

Scharakteryzowanie proteomu egzosomów uwalnianych z komórek poddanych stresowi genotoksycznemu

egzosomy, pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, promieniowanie jonizujące, proteom, spektrometria mas

Egzosomy są najmniejszymi przedstawicielami rodziny pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, pełniącymi kluczową rolę w komunikacji międzykomórkowej. Stopniowe odkrywanie ich niebagatelного znaczenia, zarówno w procesach fizjologicznych, jak i patogenezie wielu chorób, przyczyniło się do lawinowego wzrostu zainteresowania tymi strukturami w badaniach podstawowych i translacyjnych. Do kluczowych aspektów badań nad pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi należy dokładna charakterystyka ich składu obejmującego białka, lipidy, kwasy nukleinowe i metabolity. Spektrometria mas jest jednym z najcenniejszych narzędzi wykorzystywanych w analizie składu egzosomów, chociaż ze względu na specyfikę materiału badawczego (niewielka ilość analitów, wysokie ryzyko kontaminacji biologicznej i chemicznej próbki), uzyskanie wiarygodnych i powtarzalnych wyników wciąż stanowi ogromne wyzwanie, wymagające specyficznego podejścia eksperymentalnego.

Przedstawiona praca doktorska dotyczy charakterystyki składu białkowego egzosomów uwalnianych z komórek płaskonabłonkowego raka regionu głowy i szyi w odpowiedzi na promieniowanie jonizujące i ma formę spójnego tematycznie cyklu czterech opublikowanych artykułów. Jedna z tych prac (stanowiąca suplement do rozprawy) jest wprowadzeniem do zagadnień związanych z problematyką izolacji egzosomów oraz przygotowaniem próbek do analiz proteomicznych. Publikacja obejmuje porównanie metod izolacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych ze szczególnym uwzględnieniem ich potencjalnego wpływu na wynik analizy spektrometrycznej oraz zestawienie różnych strategii przygotowania próbek bezpośrednio do analizy proteomicznej. Wyszczególnione zostały również potencjalne źródła kontaminacji biologicznych i chemicznych mogących potencjalnie wpływać na wyniki analiz. Druga publikacja o charakterze przeglądowym zawiera podsumowanie wyników dotychczasowych badań proteomicznych poświęconych zmianom składu białkowego egzosomów uwalnianych przez komórki znajdujące się pod wpływem różnych czynników stresu komórkowego. W pracy ujęto doniesienia dotyczące działania szoku cieplnego, hipoksji, stresu oksydacyjnego, czynników genotoksycznych czy niedoboru składników odżywczych oraz potencjalnych konsekwencji tych zmian dla komórek docelowych. W dalszej części rozprawy przedstawiono pracę oryginalną poświęconą optymalizacji protokołu przygotowania próbek egzosomów, poczynawszy od zapewnienia odpowiednich warunków hodowli komórkowej (np. za sprawą redukcji zawartości surowicy bydlęcej oraz eliminacji bydlęcych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych), przez oczyszczanie próbki z białek niespecyficzenie związanych z izolowanymi egzosomami (np. chromatografią wykluczania), po zastosowanie różnych metod uwalniania białek egzosomalnych z przeznaczeniem do analizy spektrometrycznej. Cykl publikacji zamyka praca doświadczalna dotycząca analizy proteomicznej egzosomów uwalnianych z komórek płaskonabłonkowego raka regionu głowy i szyi traktowanych różnymi dawkami promieniowania jonizującego (2 – 8 Gy). Analiza funkcjonalna zidentyfikowanych białek wykazała, że egzosomy uwalniane z komórek poddanych działaniu promieniowania jonizującego były wzbogacone w białka związane z odpowiedzią komórkową na promieniowanie jonizujące, naprawą uszkodzeń DNA czy metabolizmem rodników tlenowych, co wskazywało na udział egzosomów w odpowiedzi na działanie czynników genotoksycznych.