, płynu limfatycznego i żółci. Były to materiały zarówno prawidłowe, jak i nowotworowe. Wykryto średnio 862 białka w każdej próbce, a najsilniejszą determinantą wzorca białkowego był rodzaj materiału źródłowego (tkanki, płyny ustrojowe) oraz gatunek, zarówno dla prób prawidłowych, jak i nowotworowych. W tych badaniach jedynie HSPA8 było białkiem obecnym w ponad połowie wszystkich sEVs ze wszystkich źródeł. W ludzkich liniach komórkowych występowało w odpowiednio 99%, a w ludzkich tkankach w 98%. Białko ALIX było obecne w odpowiednio 97% i 94% linii komórkowych i tkanek ludzkich. Z podobną częstotliwością wykrywano białko HSP90AB1. Tetraspanina CD63 występowała w 40% ludzkich komórek i 37% tkanek [240]. Zauważono także, że ilość wykrytych

białek była różna w zależności od metody izolacji pęcherzyków - ultrawierowania, wirowania w gradiencie gęstości czy chromatografii wykluczania/żelowej [241].

Oprócz różnic pomiędzy pęcherzykami z różnych typów komórek, wiadomo także, że nawet komórki jednej linii uwalniają sEVs o różnej zawartości. Przykładowo, zauważono, że ilość CD9, CD63 i CD81 różniła się co najmniej stukrotnie pomiędzy sEVs tej samej wielkości wydzielanymi przez komórki HEK293, co potwierdza ogromną heterogenność pęcherzyków [81]. Dane te ukazują ryzyko błędnego wnioskowania o właściwościach poszczególnych sEVs na podstawie uśrednionych właściwości miliardów pęcherzyków. Podsumowując, badanie poziomu białek pęcherzyków zewnątrzkomórkowych może nie być optymalnym rozwiązaniem do oceny zdolności komórek do uwalniania sEVs.

Alternatywną metodą analizy rozkładu wielkości oraz liczby pęcherzyków jest NTA, jednakże dokładność tej techniki również budzi wątpliwości. W badaniach Auger i wsp. [242] wyciszono ekspresję *RAB27A* za pomocą shRNA lub siRNA, a także inhibitora Nexinhib w komórkach raka jelita grubego HCT-116 oraz glejaka U87-MG, co potwierdzono RT-PCR i WB. Nie zaobserwowano różnic w ilości ani rozmiarze sEVs mierzonych NTA, wydzielanych przez komórki z knockdownem *RAB27A*, w porównaniu do kontroli. Wyniki były niezależne od czasu hodowli komórek, linii komórkowej oraz metod izolacji sEVs. Wykluczono również, aby badane pęcherzyki były ciałkami apoptotycznymi, ze względu na brak wzmożonej śmierci komórkowej. Poziom *RAB27B*, który hipotetycznie mógłby kompensować wyciszenie ekspresji *RAB27A*, był zwiększony w komórkach glejaka, jednak w komórkach raka jelita grubego był niższy, a więc nie tłumaczy to braku zmiany liczby uwalnianych pęcherzyków obserwowanej w obu liniach. Ilość *RAB35* oraz *RAB11*, które również uczestniczą w wydzielaniu sEVs, była niezmienna. Zaobserwowano jednak wzrost liczby sEVs wydzielanych przez komórki z wywołaną hipoksją. Autorzy publikacji uznali, że NTA jest metodą odpowiednią do wykrywania zwiększonego, ale nie zmniejszonego uwalniania pęcherzyków. Nie zbadano jednak poziomu białek uznawanych za markery sEVs, ani ich stężenia białka, więc nie ma pewności, czy brak różnic wynika z niedokładności metody, czy braku wpływu wyciszenia *RAB27A* na uwalnianie sEVs przez badane komórki. Podsumowując, wyniki badań nad małymi pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi należy analizować z pewną dozą ostrożności, ze względu trudności metodologiczne, a także heterogenność samych sEVs.

Drugim celem pracy doktorskiej była ocena wpływu wyciszenia *RAB27A* na funkcjonowanie komórek czerniaka. Zauważono, że migracja i inwazja komórek SkMel28 i DMBC12 z wyciszoną ekspresją *RAB27A* były znacząco ograniczone. Dodatkowo, proliferacja komórek SkMel28 KO była zmniejszona. Pro-inwazyjna funkcja *RAB27* była opisana w komórkach raka jelita grubego [243], trzustki [244], pęcherza [210] czy nerki [245]. Zmniejszoną migrację i inwazję mysich komórek czerniaka wykazał także Guo i wsp. [191]. Z drugiej strony komórki linii A375 *RAB27A* KO zarastały ryse

oraz migrowały przez ECM w podobnym tempie, co komórki typu dzikiego. Dopiero podwójny nokaut *RAB27A* i *RAB27B* zahamował migrację, jednak nie wpłynął na inwazyjność komórek linii A375. Wskazuje to, że obie izoformy RAB27 mogą działać niezależnie, przynajmniej częściowo.

Obserwowane różnice mogą być związane z inwazyjnością poszczególnych linii komórkowych. Komórki linii A375 cechują się dużą inwazyjnością i niskim poziomem MITF, co utożsamiane jest z fenotypem pro-inwazyjnym, z kolei SkMel28 uznawane są za mało agresywne, o wysokim poziomie MITF, co utożsamiane jest z fenotypem pro-proliferacyjnym [246, 247]. Interesujące jest więc zahamowanie proliferacji jedynie w komórkach SkMel28. Z drugiej strony, poziom MITF przypuszczalnie nie wpływa na tę zależność, ponieważ komórki DMBC12 posiadają zbliżoną ilość tego białka, co komórki A375, a ich inwazyjność jest znacząco niższa. Bardziej prawdopodobnym wytłumaczeniem jest fakt, iż komórki A375 wydzielają większą niż SkMel28 ilość czynników pro-inwazyjnych, takich jak VEGF, MMP-2 czy TNF- α , które uczestniczą w degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej [247]. Może to wskazywać, że inwazyjność tych komórek jest na tyle silna, że wyciszenie *RAB27A* nie jest w stanie osłabić tej funkcji.

Wpływ RAB27 na migrację i inwazyjność komórek przypisywany jest regulacji sekrecji małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Jak pokazują badania sEVs z komórek czerniaka zawierają onkogenne kwasy nukleinowe (np. niekodujące RNA), czy białka (np. MET, PD-L1, uPAR, EGFR, VEGF i MMP-2), które promują wzrost nowotworu, angiogenezę i przerzutowanie [248, 249]. Proteom pęcherzyków uwalnianych z komórek tego samego typu nowotworu różni się w zależności od stopnia ich inwazyjności. Opublikowane badania przeprowadzone na siedmiu liniach komórkowych czerniaka pokazały, że sEVs uwalniane przez bardziej agresywne komórki zawierały więcej białek zaangażowanych w migrację, angiogenezę i odpowiedź immunologiczną, niż komórki niewywołujące przerzutów [138]. W prowadzonych przez mnie badaniach pomimo braku zahamowania uwalniania pęcherzyków, nadal obserwowane były zmiany w funkcjonowaniu komórek. A więc być może zmieniła się zawartość onkogennych kwasów nukleinowych i białek w pęcherzykach. Należy jednak pamiętać, że *RAB27A* niezależnie od uwalniania sEVs reguluje także sekrecję rozpuszczalnych czynników promujących wzrost guza i powstawanie przerzutów, takich jak osteopontyna, płytkopochodny czynnik wzrostu i łożyskowy czynnik wzrostu [133]. Co więcej, dane literaturowe wskazują, że RAB27 moduluje szlaki sygnałowe w komórkach różnego typu. Wyciszenie ekspresji *RAB27B* w komórkach raka wątroby zahamowało szlak PI3K/AKT prowadząc do ograniczenia proliferacji komórek [221]. Z kolei knockdown *RAB27B* w erytroblastach zmniejszył fosforylację białek ERK1/2 [250]. Pewne różnice w stopniu ufosforylowania AKT i ERK1/2 zaobserwowano także w badaniach na komórkach czerniaka prezentowanych w tej pracy, co omówiono poniżej. Wiadomym jest, że oba szlaki sygnałowe promują proliferację komórek nowotworowych i uczestniczą w inicjacji nabywania mezenchymalnego (pro-inwazyjnego) charakteru komórki. W związku z tym można przypuszczać, że udział RAB27

w inwazyjności komórek czerniaka jest procesem złożonym, zależnym i niezależnym od uwalniania sEVs.

Chcąc sprawdzić czy nokaut *RAB27* w komórkach czerniaka ma wpływ na ekspresję białek związanych z nowotworami przygotowano profil proteomiczny komórek linii SkMel28, DMBC12 i A375. Jednocześnie wykazano odmienną w poziomie białek uczestniczących w procesach takich jak EMT, apoptoza, modulowanie układu odpornościowego, angiogeneza, czy szlaki sygnałowe. Według mojej wiedzy jest to pierwsza analiza profilu białkowego w lizatach komórek z wyciszoną ekspresją *RAB27*. Wśród białek, których poziom był obniżony we wszystkich badanych liniach znalazły się tenascyna C i urokinaza. Tenascyna C promuje onkogenezę, angiogenezę, metastazę czy modulację układu odpornościowego, a jej nadekspresję obserwuje się w nowotworach, chronicznym stanie zapalnym czy infekcjach bakteryjnych i wirusowych [251]. Z kolei urokinaza uczestniczy w degradacji ECM, oddziałuje z integrynami i receptorami prowadząc do aktywacji szlaków sygnałowych, a także promuje wielolekooporność [252]. Bardziej szczegółowa analiza oddziaływania *RAB27A* z tymi białkami może stanowić ciekawy kierunek przyszłych badań. Analiza metodą Proteome Profiler pozwoliła także na wykrycie obniżenia ekspresji białek EGFR i HER2 w komórkach KO linii SkMel28 i DMBC12, oraz obniżenia HER3 w komórkach KO i dKO linii A375. Obserwacje te są szczególnie interesujące, ze względu na kluczową rolę białek z rodziny ludzkich receptorów naskórkowego czynnika wzrostu (HER) w funkcjonowaniu komórek. Rodzinę białek HER (nazywanych także ERBB) stanowią cztery receptory kinaz tyrozynowych: EGFR/HER1/ERBB1, HER2/ERBB2, HER3/ERBB3 i HER4/ERBB4. Posiadają one wspólną strukturę molekularną, składającą się z zewnątrzkomórkowej domeny wiążącej ligand, fragmentu transbłonowego i domeny cytoplazmatycznej o aktywności kinazy tyrozynowej. Na skutek wiązania odpowiednich ligandów konformacja receptorów HER ulega zmianie, co pozwala na ich dimeryzację, oraz dochodzi do aktywacji kinazy tyrozynowej i fosforylacji tyrozyn w obszarze C-końcowym domeny cytoplazmatycznej. Fosforylowane reszty tyrozynowe stanowią miejsce wiązania cząsteczek sygnałowych zawierających domenę homologii z białkami Src lub domenę wiązania fosfotyrozyny. Skutkuje to aktywacją szlaków sygnałowych takich jak: RAS/RAF/MEK/ERK, PI3K-AKT, kinazy Janus (JAK) i przekaźnika sygnału i aktywatora transkrypcji (ang. *Signal Transducer and Activator of Transcription*, STAT), fosfolipazy C (PLC γ), czy c-Src. Poprzez aktywację sieci sygnałowych receptory HER regulują podstawowe procesy komórkowe, takie jak proliferacja, przeżywalność, różnicowanie, apoptoza czy ruchliwość komórek [253]. Zmiany funkcjonowania receptorów HER, takie jak nadekspresja czy hiperaktywacja występują w różnych typach nowotworów i skorelowane są ze złym rokowaniem i niższą przeżywalnością pacjentów [254-256]. Mutacje EGFR najczęściej wykrywane są u pacjentów z nowotworem płuc, a mutacje HER2 u chorych na raka piersi lub jajnika. Z kolei nadekspresja HER3 występuje w wielu typach nowotworów, m.in. raku żołądka, piersi, czy pęcherza.

Dlatego przeciwnowotworowe strategie terapeutyczne ukierunkowane na białka HER są stosowane w leczeniu od ponad 25 lat [253, 257].

Opisano, że w komórkach czerniaka występuje większa ekspresja i aktywacja HER3, niż w prawidłowych melanocytach [256, 258]. Zwiększony poziom tego receptora obserwowano także w tkankach pobranych od pacjentów z tym nowotworem, i wykazano pozytywną korelację pomiędzy nadekspresją HER3, a progresją choroby, wystąpieniem przerzutów i krótszym czasem przeżycia pacjentów [254, 256, 259, 260]. Wzrost fosforylacji HER3 w tkankach czerniaka na skutek leczenia inhibitorem BRAF obserwowano w ksenograftach u myszy i u pacjentów. Antynowotworowe działanie inhibitorów BRAF i MEK w komórkach czerniaka było ograniczone poprzez stymulację fosforylacji HER3 neuregulina 1 β [261]. Z kolei farmakologiczne zablokowanie fosforylacji HER3 zwiększyło wrażliwość komórek czerniaka na vemurafenib. Dlatego podejrzewa się, że wzrost aktywności HER promuje oporność na inhibitory BRAF/MEK [262]. Zaobserwowano także, że wyciszenie ekspresji HER zwiększyło wrażliwość komórek czerniaka na induktory ferroptozy [263] czy dakarbazynę [256].

Poziom HER2 w tkankach czerniaka u pacjentów jest znikomy [264-266], natomiast rola EGFR w czerniaku nie jest w pełni określona. Badania wskazują, że ten receptor nie ulega ekspresji w ludzkich melanocytach, jednakże jest on wykrywany w komórkach czerniaka [255, 267, 268]. Nie wykryto zależności pomiędzy poziomem EGFR, a inwazyjnością tego nowotworu i występowaniem przerzutów [269]. Natomiast inna publikacja ukazuje korelację pomiędzy zwiększoną ekspresją EGFR i przerzutami do węzła wartowniczego, nie stwierdzono jednak wpływu ekspresji EGFR na czas przeżycia pacjentów z czerniakiem [255]. Z kolei zwiększona amplifikacja kopii tego genu była skorelowana z progresją czerniaka i wystąpieniem przerzutów [267]. Wysoki poziom EGFR w tkankach z przerzutów powiązano także z nawrotem choroby po leczeniu adjuwantowym inhibitorami immunologicznych punktów kontrolnych [268].

Prezentowane w tej rozprawie doktorskiej badania wskazują na istotny wpływ wyciszenia *RAB27* na ekspresję receptorów z rodziny HER. Szczególnie znaczące wydaje się obniżenie poziomu HER3 we wszystkich badanych liniach czerniaka, pomimo jego różnej bazowej ekspresji. Biorąc pod uwagę istotną rolę tego receptora w czerniaku efekt ten może posiadać działanie przeciwnowotworowe. Natomiast różnice w ekspresji HER2 i EGFR są zależne od linii komórkowej. Komórki SkMel28 *RAB27A* KO wykazywały zwiększony poziom mRNA oraz powierzchniową ekspresję HER2, względem kontroli, natomiast odwrotne zjawisko występowało w przypadku komórek DMBC12 *RAB27A* KO, w których ekspresja tego receptora była niższa. Poziom HER2 był niezmienny w komórkach A375 *RAB27A* KO oraz *RAB27A/B* KO. Z kolei poziom EGFR był wyższy w komórkach KO (choć nieistotny statystycznie) i najwyższy w komórkach dKO linii A375.

Zmiany ekspresji i aktywności receptorów z rodziny HER skutkują także efektem „*downstream*” wpływającym na szlaki sygnałowe RAS/RAF/MEK/ERK oraz PI3K/AKT. Jednak ponownie zmiany te są

zależne od linii komórkowej. W komórkach DMBC12 *RAB27A* KO nastąpiło znaczące ograniczenie fosforylacji reszt treoninowej i serynowej białka AKT oraz reszt tyrozynowej i treoninowej białek ERK1/2. Co zaskakujące, w komórkach SkMel28 i A375 z wyciszonym *RAB27A* nie zaobserwowano zmian w fosforylacji wyżej wymienionych białek sygnałowych. Jest to szczególnie ciekawe biorąc pod uwagę niemal całkowity brak ekspresji HER3 w komórkach A375 *RAB27A* KO, co sugerowałoby również najbardziej znaczący wpływ na szlaki sygnałowe regulowane przez ten receptor. Z drugiej strony, być może zwiększona (choć nieistotna statystycznie) ekspresja EGFR rekompensuje brak HER3. Natomiast komórki A375 z podwójnym KO, w których występuje jeszcze większa (istotna statystycznie) ekspresja EGFR wykazują ograniczenie fosforylacji reszty treoninowej i serynowej AKT oraz reszt tyrozynowej i treoninowej ERK1/2. Trudno więc wysnuć sprecyzowane wnioski na podstawie tych wyników. Być może w komórkach linii A375 ma miejsce efekt kompensacji działania *RAB27A* przez *RAB27B*, jednak nie występuje on w przypadku komórek z podwójnym nokautem, stąd zmiany w stopniu fosforylacji białek obserwowane są wyłącznie w linii dKO. Natomiast brak badań prowadzonych na komórkach z nokautem wyłącznie *RAB27B* uniemożliwia precyzyjną ocenę roli tego białka w fosforylacji białek AKT i ERK1/2.

Niewątpliwie jednak 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. Z danych literaturowych wiadomo, że wyciszenie *HER3* w komórkach czerniaka skutkowało redukcją proliferacji, migracji i inwazji, zwiększoną apoptozą oraz zahamowaniem fosforylacji AKT *in vitro* [256, 270, 271]. Co ciekawe, wpływ wyciszenia *HER3* na aktywność AKT i ERK1/2 zależy od linii komórkowej czerniaka. Na przykład zwiększoną fosforylację ERK1/2 obserwowano w ludzkich komórkach czerniaka linii WM115 i SkMel24 [270], natomiast fosforylacja ERK1/2 i AKT była zmniejszona w ludzkich komórkach tego nowotworu linii CHL-1 i Bowes [271] oraz w mysich komórkach linii B16-BL6 [272]. Wyciszenie ekspresji *HER3* w ksenograftach u myszy ograniczyło wzrost guza i angiogenezę oraz powstawanie przerzutów do płuc [260, 272]. Należy jednak dodać, że oprócz białek z rodziny HER szlaki sygnałowe PI3K-AKT i RAS/RAF/MEK/ERK są aktywowane także przez receptory czynników wzrostu, receptory insulinowe, cytokinowe czy chemokinowe [273, 274]. A zatem pomimo obniżenia ekspresji *HER3* w komórkach *RAB27A* KO linii SkMel28 czy A375 możemy nie obserwować ograniczonej fosforylacji ERK1/2 i AKT, ponieważ proces ten jest regulowany przez inne receptory.

Szczególnie interesującym odkryciem w prezentowanej rozprawie doktorskiej jest pokazanie zależności pomiędzy *RAB27* a receptorami z rodziny HER, w szczególności *HER3*. Na chwilę obecną nie opublikowano badań poświęconych mechanizmom współdziałania tych dwóch białek, trudno więc wskazać przyczynę takiej interakcji. Jedną z możliwości jest wpływ *RAB27* na wewnątrzkomórkowy transport receptorów. Takie zjawisko obserwowano w osteoklastach myszy

ashen z mutacją *RAB27A*, w których aktywacja kaskady sygnałowej przez czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów (ang. *macrophage colony-stimulating factor*, M-CSF) lub ligand aktywatora receptora jądrowego czynnika $\kappa\beta$ (ang. *receptor activator of nuclear factor $\kappa\beta$ ligand*, RANKL) była wzmocniona na skutek zmiany transportu ich receptorów, odpowiednio c-fms i RANK [275]. Z kolei badania na komórkach raka płaskonabłonkowego jamy ustnej pokazały, że *RAB27A* wpływa na palmitylację EGFR promując jego retencję w błonie komórkowej poprzez modulowanie ekspresji palca cynkowego ZDHHC13 [276]. Aby lepiej zrozumieć zależność pomiędzy wyciszeniem *RAB27*, a aktywnością białek z rodziny HER należy przeprowadzić dodatkowe badania, między innymi ocenę odpowiedzi komórek na stymulację odpowiednimi ligandami receptorów HER.

Zjawiskiem obserwowanym we wszystkich przeprowadzonych doświadczeniach były znaczące różnice pomiędzy poszczególnymi liniami komórkowymi czerniaka. Prezentowane badania były prowadzone na trzech liniach, z różną ekspresją *RAB27A* i *RAB27B*, a także różnym potencjałem proliferacyjnym/inwazyjnym. Komórki linii SkMel28 są uznawane za mniej agresywne, natomiast komórki A375 są szczególnie agresywnym typem czerniaka. Oprócz komercyjnie dostępnych linii komórkowych wykorzystano także linię komórkową DMBC12 wywodzącą się z tkanek pobranych od pacjentki z czerniakiem guzkowym. Komórki te również charakteryzują się niskim fenotypem MITF i według moich obserwacji wykazują średnią inwazyjność. Wszystkie badane linie komórkowe posiadają mutację *BRAF* V600E. Komórki linii SkMel28 cechują się także mutacjami *CDK4* [277], *TP53*, *PTEN* [246] i *TERT* [278]. Natomiast w komórkach A375 zidentyfikowano mutacje *CDKN2A* i *TERT* [246]. W komórkach DMBC12 występują mutacje w między innymi *CDKN2A*, *MRPS31*, *KNSTRN*, *FAM58A*, *E2F3*, *FBXW7*, *NOTCH2* i *NOTCH3* [279]. Badane linie komórkowe różnią się także bazowym poziomem *RAB27A* i *RAB27B*, których ekspresja jest znacznie niższa w komórkach A375 i DMBC12, niż SkMel28. Jednakże pomimo wyższego poziomu *RAB27A* w komórkach SkMel28 efekty wywołane przez nokaut tego genu nie są bardziej znaczące, niż te obserwowane w komórkach DMBC12. Podsumowując, rola *RAB27A* w komórkach czerniaka prawdopodobnie zależy od wielu zmiennych, takich jak potencjał proliferacyjny/inwazyjny, czy wariant genetyczny danej linii, a nie wynika bezpośrednio z ilości tego białka w komórkach.

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki pozwalają na lepsze poznanie i zrozumienie roli jaką pełni *RAB27A* w funkcjonowaniu komórek czerniaka ze szczególnym uwzględnieniem funkcji tego białka w sekrecji małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, ruchliwości komórek oraz aktywności szlaków sygnałowych. Badania przeprowadzone na komórkach czerniaka z podwójnym nokautem umożliwiły także częściową ocenę funkcji pełnionych przez *RAB27B*, jednakże należy wziąć pod uwagę, że obserwowane efekty mogą wynikać z synergicznego efektu wyciszenia obu izoform, a ostateczne wnioski należałoby wysnuć na podstawie badań komórek z wyciszonym jedynie *RAB27B*. Podsumowując, po uwzględnieniu wszystkich poczynionych obserwacji można uznać, że wyciszenie

ekspresji RAB27A nie skutkuje wystarczająco znaczącym efektem terapeutycznym, aby móc być potencjalnym białkiem docelowym w leczeniu czerniaka.

VI. Podsumowanie

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki wskazują, że:

1. RAB27A nie wpływa na rozmiar i liczbę małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych uwalnianych przez komórki czerniaka, niezależnie od jego bazowej ekspresji
2. RAB27A wpływa na zawartość białek w małych pęcherzykach zewnątrzkomórkowych w sposób zależny od linii komórkowej
3. RAB27B nie wpływa na rozmiar i liczbę małych pęcherzyków komórkowych uwalnianych przez komórki czerniaka A375
4. RAB27B wpływa na zawartość białek w małych pęcherzykach zewnątrzkomórkowych uwalnianych z komórek czerniaka A375
5. RAB27A promuje proliferację, migrację i inwazję komórek czerniaka o niskim i średnim stopniu inwazyjności, ale nie wpływa na proliferację i ruchliwość komórek wysoko inwazyjnych
6. RAB27B promuje migrację wysoko inwazyjnych komórek czerniaka A375
7. RAB27A może być rozważany jako białko pro-sygnałowe, modulujące ekspresję białek związanych z powstawaniem i progresją nowotworu w komórkach czerniaka, jednakże współzależność ekspresji RAB27A i danego białka jest uzależniona od linii komórkowej czerniaka
8. RAB27B może być rozważany jako białko pro-sygnałowe, modulujące ekspresję białek związanych z powstawaniem i progresją nowotworu w komórkach czerniaka A375
9. RAB27A reguluje (nasila i/lub hamuje) ekspresję receptorów z rodziny HER (EGFR, HER2, HER3) w komórkach czerniaka w sposób zależny od linii komórkowej
10. RAB27B reguluje (nasila i/lub hamuje) ekspresję receptorów z rodziny HER (EGFR, HER2, HER3) w komórkach czerniaka A375
11. 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. Są również ważnym czynnikiem pro-sygnałowym współpracującym z białkami zaangażowanymi w progresję czerniaka. Jednakże aktywność RAB27A jest ściśle uzależniona od linii komórkowej tego nowotworu.

VII. Streszczenie

Czerniak jest najbardziej śmiertelnym nowotworem skóry, a liczba zdiagnozowanych pacjentów wzrasta każdego roku. Wcześnie wykryty jest prawie całkowicie wyleczalny, jednak zaawansowane stadium tej choroby zwykle wiąże się z niskim odsetkiem przeżywalności. Obecnie stosowana terapia celowana z użyciem inhibitorów BRAF i MEK oraz immunoterapia przeciwciałami skierowanymi przeciwko CTLA-4 i PD-1 mają ograniczoną skuteczność. U większości pacjentów występuje wrodzona lub nabyta oporność na leczenie, co przyczynia się do wysokiej śmiertelności czerniaka. Ponadto czerniak jest nowotworem o największej liczbie mutacji, między innymi ze względu na kluczowy udział promieniowania ultrafioletowego w jego powstawaniu. Dlatego wciąż prowadzone są badania poszukujące nowych molekularnych celów terapeutycznych, które mogłyby stanowić wsparcie w jego leczeniu.

Głównym celem niniejszej pracy było poznanie roli RAB27 w komórkach czerniaka. Białko to występuje w postaci izoform RAB27A i RAB27B, a ich udział obserwuje się w licznych procesach fizjologicznych i patologicznych. Badania wskazują na pro-nowotworowy charakter RAB27 w różnych typach nowotworów. Uważa się, że efekt ten jest związany głównie z promowaniem sekrecji małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych przez komórki nowotworowe. Uwalniane pęcherzyki stanowią nośnik 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 pęcherzyków, RAB27 wpływa także na wydzielanie rozpuszczalnych czynników promujących progresję nowotworu (np. cytokin, metaloproteinaz), a także moduluje funkcje komórek takie jak ich proliferacja czy migracja.

Do badań użyto trzech linii komórkowych czerniaka SkMel28, DMBC12 i A375, w których wyciszono ekspresję *RAB27A* za pomocą CRISPR/Cas9 oraz linię A375 z wyciszoną ekspresją *RAB27A* i *RAB27B*. Badania przeprowadzono w trzech etapach. Po uzyskaniu linii komórkowych z nokautem scharakteryzowano małe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe uwalniane przez komórki KO w porównaniu do pęcherzyków z komórek typu dzikiego. Wykazano, że liczba oraz rozmiar pęcherzyków nie uległ zmianie na skutek wyciszenia *RAB27A* lub *RAB27A/B*. Całkowite stężenie białka było porównywalne w pęcherzykach z komórek WT i *RAB27A* KO linii SkMel28 i DMBC12, jednak było ono wyższe w przypadku pęcherzyków z komórek KO linii A375, w porównaniu do WT. We wszystkich badanych liniach zaobserwowano znaczące różnice w poziomie białek charakterystycznych dla małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych - tetraspanin CD63 i CD81 oraz białek ESCRT - TSG101 i Alix. Należy jednak podkreślić, że różnice te były zależne od linii komórkowej i nie wystąpiła ogólna zależność pomiędzy poziomem *RAB27A*, a poszczególnymi białkami pęcherzykowymi.

W dalszych badaniach skupiono się na funkcjonowaniu komórek czerniaka z wyciszoną ekspresją *RAB27A* lub *RAB27A/B*. W tym celu wykorzystano pomiar przyrostu komórkowego DNA w celu oceny proliferacji komórek, test zarastania rysy jako model dwuwymiarowej migracji, oraz badanie przejścia komórek przez warstwę macierzy zewnątrzkomórkowej jako model inwazji. Spośród ocenianych linii jedynie komórki SkMel28 *RAB27A* KO wykazały ograniczoną proliferację. Natomiast zarówno komórki SkMel28 *RAB27A* KO, jak i DMBC12 *RAB27A* KO cechowały się zahamowaną migracją i inwazją. Zaobserwowano także spadek poziomu N-kadheryny, markera mezenchymalnego, co dodatkowo sugeruje, że *RAB27A* uczestniczy w regulacji inwazyjności tych linii komórkowych czerniaka. Natomiast ruchliwość komórek A375 *RAB27A* KO pozostała niezmienna, jedynie w przypadku komórek z podwójnym nokautem nastąpiło zahamowanie migracji. Ponieważ linia A375 charakteryzuje się największą inwazyjnością, pozwala to przypuszczać, że *RAB27A* wpływa na funkcjonowanie komórek o mniejszej agresywności.

W ostatnim etapie badań dokonano oceny poziomu białek zaangażowanych w onkogenezę i/lub progresję nowotworu. Poprzez badanie profilu proteomicznego wyróżniono liczne białka, w których nastąpił wzrost lub spadek ekspresji na skutek wyciszenia *RAB27A* lub *RAB27A/B*. Wśród nich znalazły się receptory z rodziny HER, których poziom był znacząco zmieniony. Aby dokładniej poznać zależność pomiędzy *RAB27A*, a receptorami HER zbadano poziom mRNA i białka, a także powierzchniową ekspresję HER2, HER3 i EGFR w komórkach. Otrzymane wyniki pokazały, że wyciszenie *RAB27A* znacząco obniżyło poziom HER3 we wszystkich badanych liniach czerniaka. Natomiast fluktuacje w poziomie HER2 i EGFR były różne w zależności od linii komórkowej. Ze względu na bezpośredni udział receptorów z rodziny HER w szlakach sygnałowych RAS/RAF/MEK/ERK oraz PI3K-AKT zbadano aktywność białek AKT i ERK1/2. Wykazano, że stopień fosforylacji ERK1/2 oraz AKT był obniżony w komórkach DMBC12 *RAB27A* KO, natomiast pozostał niezmienny w komórkach SkMel28 *RAB27A* KO i A375 *RAB27A* KO. Zaobserwowano także zmniejszoną fosforylację AKT w komórkach A375 z podwójnym nokautem *RAB27A/B*.

Podsumowując, wyniki przeprowadzonych badań pozwoliły na lepsze poznanie funkcji pełnionych przez *RAB27A* w komórkach czerniaka. Wykazano, że *RAB27A* nie wpływa bezpośrednio na liczbę uwalnianych małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, jednak znacząco kształtuje zawartość pewnych białek. Ponadto, *RAB27A* reguluje proliferację, migrację oraz inwazję komórek czerniaka w stopniu zależnym od linii komórkowej. Dodatkowo występuje interakcja pomiędzy *RAB27A*, a receptorami z rodziny HER wpływając na aktywację białek sygnałowych. Przedstawione wyniki sugerują, że *RAB27A* pełni rolę w progresji czerniaka, jednak stopień jego zaangażowania jest ściśle zależny od linii komórkowej. Dlatego mało prawdopodobne wydaje się, aby białko *RAB27A* było uniwersalnym celem terapeutycznym w czerniaku.

VIII. Abstract

Melanoma is the deadliest of skin cancers, and the number of patients diagnosed with it increases every year. When detected early, it is almost completely curable, but advanced stages of this disease are usually associated with low survival rates. Current targeted therapy with BRAF and MEK inhibitors, as well as immunotherapies targeting CTLA-4 and PD-1, show limited efficacy. Most patients have innate or acquired resistance to treatment, contributing to melanoma's high mortality rate. Additionally, melanoma has the highest mutation rate among all cancers, partially due to the significant role of ultraviolet radiation in its formation. Therefore, ongoing research focuses on identifying new molecular therapeutic targets to support its treatment.

The main goal of this study was to understand the role of RAB27 in melanoma cells. This protein exists as two isoforms, RAB27A and RAB27B, and is involved in numerous physiological and pathological processes. Various studies indicate an oncogenic character of RAB27 in multiple types of cancer. This effect is primarily attributed to promoting the secretion of small extracellular vesicles by cancer cells. The released vesicles act as carriers of oncogenic nucleic acids and proteins, enabling communication between tumor cells, the tumor microenvironment, and distant tissues. Vesicular transport contributes to the formation of premetastatic niche, malignant transformation of normal cells, or immunosuppression. However, independent of vesicular release, RAB27 also affects the secretion of soluble factors (e.g. cytokines, metalloproteinases) that promote tumor progression and modulate cellular functions such as proliferation or migration.

In this study, I used three melanoma cell lines: SkMel28, DMBC12, and A375 with CRISPR/Cas9-mediated silenced expression of *RAB27A*, and the A375 cell line with silenced expression of both *RAB27A* and *RAB27B*. The study was conducted in three steps. After generating the knockout cell lines, the small extracellular vesicles released by KO cells were characterized in comparison to those from wild-type cells. It was shown that the number and size of vesicles were not altered by *RAB27A* or *RAB27A/B* silencing. The total protein concentration was comparable in vesicles from WT and *RAB27A* KO SkMel28 and DMBC12 cell lines but was higher in vesicles from A375 knockout cells, compared to WT. Significant differences in the levels of proteins characteristic of small extracellular vesicles - tetraspanins CD63 and CD81, and ESCRT proteins TSG101 and Alix - were observed in all studied cell lines. However it is noteworthy that these differences were cell line-dependent, and there was no overall correlation between *RAB27A* levels and vesicular proteins.

Further studies focused on the functioning of melanoma cells with *RAB27A* or *RAB27A/B* knockout. Cell proliferation was assessed by measuring the DNA growth, the wound healing assay was used as a model of two-dimensional migration, and cell migration through the extracellular matrix layer acted as a model of invasion. Among all studied cell lines, only SkMel28 *RAB27A* KO cells showed inhibited proliferation. In contrast, both SkMel28 *RAB27A* KO and DMBC12 *RAB27A* KO cells exhibited

limited migration and invasion. A decrease in the level of N-cadherin, a mesenchymal marker, was also observed, further suggesting that RAB27A regulates the invasiveness of these melanoma cell lines. In contrast, the motility of A375 *RAB27A* KO cells remained unchanged, while the double knockout cells showed inhibited migration. Since the A375 line is characterized as the most invasive, this leads to the assumption that RAB27A affects only the functioning of less aggressive cells.

In the final stage of this study, the levels of proteins involved in oncogenesis and/or tumor progression were assessed. By examining the proteomic profile, I identified numerous proteins with increased or decreased expression due to the silencing of *RAB27A* or *RAB27A/B*. Among these proteins were HER family receptors, whose levels were significantly altered. To further explore the interaction between RAB27 and HER receptors I measured mRNA and protein levels and surface expression of HER2, HER3, and EGFR. The results showed that silencing *RAB27A* significantly reduced HER3 levels in all studied melanoma cell lines. In contrast, the fluctuations in HER2 and EGFR levels varied between cell lines. Due to the direct involvement of HER family receptors in RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K-AKT signaling pathways, I analyzed the activation of AKT and ERK1/2 proteins. It was shown that the phosphorylation of ERK1/2 and AKT proteins was decreased in DMBC12 *RAB27A* KO cells, while it remained unchanged in SkMel28 *RAB27A* KO and A375 *RAB27A* KO cells. Reduced AKT phosphorylation was also observed in A375 *RAB27A/B* double knockout cells.

In conclusion, the results of this study provide a better understanding of the functions performed by RAB27A in melanoma cells. It was shown that RAB27A does not directly affect the number of released small extracellular vesicles but significantly shapes some of their protein content. Moreover, RAB27A regulates the proliferation, migration, and invasion of melanoma cells in a cell line-dependent manner. In addition, an interaction between RAB27A and HER family receptors affecting the activation of signaling proteins was discovered. The results presented here suggest that RAB27A plays a role in melanoma progression, but the degree of its involvement is strictly cell line-dependent. Therefore, it seems unlikely that the RAB27A protein is a universal therapeutic target in melanoma.

IX. Bibliografia

1. Fisher DE, Bastian BC (eds) (2019) Melanoma. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7147-9>
2. Schadendorf D, Fisher DE, Garbe C, et al (2015) Melanoma. *Nat Rev Dis Primer* 1:15003
3. Shain AH, Bastian BC (2016) From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer* 16:345-358
4. Davis EJ, Johnson DB, Sosman JA, Chandra S (2018) Melanoma: What do all the mutations mean? *Cancer* 124:3490-3499
5. Shain AH, Joseph NM, Yu R, et al (2018) Genomic and Transcriptomic Analysis Reveals Incremental Disruption of Key Signaling Pathways during Melanoma Evolution. *Cancer Cell* 34:45-55.e4
6. Akbani R, Akdemir KC, Aksoy BA, et al (2015) Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell* 161:1681-1696
7. Arozarena I, Wellbrock C (2019) Phenotype plasticity as enabler of melanoma progression and therapy resistance. *Nat Rev Cancer* 19:377-391
8. Sensi M, Catani M, Castellano G, et al (2011) Human Cutaneous Melanomas Lacking MITF and Melanocyte Differentiation Antigens Express a Functional Axl Receptor Kinase. *J Invest Dermatol* 131:2448-2457
9. Tirosh I, Izar B, Prakadan SM, et al (2016) Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science* 352:189-196
10. Campbell NR, Rao A, Hunter MV, et al (2021) Cooperation between melanoma cell states promotes metastasis through heterotypic cluster formation. *Dev Cell* 56:2808-2825.e10
11. Ennen M, Keime C, Gambi G, et al (2017) *MITF* -High and *MITF* -Low Cells and a Novel Subpopulation Expressing Genes of Both Cell States Contribute to Intra- and Intertumoral Heterogeneity of Primary Melanoma. *Clin Cancer Res* 23:7097-7107
12. Arnold M, Singh D, Laversanne M, Vignat J, Vaccarella S, Meheus F, Cust AE, De Vries E, Whiteman DC, Bray F (2022) Global Burden of Cutaneous Melanoma in 2020 and Projections to 2040. *JAMA Dermatol* 158:495
13. Fidler MM, Gupta S, Soerjomataram I, Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Bray F (2017) Cancer incidence and mortality among young adults aged 20-39 years worldwide in 2012: a population-based study. *Lancet Oncol* 18:1579-1589
14. Rutkowski P, Wysocki PJ, Kozak K, et al (2022) Expert recommendations on diagnostic-therapeutic management of melanoma patients. *Oncol Clin Pract* 18:357-392
15. Organisation mondiale de la santé, Centre international de recherche sur le cancer (eds) (2018) WHO classification of skin tumours, 4th ed. International agency for research on cancer, Lyon
16. Barth A, Wanek LA, Morton DL (1995) Prognostic factors in 1,521 melanoma patients with distant metastases. *J Am Coll Surg* 181:193-201
17. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, et al (2019) Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med* 381:1535-1546
18. Tawbi HA, Schadendorf D, Lipson EJ, et al (2022) Relatlimab and Nivolumab versus Nivolumab in Untreated Advanced Melanoma. *N Engl J Med* 386:24-34
19. Robert C, Grob JJ, Stroyakovskiy D, et al (2019) Five-Year Outcomes with Dabrafenib plus Trametinib in Metastatic Melanoma. *N Engl J Med* 381:626-636
20. Weber JS, D'Angelo SP, Minor D, et al (2015) Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 16:375-384
21. Chesney J, Lewis KD, Kluger H, et al (2022) Efficacy and safety of lifileucel, a one-time autologous tumor-infiltrating lymphocyte (TIL) cell therapy, in patients with advanced melanoma after progression on immune checkpoint inhibitors and targeted therapies: pooled analysis of consecutive cohorts of the C-144-01 study. *J Immunother Cancer* 10:e005755
22. Eggermont AMM, Chiarion-Sileni V, Grob J-J, et al (2016) Prolonged Survival in Stage III Melanoma with Ipilimumab Adjuvant Therapy. *N Engl J Med* 375:1845-1855

23. Aamdal E, Jacobsen KD, Straume O, et al (2022) Ipilimumab in a real-world population: A prospective Phase IV trial with long-term follow-up. *Int J Cancer* 150:100-111
24. Ascierto PA, Del Vecchio M, Mandalá M, et al (2020) Adjuvant nivolumab versus ipilimumab in resected stage IIIB-C and stage IV melanoma (CheckMate 238): 4-year results from a multicentre, double-blind, randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 21:1465-1477
25. Livingstone E, Zimmer L, Hassel JC, et al (2022) Adjuvant nivolumab plus ipilimumab or nivolumab alone versus placebo in patients with resected stage IV melanoma with no evidence of disease (IMMUNED): final results of a randomised, double-blind, phase 2 trial. *The Lancet* 400:1117-1129
26. Smithy JW, Kalvin HL, Raber V, et al (2023) Final clinical results and first translational correlates of a phase 2 trial of adaptively dosed nivolumab and ipilimumab based on early radiographic assessment in advanced melanoma (ADAPT-IT). *J Clin Oncol* 41:9517-9517
27. Weber JS, Schadendorf D, Del Vecchio M, et al (2023) Adjuvant Therapy of Nivolumab Combined With Ipilimumab Versus Nivolumab Alone in Patients With Resected Stage IIIB-D or Stage IV Melanoma (CheckMate 915). *J Clin Oncol* 41:517-527
28. Eggermont AMM, Blank CU, Mandalà M, et al (2021) Adjuvant pembrolizumab versus placebo in resected stage III melanoma (EORTC 1325-MG/KEYNOTE-054): distant metastasis-free survival results from a double-blind, randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 22:643-654
29. Robert C, Carlino MS, McNeil C, et al (2023) Seven-Year Follow-Up of the Phase III KEYNOTE-006 Study: Pembrolizumab Versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *J Clin Oncol* 41:3998-4003
30. Chapman PB, Robert C, Larkin J, et al (2017) Vemurafenib in patients with BRAFV600 mutation-positive metastatic melanoma: final overall survival results of the randomized BRIM-3 study. *Ann Oncol* 28:2581-2587
31. Schadendorf D, Dummer R, Flaherty KT, et al (2024) COLUMBUS 7-year update: a randomized, open-label, phase III trial of encorafenib plus binimetinib versus vemurafenib or encorafenib in patients with BRAF V600E/K-mutant melanoma. *Eur J Cancer* 114073
32. Chapman PB, Ascierto PA, Schadendorf D, et al (2017) Updated 5-y landmark analyses of phase 2 (BREAK-2) and phase 3 (BREAK-3) studies evaluating dabrafenib monotherapy in patients with BRAF V600-mutant melanoma. *J Clin Oncol* 35:9526-9526
33. Rohaan MW, Borch TH, Van Den Berg JH, et al (2022) Tumor-Infiltrating Lymphocyte Therapy or Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med* 387:2113-2125
34. Han Q-F, Li W-J, Hu K-S, Gao J, Zhai W-L, Yang J-H, Zhang S-J (2022) Exosome biogenesis: machinery, regulation, and therapeutic implications in cancer. *Mol Cancer* 21:207
35. Gurung S, Perocheau D, Touramanidou L, Baruteau J (2021) The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Commun Signal CCS* 19:47
36. Colombo M, Raposo G, Théry C (2014) Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 30:255-289
37. Van Niel G, D'Angelo G, Raposo G (2018) Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19:213-228
38. Chargaff E, West R (1946) The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J Biol Chem* 166:189-197
39. Wolf P (1967) The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol* 13:269-288
40. Webber AJ, Johnson SA (1970) Platelet participation in blood coagulation aspects of hemostasis. *Am J Pathol* 60:19-42
41. Crawford N (1971) The Presence of Contractile Proteins in Platelet Microparticles Isolated from Human and Animal Platelet-free Plasma. *Br J Haematol* 21:53-69
42. Couch Y, Buzà EI, Di Vizio D, et al (2021) A brief history of nearly EV-erything - The rise and rise of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* 10:e12144

43. Witwer KW, Théry C (2019) Extracellular vesicles or exosomes? On primacy, precision, and popularity influencing a choice of nomenclature. *J Extracell Vesicles* 8:1648167
44. Nunez EA, Wallis J, Gershon MD (1974) Secretory processes in follicular cells of the bat thyroid. 3. The occurrence of extracellular vesicles and colloid droplets during arousal from hibernation. *Am J Anat* 141:179-201
45. Gould SJ, Raposo G (2013) As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*. <https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.20389>
46. Fox AS, Duggleby WF, Gelbart WM, Yoon SB (1970) DNA-Induced Transformation in *Drosophila*: Evidence for Transmission without Integration. *Proc Natl Acad Sci* 67:1834-1838
47. Mishra NC, Tatum EL (1973) Non-Mendelian Inheritance of DNA-Induced Inositol Independence in *Neurospora*. *Proc Natl Acad Sci* 70:3875-3879
48. Mitchell P, Petfalski E, Shevchenko A, Mann M, Tollervey D (1997) The Exosome: A Conserved Eukaryotic RNA Processing Complex Containing Multiple 3'→5' Exoribonucleases. *Cell* 91:457-466
49. Aaronson S, Behrens U, Orner R, Haines TH (1971) Ultrastructure of intracellular and extracellular vesicles, membranes, and myelin figures produced by *Ochromonas danica*. *J Ultrastruct Res* 35:418-430
50. Trams EG, Lauter CJ, Salem N, Heine U (1981) Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim Biophys Acta* 645:63-70
51. Pan BT, Johnstone RM (1983) Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell* 33:967-978
52. Harding C, Heuser J, Stahl P (1983) Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol* 97:329-339
53. Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C (1987) Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem* 262:9412-9420
54. Johnstone RM (2005) Revisiting the road to the discovery of exosomes. *Blood Cells Mol Dis* 34:214-219
55. Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ, Geuze HJ (1996) B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* 183:1161-1172
56. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 9:654-659
57. Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavieu G, Théry C (2019) Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat Cell Biol* 21:9-17
58. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, et al (2018) Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles* 7:1535750
59. Welsh JA, Goberdhan DCI, O'Driscoll L, et al (2024) Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *J Extracell Vesicles* 13:e12404
60. Buschow SI, Nolte-t Hoen ENM, Van Niel G, et al (2009) MHC II in Dendritic Cells is Targeted to Lysosomes or T Cell-Induced Exosomes Via Distinct Multivesicular Body Pathways. *Traffic* 10:1528-1542
61. Kowal J, Tkach M, Théry C (2014) Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr Opin Cell Biol* 29:116-125
62. Babst M (2011) MVB vesicle formation: ESCRT-dependent, ESCRT-independent and everything in between. *Curr Opin Cell Biol* 23:452-457
63. Wollert T, Hurley JH (2010) Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature* 464:864-869
64. Lu Q, Hope LW, Brasch M, Reinhard C, Cohen SN (2003) TSG101 interaction with HRS mediates endosomal trafficking and receptor down-regulation. *Proc Natl Acad Sci* 100:7626-7631

65. Saksena S, Wahlman J, Teis D, Johnson AE, Emr SD (2009) Functional Reconstitution of ESCRT-III Assembly and Disassembly. *Cell* 136:97-109
66. Wollert T, Wunder C, Lippincott-Schwartz J, Hurley JH (2009) Membrane scission by the ESCRT-III complex. *Nature* 458:172-177
67. Teng F, Fussenegger M (2021) Shedding Light on Extracellular Vesicle Biogenesis and Bioengineering. *Adv Sci* 8:2003505
68. Huebner AR, Cheng L, Somparn P, Knepper MA, Fenton RA, Pisitkun T (2016) Deubiquitylation of Protein Cargo Is Not an Essential Step in Exosome Formation. *Mol Cell Proteomics* 15:1556-1571
69. Baietti MF, Zhang Z, Mortier E, et al (2012) Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol* 14:677-685
70. Larios J, Mercier V, Roux A, Gruenberg J (2020) ALIX- and ESCRT-III-dependent sorting of tetraspanins to exosomes. *J Cell Biol*. <https://doi.org/10.1083/jcb.201904113>
71. Hurley JH, Odorizzi G (2012) Get on the exosome bus with ALIX. *Nat Cell Biol* 14:654-655
72. Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel D, Wieland F, Schwille P, Brügger B, Simons M (2008) Ceramide Triggers Budding of Exosome Vesicles into Multivesicular Endosomes. *Science* 319:1244-1247
73. Egea-Jimenez AL, Zimmermann P (2018) Phospholipase D and phosphatidic acid in the biogenesis and cargo loading of extracellular vesicles. *J Lipid Res* 59:1554-1560
74. Zhang Y, Li Y, Liu P, et al (2021) Phosphatase Shp2 regulates biogenesis of small extracellular vesicles by dephosphorylating Syntenin. *J Extracell Vesicles* 10:e12078
75. Kajimoto T, Okada T, Miya S, Zhang L, Nakamura S (2013) Ongoing activation of sphingosine 1-phosphate receptors mediates maturation of exosomal multivesicular endosomes. *Nat Commun* 4:2712
76. Wei D, Zhan W, Gao Y, Huang L, Gong R, Wang W, Zhang R, Wu Y, Gao S, Kang T (2021) RAB31 marks and controls an ESCRT-independent exosome pathway. *Cell Res* 31:157-177
77. Perez-Hernandez D, Gutiérrez-Vázquez C, Jorge I, López-Martín S, Ursa A, Sánchez-Madrid F, Vázquez J, Yáñez-Mó M (2013) The Intracellular Interactome of Tetraspanin-enriched Microdomains Reveals Their Function as Sorting Machineries toward Exosomes. *J Biol Chem* 288:11649-11661
78. van Niel G, Charrin S, Simoes S, Romao M, Rochin L, Saftig P, Marks MS, Rubinstein E, Raposo G (2011) The Tetraspanin CD63 Regulates ESCRT-Independent and -Dependent Endosomal Sorting during Melanogenesis. *Dev Cell* 21:708-721
79. Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primdal-Bengtson B, Dingli F, Loew D, Tkach M, Théry C (2016) Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521230113>
80. Hurwitz SN, Conlon MM, Rider MA, Brownstein NC, Meckes DG (2016) Nanoparticle analysis sheds budding insights into genetic drivers of extracellular vesicle biogenesis. *J Extracell Vesicles* 5:31295
81. Fordjour FK, Guo C, Ai Y, Daaboul GG, Gould SJ (2022) A shared, stochastic pathway mediates exosome protein budding along plasma and endosome membranes. *J Biol Chem* 298:102394
82. Chairoungdua A, Smith DL, Pochard P, Hull M, Caplan MJ (2010) Exosome release of β -catenin: a novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. *J Cell Biol* 190:1079-1091
83. Nigri J, Leca J, Tubiana S-S, et al (2022) CD9 mediates the uptake of extracellular vesicles from cancer-associated fibroblasts that promote pancreatic cancer cell aggressiveness. *Sci Signal* 15:eabg8191
84. Rappa G, Santos MF, Green TM, Karbanová J, Hassler J, Bai Y, Barsky SH, Corbeil D, Lorico A (2017) Nuclear transport of cancer extracellular vesicle-derived biomaterials through nuclear envelope invagination-associated late endosomes. *Oncotarget* 8:14443-14461

85. Miki Y, Yashiro M, Okuno T, Kitayama K, Masuda G, Hirakawa K, Ohira M (2018) CD9-positive exosomes from cancer-associated fibroblasts stimulate the migration ability of scirrhus-type gastric cancer cells. *Br J Cancer* 118:867-877
86. Tognoli ML, Dancourt J, Bonsergent E, Palmulli R, De Jong OG, Van Niel G, Rubinstein E, Vader P, Lavieu G (2023) Lack of involvement of CD63 and CD9 tetraspanins in the extracellular vesicle content delivery process. *Commun Biol* 6:532
87. Cardeñes B, Clares I, Toribio V, et al (2021) Cellular Integrin $\alpha 5\beta 1$ and Exosomal ADAM17 Mediate the Binding and Uptake of Exosomes Produced by Colorectal Carcinoma Cells. *Int J Mol Sci* 22:9938
88. Hánělová K, Raudenská M, Masařík M, Balvan J (2024) Protein cargo in extracellular vesicles as the key mediator in the progression of cancer. *Cell Commun Signal* 22:25
89. Bebelman MP, Janssen E, Pegtel DM, Crudden C (2021) The forces driving cancer extracellular vesicle secretion. *Neoplasia* 23:149-157
90. Savina A, Fader CM, Damiani MT, Colombo MI (2005) Rab11 Promotes Docking and Fusion of Multivesicular Bodies in a Calcium-Dependent Manner. *Traffic* 6:131-143
91. Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, et al (2010) Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol* 12:19-30; sup pp 1-13
92. Hsu C, Morohashi Y, Yoshimura S-I, et al (2010) Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. *J Cell Biol* 189:223-232
93. Liu BHM, Tey SK, Mao X, et al (2021) TPI1-reduced extracellular vesicles mediated by Rab20 downregulation promotes aerobic glycolysis to drive hepatocarcinogenesis. *J Extracell Vesicles* 10:e12135
94. Wu S, Luo M, To KKW, Zhang J, Su C, Zhang H, An S, Wang F, Chen D, Fu L (2021) Intercellular transfer of exosomal wild type EGFR triggers osimertinib resistance in non-small cell lung cancer. *Mol Cancer* 20:17
95. Jaé N, McEwan DG, Manavski Y, Boon RA, Dimmeler S (2015) Rab7a and Rab27b control secretion of endothelial microRNA through extracellular vesicles. *FEBS Lett* 589:3182-3188
96. Hoshino D, Kirkbride KC, Costello K, Clark ES, Sinha S, Grega-Larson N, Tyska MJ, Weaver AM (2013) Exosome secretion is enhanced by invadopodia and drives invasive behavior. *Cell Rep* 5:1159-1168
97. Südhof TC, Rothman JE (2009) Membrane Fusion: Grappling with SNARE and SM Proteins. *Science* 323:474-477
98. Salaün C, Gould GW, Chamberlain LH (2005) Lipid Raft Association of SNARE Proteins Regulates Exocytosis in PC12 Cells. *J Biol Chem* 280:19449-19453
99. Savina A, Furlán M, Vidal M, Colombo MI (2003) Exosome Release Is Regulated by a Calcium-dependent Mechanism in K562 Cells. *J Biol Chem* 278:20083-20090
100. Messenger SW, Woo SS, Sun Z, Martin TFJ (2018) A Ca²⁺-stimulated exosome release pathway in cancer cells is regulated by Munc13-4. *J Cell Biol* 217:2877-2890
101. Mulcahy LA, Pink RC, Carter DRF (2014) Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles* 3:24641
102. Clares-Pedrero I, Rocha-Mulero A, Palma-Cobo M, Cardeñes B, Yáñez-Mó M, Cabañas C (2024) Molecular Determinants Involved in the Docking and Uptake of Tumor-Derived Extracellular Vesicles: Implications in Cancer. *Int J Mol Sci* 25:3449
103. Joshi BS, De Beer MA, Giepmans BNG, Zuhorn IS (2020) Endocytosis of Extracellular Vesicles and Release of Their Cargo from Endosomes. *ACS Nano* 14:4444-4455
104. Morelli AE, Larregina AT, Shufesky WJ, et al (2004) Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood* 104:3257-3266
105. Rana S, Yue S, Stadel D, Zöller M (2012) Toward tailored exosomes: The exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection. *Int J Biochem Cell Biol* 44:1574-1584
106. Christianson HC, Svensson KJ, Van Kuppevelt TH, Li J-P, Belting M (2013) Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. *Proc Natl Acad Sci* 110:17380-17385

107. Feng D, Zhao W-L, Ye Y-Y, Bai X-C, Liu R-Q, Chang L-F, Zhou Q, Sui S-F (2010) Cellular Internalization of Exosomes Occurs Through Phagocytosis. *Traffic* 11:675-687
108. Tian T, Zhu Y-L, Zhou Y-Y, Liang G-F, Wang Y-Y, Hu F-H, Xiao Z-D (2014) Exosome Uptake through Clathrin-mediated Endocytosis and Macropinocytosis and Mediating miR-21 Delivery. *J Biol Chem* 289:22258-22267
109. Heusermann W, Hean J, Trojer D, et al (2016) Exosomes surf on filopodia to enter cells at endocytic hot spots, traffic within endosomes, and are targeted to the ER. *J Cell Biol* 213:173-184
110. Hu M, Kenific CM, Boudreau N, Lyden D (2023) Tumor-derived nanoseeds condition the soil for metastatic organotropism. *Semin Cancer Biol* 93:70-82
111. De Jong OG, Murphy DE, Mäger I, et al (2020) A CRISPR-Cas9-based reporter system for single-cell detection of extracellular vesicle-mediated functional transfer of RNA. *Nat Commun* 11:1113
112. Hoshino A, Costa-Silva B, Shen T-L, et al (2015) Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 527:329-335
113. Adachi E, Sakai K, Nishiuchi T, Imamura R, Sato H, Matsumoto K (2016) Different growth and metastatic phenotypes associated with a cell-intrinsic change of Met in metastatic melanoma. *Oncotarget* 7:70779-70793
114. Wiklander OPB, Nordin JZ, O’Loughlin A, et al (2015) Extracellular vesicle in vivo biodistribution is determined by cell source, route of administration and targeting. *J Extracell Vesicles* 4:26316
115. Matsumoto A, Takahashi Y, Nishikawa M, Sano K, Morishita M, Charoenviriyakul C, Saji H, Takakura Y (2017) Accelerated growth of B16 BL 6 tumor in mice through efficient uptake of their own exosomes by B16 BL 6 cells. *Cancer Sci* 108:1803-1810
116. Sung BH, Ketova T, Hoshino D, Zijlstra A, Weaver AM (2015) Directional cell movement through tissues is controlled by exosome secretion. *Nat Commun* 6:7164
117. Yáñez-Mó M, Siljander PR-M, Andreu Z, et al (2015) Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles* 4:27066
118. Zou W, Zhang K, Lai M, Jiang Y, Zhang Y, Bai X (2024) Biogenesis and Functions of Extracellular Vesicles. In: Wang Q, Zheng L (eds) *Extracell. Vesicles*. Springer Nature Singapore, Singapore, pp 9-32
119. Keerthikumar S, Chisanga D, Ariyaratne D, et al (2016) ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo. *J Mol Biol* 428:688-692
120. Kim D, Kang B, Kim OY, et al (2013) EVpedia: an integrated database of high-throughput data for systemic analyses of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* 2:20384
121. Lai CP, Kim EY, Badr CE, Weissleder R, Mempel TR, Tannous BA, Breakefield XO (2015) Visualization and tracking of tumour extracellular vesicle delivery and RNA translation using multiplexed reporters. *Nat Commun* 6:7029
122. O’Grady T, Njock M-S, Lion M, Bruyr J, Mariavelle E, Galvan B, Boeckx A, Struman I, Dequiedt F (2022) Sorting and packaging of RNA into extracellular vesicles shape intracellular transcript levels. *BMC Biol* 20:72
123. Rufino-Ramos D, Leandro K, Perdigão PRL, et al (2023) Extracellular communication between brain cells through functional transfer of Cre mRNA mediated by extracellular vesicles. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther* 31:2220-2239
124. Jaiswal R, Sedger LM (2019) Intercellular Vesicular Transfer by Exosomes, Microparticles and Oncosomes - Implications for Cancer Biology and Treatments. *Front Oncol* 9:125
125. Möller A, Lobb RJ (2020) The evolving translational potential of small extracellular vesicles in cancer. *Nat Rev Cancer* 20:697-709
126. Palmulli R, Bresteau E, Raposo G, Montagnac G, van Niel G (2023) In Vitro Interaction of Melanoma-Derived Extracellular Vesicles with Collagen. *Int J Mol Sci* 24:3703
127. Olejarz W, Kubiak-Tomaszewska G, Chrzanowska A, Lorenc T (2020) Exosomes in Angiogenesis and Anti-angiogenic Therapy in Cancers. *Int J Mol Sci* 21:5840

128. Chen S, Chen X, Luo Q, et al (2021) Retinoblastoma cell-derived exosomes promote angiogenesis of human vesicle endothelial cells through microRNA-92a-3p. *Cell Death Dis* 12:695
129. Hood JL, San RS, Wickline SA (2011) Exosomes Released by Melanoma Cells Prepare Sentinel Lymph Nodes for Tumor Metastasis. *Cancer Res* 71:3792-3801
130. Ekström EJ, Bergenfelz C, Von Bülow V, Serifler F, Carlemalm E, Jönsson G, Andersson T, Leandersson K (2014) WNT5A induces release of exosomes containing pro-angiogenic and immunosuppressive factors from malignant melanoma cells. *Mol Cancer* 13:88
131. Biagioni A, Laurenzana A, Menicacci B, et al (2021) uPAR-expressing melanoma exosomes promote angiogenesis by VE-Cadherin, EGFR and uPAR overexpression and rise of ERK1,2 signaling in endothelial cells. *Cell Mol Life Sci* 78:3057-3072
132. Gener Lahav T, Adler O, Zait Y, Shani O, Amer M, Doron H, Abramovitz L, Yofe I, Cohen N, Erez N (2019) Melanoma-derived extracellular vesicles instigate proinflammatory signaling in the metastatic microenvironment. *Int J Cancer* 145:2521-2534
133. Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, et al (2012) Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med* 18:883-891
134. Xiao D, Barry S, Kmetz D, Egger M, Pan J, Rai SN, Qu J, McMasters KM, Hao H (2016) Melanoma cell-derived exosomes promote epithelial-mesenchymal transition in primary melanocytes through paracrine/autocrine signaling in the tumor microenvironment. *Cancer Lett* 376:318-327
135. Luan W, Ding Y, Xi H, Ruan H, Lu F, Ma S, Wang J (2021) Exosomal miR-106b-5p derived from melanoma cell promotes primary melanocytes epithelial-mesenchymal transition through targeting EphA4. *J Exp Clin Cancer Res* 40:107
136. Hu T, Hu J (2019) Melanoma-derived exosomes induce reprogramming fibroblasts into cancer-associated fibroblasts via Gm26809 delivery. *Cell Cycle* 18:3085-3094
137. Wang C, Wang Y, Chang X, Ba X, Hu N, Liu Q, Fang L, Wang Z (2020) Melanoma-Derived Exosomes Endow Fibroblasts with an Invasive Potential via miR-21 Target Signaling Pathway. *Cancer Manag Res Volume* 12:12965-12974
138. Lazar I, Clement E, Ducoux-Petit M, et al (2015) Proteome characterization of melanoma exosomes reveals a specific signature for metastatic cell lines. *Pigment Cell Melanoma Res* 28:464-475
139. Robbins PD, Morelli AE (2014) Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat Rev Immunol* 14:195-208
140. Chen G, Huang AC, Zhang W, et al (2018) Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. *Nature* 560:382-386
141. Shu S, Matsuzaki J, Want MY, et al (2020) An Immunosuppressive Effect of Melanoma-derived Exosomes on NY-ESO-1 Antigen-specific Human CD8⁺ T Cells is Dependent on IL-10 and Independent of BRAF^{V600E} Mutation in Melanoma Cell Lines. *Immunol Invest* 49:744-757
142. Döchler M, Czernek L, Peczek L, Cypriak W, Sztiller-Sikorska M, Czyz M (2019) Melanoma-Derived Extracellular Vesicles Bear the Potential for the Induction of Antigen-Specific Tolerance. *Cells* 8:665
143. Sharma P, Diergaard B, Ferrone S, Kirkwood JM, Whiteside TL (2020) Melanoma cell-derived exosomes in plasma of melanoma patients suppress functions of immune effector cells. *Sci Rep* 10:92
144. Panigrahi GK, Ramteke A, Birks D, et al (2018) Exosomal microRNA profiling to identify hypoxia-related biomarkers in prostate cancer. *Oncotarget* 9:13894-13910
145. Huang Z, Feng Y (2017) Exosomes Derived From Hypoxic Colorectal Cancer Cells Promote Angiogenesis Through Wnt4-Induced β -Catenin Signaling in Endothelial Cells. *Oncol Res Featur Preclin Clin Cancer Ther* 25:651-661
146. Chen F, Xu B, Li J, Yang X, Gu J, Yao X, Sun X (2021) Hypoxic tumour cell-derived exosomal miR-340-5p promotes radioresistance of oesophageal squamous cell carcinoma via KLF10. *J Exp Clin Cancer Res* 40:38

147. He G, Peng X, Wei S, et al (2022) Exosomes in the hypoxic TME: from release, uptake and biofunctions to clinical applications. *Mol Cancer* 21:19
148. Wozniak M, Peczek L, Czernek L, Döchler M (2017) Analysis of the miRNA Profiles of Melanoma Exosomes Derived Under Normoxic and Hypoxic Culture Conditions. *Anticancer Res.* <https://doi.org/10.21873/anticancerres.12138>
149. 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
150. Logozzi M, Mizzoni D, Angelini D, Di Raimo R, Falchi M, Battistini L, Fais S (2018) Microenvironmental pH and Exosome Levels Interplay in Human Cancer Cell Lines of Different Histotypes. *Cancers* 10:370
151. Shu SL, Yang Y, Allen CL, et al (2018) Metabolic reprogramming of stromal fibroblasts by melanoma exosome microRNA favours a pre-metastatic microenvironment. *Sci Rep* 8:12905
152. Federici C, Petrucci F, Caimi S, et al (2014) Exosome Release and Low pH Belong to a Framework of Resistance of Human Melanoma Cells to Cisplatin. *PLoS ONE* 9:e88193
153. Parolini I, Federici C, Raggi C, et al (2009) Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *J Biol Chem* 284:34211-34222
154. Cheng L, Hill AF (2022) Therapeutically harnessing extracellular vesicles. *Nat Rev Drug Discov* 21:379-399
155. Ciferri MC, Quarto R, Tasso R (2021) Extracellular Vesicles as Biomarkers and Therapeutic Tools: From Pre-Clinical to Clinical Applications. *Biology* 10:359
156. Pietrowska M, Zebrowska A, Gawin M, et al (2021) Proteomic profile of melanoma cell-derived small extracellular vesicles in patients' plasma: a potential correlate of melanoma progression. *J Extracell Vesicles* 10:e12063
157. Logozzi M, De Milito A, Lugini L, et al (2009) High Levels of Exosomes Expressing CD63 and Caveolin-1 in Plasma of Melanoma Patients. *PLoS ONE* 4:e5219
158. Alegre E, Zubiri L, Perez-Gracia JL, González-Cao M, Soria L, Martín-Algarra S, González A (2016) Circulating melanoma exosomes as diagnostic and prognosis biomarkers. *Clin Chim Acta* 454:28-32
159. Xie X, Nie H, Zhou Y, et al (2019) Eliminating blood oncogenic exosomes into the small intestine with aptamer-functionalized nanoparticles. *Nat Commun* 10:5476
160. Figuera-Losada M, Stathis M, Dorskind JM, et al (2015) Cambinol, a Novel Inhibitor of Neutral Sphingomyelinase 2 Shows Neuroprotective Properties. *PLOS ONE* 10:e0124481
161. Li J, Liu K, Liu Y, et al (2013) Exosomes mediate the cell-to-cell transmission of IFN- α -induced antiviral activity. *Nat Immunol* 14:793-803
162. Kim JH, Lee C-H, Baek M-C (2022) Dissecting exosome inhibitors: therapeutic insights into small-molecule chemicals against cancer. *Exp Mol Med* 54:1833-1843
163. Datta A, Kim H, McGee L, et al (2018) High-throughput screening identified selective inhibitors of exosome biogenesis and secretion: A drug repurposing strategy for advanced cancer. *Sci Rep* 8:8161
164. Johnson JL, Hong H, Monfregola J, Catz SD (2011) Increased Survival and Reduced Neutrophil Infiltration of the Liver in Rab27a- but Not Munc13-4-Deficient Mice in Lipopolysaccharide-Induced Systemic Inflammation ∇ . *Infect Immun* 79:3607-3618
165. Martin L-A, Head JE, Pancholi S, Salter J, Quinn E, Detre S, Kaye S, Howes A, Dowsett M, Johnston SRD (2007) The farnesyltransferase inhibitor R115777 (tipifarnib) in combination with tamoxifen acts synergistically to inhibit MCF-7 breast cancer cell proliferation and cell cycle progression *in vitro* and *in vivo*. *Mol Cancer Ther* 6:2458-2467
166. Yang Y, Li C-W, Chan L-C, et al (2018) Exosomal PD-L1 harbors active defense function to suppress T cell killing of breast cancer cells and promote tumor growth. *Cell Res* 28:862-864
167. Poggio M, Hu T, Pai C-C, et al (2019) Suppression of Exosomal PD-L1 Induces Systemic Anti-tumor Immunity and Memory. *Cell* 177:414-427.e13
168. Phuyal S, Hessvik NP, Skotland T, Sandvig K, Llorente A (2014) Regulation of exosome release by glycosphingolipids and flotillins. *FEBS J* 281:2214-2227

169. Roy S, Hochberg FH, Jones PS (2018) Extracellular vesicles: the growth as diagnostics and therapeutics; a survey. *J Extracell Vesicles* 7:1438720
170. Duong A, Parmar G, Kirkham AM, Burger D, Allan DS (2023) Registered clinical trials investigating treatment with cell-derived extracellular vesicles: a scoping review. *Cytotherapy* 25:939-945
171. Tutrone R, Lowentritt B, Neuman B, et al (2023) ExoDx prostate test as a predictor of outcomes of high-grade prostate cancer - an interim analysis. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 26:596-601
172. Castellanos-Rizaldos E, Zhang X, Tadigotla VR, Grimm DG, Karlovich C, Raez LE, Skog JK (2019) Exosome-based detection of activating and resistance *EGFR* mutations from plasma of non-small cell lung cancer patients. *Oncotarget* 10:2911-2920
173. 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
174. 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
175. Stenmark H (2009) Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:513-525
176. Izumi T (2021) In vivo Roles of Rab27 and Its Effectors in Exocytosis. *Cell Struct Funct* 46:79-94
177. Fukuda M (2013) Rab27 effectors, pleiotropic regulators in secretory pathways. *Traffic Cph Den* 14:949-963
178. Barral DC, Ramalho JS, Anders R, Hume AN, Knapton HJ, Tolmachova T, Collinson LM, Goulding D, Authi KS, Seabra MC (2002) Functional redundancy of Rab27 proteins and the pathogenesis of Griscelli syndrome. *J Clin Invest* 110:247-257
179. Tolmachova T, Anders R, Stinchcombe J, Bossi G, Griffiths GM, Huxley C, Seabra MC (2004) A general role for Rab27a in secretory cells. *Mol Biol Cell* 15:332-344
180. Alzahofi N, Welz T, Robinson CL, et al (2020) Rab27a co-ordinates actin-dependent transport by controlling organelle-associated motors and track assembly proteins. *Nat Commun* 11:3495
181. Fukuda M, Kuroda TS, Mikoshiba K (2002) Slac2-a/melanophilin, the missing link between Rab27 and myosin Va: implications of a tripartite protein complex for melanosome transport. *J Biol Chem* 277:12432-12436
182. Hume AN, Collinson LM, Rapak A, Gomes AQ, Hopkins CR, Seabra MC (2001) Rab27a regulates the peripheral distribution of melanosomes in melanocytes. *J Cell Biol* 152:795-808
183. Meeths M, Bryceson YT, Rudd E, et al (2010) Clinical presentation of Griscelli syndrome type 2 and spectrum of RAB27A mutations. *Pediatr Blood Cancer* 54:563-72
184. Arias-Hervert ER, Xu N, Njus M, Murphy GG, Hou Y, Williams JA, Lentz SI, Ernst SA, Stuenkel EL (2020) Actions of Rab27B-GTPase on mammalian central excitatory synaptic transmission. *Physiol Rep* 8:e14428
185. Herrero-Turrión MJ, Calafat J, Janssen H, Fukuda M, Mollinedo F (2008) Rab27a regulates exocytosis of tertiary and specific granules in human neutrophils. *J Immunol Baltim Md* 1950 181:3793-3803
186. Singh RK, Mizuno K, Wasmeier C, Wavre-Shapton ST, Recchi C, Catz SD, Futter C, Tolmachova T, Hume AN, Seabra MC (2013) Distinct and opposing roles for Rab27a/Mlph/MyoVa and Rab27b/Munc13-4 in mast cell secretion. *FEBS J* 280:892-903
187. Liu D, Meckel T, Long EO (2010) Distinct Role of Rab27a in Granule Movement at the Plasma Membrane and in the Cytosol of NK Cells. *PLoS ONE* 5:e12870
188. Tolmachova T, Åbrink M, Futter CE, Authi KS, Seabra MC (2007) Rab27b regulates number and secretion of platelet dense granules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:5872-5877
189. Holt O, Kanno E, Bossi G, Booth S, Daniele T, Santoro A, Arico M, Saegusa C, Fukuda M, Griffiths GM (2008) Slp1 and Slp2-a localize to the plasma membrane of CTL and contribute to secretion from the immunological synapse. *Traffic Cph Den* 9:446-457

190. Tsuruda M, Yoshino H, Okamura S, Kuroshima K, Osako Y, Sakaguchi T, Sugita S, Tatarano S, Nakagawa M, Enokida H (2020) Oncogenic effects of RAB27B through exosome independent function in renal cell carcinoma including sunitinib-resistant. *PloS One* 15:e0232545
191. 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
192. Worst TS, Meyer Y, Gottschalt M, Weis C-A, von Hardenberg J, Frank C, Steidler A, Michel MS, Erben P (2017) RAB27A, RAB27B and VPS36 are downregulated in advanced prostate cancer and show functional relevance in prostate cancer cells. *Int J Oncol* 50:920-932
193. Li R, Dong C, Jiang K, Sun R, Zhou Y, Yin Z, Lv J, Zhang J, Wang Q, Wang L (2020) Rab27B enhances drug resistance in hepatocellular carcinoma by promoting exosome-mediated drug efflux. *Carcinogenesis* 41:1583-1591
194. Broner EC, Onallah H, Tavor Re'em T, Davidson B, Reich R (2020) Role of the Exosome Secretion Machinery in Ovarian Carcinoma: *In Vitro* and *In Vivo* Models. *J Oncol* 2020:e4291827
195. Huang H, Hou J, Liu K, et al (2021) RAB27A-dependent release of exosomes by liver cancer stem cells induces Nanog expression in their differentiated progenies and confers regorafenib resistance. *J Gastroenterol Hepatol* 36:3429-3437
196. Chen L, Guo P, He Y, et al (2018) HCC-derived exosomes elicit HCC progression and recurrence by epithelial-mesenchymal transition through MAPK/ERK signalling pathway. *Cell Death Dis* 9:513
197. Wang M, Cai Y, Peng Y, Xu B, Hui W, Jiang Y (2020) Exosomal LGALS9 in the cerebrospinal fluid of glioblastoma patients suppressed dendritic cell antigen presentation and cytotoxic T-cell immunity. *Cell Death Dis* 11:896
198. Wills CA, Liu X, Chen L, Zhao Y, Dower CM, Sundstrom J, Wang H-G (2021) Chemotherapy-Induced Upregulation of Small Extracellular Vesicle-Associated PTX3 Accelerates Breast Cancer Metastasis. *Cancer Res* 81:452-463
199. Webber JP, Spary LK, Sanders AJ, et al (2015) Differentiation of tumour-promoting stromal myofibroblasts by cancer exosomes. *Oncogene* 34:290-302
200. Dong P, Wang Y, Liu Y, Zhu C, Lin J, Qian R, Hua L, Lu C (2022) BMAL1 induces colorectal cancer metastasis by stimulating exosome secretion. *Mol Biol Rep* 49:373-384
201. Chen G-H, Yang J-G, Xia H-F, Zhang L-Z, Chen Y-H, Wang K-M, Duan X, Wu L-Z, Zhao Y-F, Chen G (2022) Endothelial cells induce degradation of ECM through enhanced secretion of MMP14 carried on extracellular vesicles in venous malformation. *Cell Tissue Res* 389:517-530
202. Feng Y, Zhong X, Tang T-T, et al (2020) Rab27a dependent exosome releasing participated in albumin handling as a coordinated approach to lysosome in kidney disease. *Cell Death Dis* 11:513
203. Zhou W, Zheng X, Cheng C, Guo G, Zhong Y, Liu W, Liu K, Chen Y, Liu S, Liu S (2021) Rab27a deletion impairs the therapeutic potential of endothelial progenitor cells for myocardial infarction. *Mol Cell Biochem* 476:797-807
204. Ma X, Zhao J, Li S, Wang Y, Liu J, Shi Y, Liu J, Chen Y, Chen Y, Pan Q (2022) Rab27a-dependent exosomes protect against cerebral ischemic injury by reducing endothelial oxidative stress and apoptosis. *CNS Neurosci Ther* 28:1596-1612
205. Bobrie A, Krumeich S, Reyal 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
206. Okoye IS, Coomes SM, Pelly VS, Czieso S, Papayannopoulos V, Tolmachova T, Seabra MC, Wilson MS (2014) MicroRNA-containing T-regulatory-cell-derived exosomes suppress pathogenic T helper 1 cells. *Immunity* 41:89-103
207. Alexander M, Ramstead AG, Bauer KM, et al (2017) Rab27-dependent exosome production inhibits chronic inflammation and enables acute responses to inflammatory stimuli. *J Immunol* Baltim Md 1950 199:3559-3570

208. Li Z, Fang R, Fang J, He S, Liu T (2018) Functional implications of Rab27 GTPases in Cancer. *Cell Commun Signal CCS* 16:44
209. van Solinge TS, Abels ER, van de Haar LL, Hanlon KS, Maas SLN, Schnoor R, de Vrij J, Breakefield XO, Broekman MLD (2020) Versatile Role of Rab27a in Glioma: Effects on Release of Extracellular Vesicles, Cell Viability, and Tumor Progression. *Front Mol Biosci* 7:554649
210. Ostenfeld MS, Jeppesen DK, Laurberg JR, et al (2014) Cellular disposal of miR23b by RAB27-dependent exosome release is linked to acquisition of metastatic properties. *Cancer Res* 74:5758-5771
211. Li W, Hu Y, Jiang T, Han Y, Han G, Chen J, Li X (2014) Rab27A regulates exosome secretion from lung adenocarcinoma cells A549: involvement of EPI64. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 122:1080-1087
212. Nambara S, Masuda T, Hirose K, et al (2023) Rab27b, a Regulator of Exosome Secretion, Is Associated With Peritoneal Metastases in Gastric Cancer. *Cancer Genomics - Proteomics* 20:30-39
213. Liu J, Gong X, Zhu X, Xue D, Liu Y, Wang P (2017) Rab27A overexpression promotes bladder cancer proliferation and chemoresistance through regulation of NF- κ B signaling. *Oncotarget* 8:75272-75283
214. Wu G, Niu M, Qin J, Wang Y, Tian J (2019) Inactivation of Rab27B-dependent signaling pathway by calycosin inhibits migration and invasion of ER-negative breast cancer cells. *Gene* 709:48-55
215. Hendrix A, Maynard D, Pauwels P, et al (2010) Effect of the secretory small GTPase Rab27B on breast cancer growth, invasion, and metastasis. *J Natl Cancer Inst* 102:866-880
216. Zhang J-X, Huang X-X, Cai M-B, et al (2012) Overexpression of the secretory small GTPase Rab27B in human breast cancer correlates closely with lymph node metastasis and predicts poor prognosis. *J Transl Med* 10:242
217. Bao J, Ni Y, Qin H, et al (2014) Rab27b is a potential predictor for metastasis and prognosis in colorectal cancer. *Gastroenterol Res Pract* 2014:913106
218. Yu F, Wu W, Liang M, Huang Y, Chen C (2020) Prognostic Significance of Rab27A and Rab27B Expression in Esophageal Squamous Cell Cancer. *Cancer Manag Res* 12:6353-6361
219. Meng C, Huang L, Fu X, Wu B, Lin L (2022) RAB27B inhibits proliferation and promotes apoptosis of leukemic cells via 3-Hydroxy butyrate dehydrogenase 2 (BDH2). *Bioengineered* 13:5103-5112
220. Dong W, Cui J, Yang J, Li W, Wang S, Wang X, Li X, Lu Y, Xiao W (2015) Decreased expression of Rab27A and Rab27B correlates with metastasis and poor prognosis in colorectal cancer. *Discov Med* 20:357-367
221. Yang X, Ye X, Sun L, Gao F, Li Y, Ji X, Wang X, Feng Y, Wang X (2017) Downregulation of serum RAB27B confers improved prognosis and is associated with hepatocellular carcinoma progression through PI3K-AKT-P21 signaling. *Oncotarget* 8:61118-61132
222. Koh HM, Song DH (2019) Prognostic role of Rab27A and Rab27B expression in patients with non-small cell lung carcinoma. *Thorac Cancer* 10:143-149
223. Wang H, Zhao Y, Zhang C, Li M, Jiang C, Li Y (2014) Rab27a Was Identified as a Prognostic Biomarker by mRNA Profiling, Correlated with Malignant Progression and Subtype Preference in Gliomas. *PLOS ONE* 9:e89782
224. Ren P, Yang X-Q, Zhai X-L, Zhang Y-Q, Huang J-F (2016) Overexpression of Rab27B is correlated with distant metastasis and poor prognosis in ovarian cancer. *Oncol Lett* 12:1539-1545
225. Wang Q, Ni Q, Wang X, Zhu H, Wang Z, Huang J (2015) High expression of RAB27A and TP53 in pancreatic cancer predicts poor survival. *Med Oncol Northwood Lond Engl* 32:372
226. Zhao H, Wang Q, Wang X, Zhu H, Zhang S, Wang W, Wang Z, Huang J (2016) Correlation Between RAB27B and p53 Expression and Overall Survival in Pancreatic Cancer. *Pancreas* 45:204-210
227. An HJ, Song DH, Koh HM, et al (2019) Rab27A Is An Independent Prognostic Factor in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Biomark Med* 13:239-247

228. Ho JR, Chapeaublanc E, Kirkwood L, Nicolle R, Benhamou S, Leuret T, Allory Y, Southgate J, Radvanyi F, Goud B (2012) Deregulation of Rab and Rab effector genes in bladder cancer. *PloS One* 7:e39469
229. Sztiller-Sikorska M, Hartman ML, Talar B, Jakubowska J, Zalesna I, Czyz M (2015) Phenotypic diversity of patient-derived melanoma populations in stem cell medium. *Lab Invest J Tech Methods Pathol* 95:672-683
230. Koh HM, Jang BG, Kim DC (2020) Prognostic significance of Rab27 expression in solid cancer: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 10:14136
231. Jaé N, McEwan DG, Manavski Y, Boon RA, Dimmeler S (2015) Rab7a and Rab27b control secretion of endothelial microRNA through extracellular vesicles. *FEBS Lett* 589:3182-3188
232. Ramirez MI, Amorim MG, Gadelha C, et al (2018) Technical challenges of working with extracellular vesicles. *Nanoscale* 10:881-906
233. Margolis L, Sadovsky Y (2019) The biology of extracellular vesicles: The known unknowns. *PLOS Biol* 17:e3000363
234. Shekari F, Alibhai FJ, Baharvand H, et al (2023) Cell culture-derived extracellular vesicles: Considerations for reporting cell culturing parameters. *J Extracell Biol* 2:e115
235. Lehrich B, Liang Y, Khosravi P, Federoff H, Fiandaca M (2018) Fetal Bovine Serum-Derived Extracellular Vesicles Persist within Vesicle-Depleted Culture Media. *Int J Mol Sci* 19:3538
236. Shlomovitz I, Erlich Z, Arad G, et al (2021) Proteomic analysis of necroptotic extracellular vesicles. *Cell Death Dis* 12:1059
237. Willms E, Johansson HJ, Mäger I, et al (2016) Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. *Sci Rep* 6:22519
238. Zhang H, Freitas D, Kim HS, et al (2018) Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation. *Nat Cell Biol* 20:332-343
239. Hurwitz SN, Rider MA, Bundy JL, Liu X, Singh RK, Meckes DG (2016) Proteomic profiling of NCI-60 extracellular vesicles uncovers common protein cargo and cancer type-specific biomarkers. *Oncotarget* 7:86999-87015
240. Hoshino A, Kim HS, Bojmar L, et al (2020) Extracellular Vesicle and Particle Biomarkers Define Multiple Human Cancers. *Cell* 182:1044-1061.e18
241. Kugeratski FG, Hodge K, Lilla S, McAndrews KM, Zhou X, Hwang RF, Zanivan S, Kalluri R (2021) Quantitative proteomics identifies the core proteome of exosomes with syntenin-1 as the highest abundant protein and a putative universal biomarker. *Nat Cell Biol* 23:631-641
242. Auger C, Brunel A, Darbas T, Akil H, Perraud A, Bégaud G, Bessette B, Christou N, Verdier M (2022) Extracellular Vesicle Measurements with Nanoparticle Tracking Analysis: A Different Appreciation of Up and Down Secretion. *Int J Mol Sci* 23:2310
243. Li Q, Zhao H, Dong W, et al (2022) RAB27A promotes the proliferation and invasion of colorectal cancer cells. *Sci Rep* 12:19359
244. Li J, Jin Q, Huang F, Tang Z, Huang J (2017) Effects of Rab27A and Rab27B on Invasion, Proliferation, Apoptosis, and Chemoresistance in Human Pancreatic Cancer Cells. *Pancreas* 46:1173-1179
245. Tsuruda M, Yoshino H, Okamura S, Kuroshima K, Osako Y, Sakaguchi T, Sugita S, Tatarano S, Nakagawa M, Enokida H (2020) Oncogenic effects of RAB27B through exosome independent function in renal cell carcinoma including sunitinib-resistant. *PloS One* 15:e0232545
246. Vincent KM, Postovit L-M (2017) Investigating the utility of human melanoma cell lines as tumour models. *Oncotarget* 8:10498-10509
247. 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
248. Tan Y, Tang F, Li J, Yu H, Wu M, Wu Y, Zeng H, Hou K, Zhang Q (2022) Tumor-derived exosomes: the emerging orchestrators in melanoma. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother* 149:112832
249. Gowda R, Robertson BM, Iyer S, Barry J, Dinavahi SS, Robertson GP (2020) The role of exosomes in metastasis and progression of melanoma. *Cancer Treat Rev* 85:101975

250. Ren J-G, Xing B, Lv K, et al (2023) RAB27B controls palmitoylation-dependent NRAS trafficking and signaling in myeloid leukemia. *J Clin Invest* 133:e165510
251. Yilmaz A, Loustau T, Salomé N, Poilil Surendran S, Li C, Tucker RP, Izzi V, Lamba R, Koch M, Orend G (2022) Advances on the roles of tenascin-C in cancer. *J Cell Sci* 135:jcs260244
252. Zhai B-T, Tian H, Sun J, Zou J-B, Zhang X-F, Cheng J-X, Shi Y-J, Fan Y, Guo D-Y (2022) Urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) as a therapeutic target in cancer. *J Transl Med* 20:135
253. Wang Z (2017) ErbB Receptors and Cancer. In: Wang Z (ed) *ErbB Recept. Signal*. Springer New York, New York, NY, pp 3-35
254. Liu S, Geng R, Lin E, Zhao P, Chen Y (2021) ERBB1/2/3 Expression, Prognosis, and Immune Infiltration in Cutaneous Melanoma. *Front Genet* 12:602160
255. Boone B, Jacobs K, Ferdinande L, Taideman J, Lambert J, Peeters M, Bracke M, Pauwels P, Brochez L (2011) EGFR in melanoma: clinical significance and potential therapeutic target. *J Cutan Pathol* 38:492-502
256. Reschke M, Mihic-Probst D, Van Der Horst EH, Knyazev P, Wild PJ, Hutterer M, Meyer S, Dummer R, Moch H, Ullrich A (2008) HER3 Is a Determinant for Poor Prognosis in Melanoma. *Clin Cancer Res* 14:5188-5197
257. Kumar R, George B, Campbell MR, Verma N, Paul AM, Melo-Alvim C, Ribeiro L, Pillai MR, Da Costa LM, Moasser MM (2020) HER family in cancer progression: From discovery to 2020 and beyond. In: *Adv. Cancer Res*. Elsevier, pp 109-160
258. Tworkoski K, Singhal G, Szpakowski S, Zito CI, Bacchiocchi A, Muthusamy V, Bosenberg M, Krauthammer M, Halaban R, Stern DF (2011) Phosphoproteomic Screen Identifies Potential Therapeutic Targets in Melanoma. *Mol Cancer Res* 9:801-812
259. Shteinman ER, Vergara IA, Rawson RV, et al (2023) Molecular and clinical correlates of HER3 expression highlights its potential role as a therapeutic target in melanoma. *Pathology (Phila)* 55:629-636
260. Tiwary S, Preziosi M, Rothberg PG, Zeitouni N, Corson N, Xu L (2014) ERBB3 is required for metastasis formation of melanoma cells. *Oncogenesis* 3:e110-e110
261. Abel EV, Basile KJ, Kugel CH, et al (2013) Melanoma adapts to RAF/MEK inhibitors through FOXD3-mediated upregulation of ERBB3. *J Clin Invest* 123:2155-2168
262. Hüser L, Kokkaleniou M-M, Granados K, et al (2020) HER3-Receptor-Mediated STAT3 Activation Plays a Central Role in Adaptive Resistance toward Vemurafenib in Melanoma. *Cancers* 12:3761
263. I-Ju Leu J, Murphy ME, George DL (2022) Targeting ErbB3 and Cellular NADPH/NADP⁺ Abundance Sensitizes Cutaneous Melanomas to Ferroptosis Inducers. *ACS Chem Biol* 17:1038-1044
264. Potti A, Hille RC, Koch M (2003) Immunohistochemical determination of HER-2/neu overexpression in malignant melanoma reveals no prognostic value, while c-Kit (CD117) overexpression exhibits potential therapeutic implications. *J Carcinog* 2:8
265. Kluger HM, DiVito K, Berger AJ, Halaban R, Ariyan S, Camp RL, Rimm DL (2004) Her2/neu is not a commonly expressed therapeutic target in melanoma - a large cohort tissue microarray study. *Melanoma Res* 14:207-210
266. Inman JL, Kute T, White W, Pettenati M, Levine EA (2003) Absence of HER2 overexpression in metastatic malignant melanoma. *J Surg Oncol* 84:82-88
267. Rákossy Z, Vízkeleti L, Ecsedi S, et al (2007) EGFR gene copy number alterations in primary cutaneous malignant melanomas are associated with poor prognosis. *Int J Cancer* 121:1729-1737
268. Amaral TMS, Pop OT, Chatziioannou E, et al (2023) EGFR expression and relapse in patients with melanoma receiving adjuvant PD-1-based immunotherapy. *J Clin Oncol* 41:e21566-e21566

269. Sparrow LE, Heenan PJ (1999) Differential expression of epidermal growth factor receptor in melanocytic tumours demonstrated by immunohistochemistry and mRNA *in situ* hybridization. *Australas J Dermatol* 40:19-24
270. Zhang K, Wong P, Duan J, Jacobs B, Borden EC, Bedogni B (2013) An ERBB3/ERBB2 oncogenic unit plays a key role in NRG1 signaling and melanoma cell growth and survival. *Pigment Cell Melanoma Res* 26:408-414
271. Capparelli C, Rosenbaum S, Berman-Booty LD, et al (2015) ErbB3-ErbB2 Complexes as a Therapeutic Target in a Subset of Wild-type BRAF/NRAS Cutaneous Melanomas. *Cancer Res* 75:3554-3567
272. Ueno Y, Sakurai H, Tsunoda S, Choo M, Matsuo M, Koizumi K, Saiki I (2008) Heregulin-induced activation of ErbB3 by EGFR tyrosine kinase activity promotes tumor growth and metastasis in melanoma cells. *Int J Cancer* 123:340-347
273. He Y, Sun MM, Zhang GG, Yang J, Chen KS, Xu WW, Li B (2021) Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther* 6:425
274. Cargnello M, Roux PP (2011) Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* 75:50-83
275. Shimada-Sugawara M, Sakai E, Okamoto K, Fukuda M, Izumi T, Yoshida N, Tsukuba T (2015) Rab27A Regulates Transport of Cell Surface Receptors Modulating Multinucleation and Lysosome-Related Organelles in Osteoclasts. *Sci Rep* 5:9620
276. Huang J, Yang J-G, Ren J-G, et al (2023) Overexpression of RAB27A in Oral Squamous Cell Carcinoma Promotes Tumor Migration and Invasion via Modulation of EGFR Membrane Stability. *Int J Mol Sci* 24:13103
277. Walker GJ, Flores JF, Glendening JM, Lin A (Hsui-T, Markl IDC, Fountain JW (1998) Virtually 100% of melanoma cell lines harbor alterations at the DNA level within CDKN2A, CDKN2B, or one of their downstream targets. *Genes Chromosomes Cancer* 22:157-163
278. Ghandi M, Huang FW, Jané-Valbuena J, et al (2019) Next-generation characterization of the Cancer Cell Line Encyclopedia. *Nature* 569:503-508
279. Hartman ML, Sztiller-Sikorska M, Czyz M (2019) Whole-exome sequencing reveals novel genetic variants associated with diverse phenotypes of melanoma cells. *Mol Carcinog* 58:588-602

XI. Dorobek naukowy

Publikacje oryginalne i przeglądowe

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
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
3. **Horodecka K**, Döchler M (2021) CRISPR/Cas9: Principle, Applications, and Delivery through Extracellular Vesicles. *Int J Mol Sci* 22(11):6072
4. 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
5. 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
6. 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.

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)
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).

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 Immuno-Oncology, 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