



prof. dr hab. Michał Dadlez
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
ul. Pawińskiego 5A
02-106 Warszawa
tel. 0-22 5923470-75
e-mail: michald@ibb.waw.pl

Warszawa, 12.11.2019

Recenzja pracy doktorskiej p. mgr Agaty Abramowicz pt. „Scharakteryzowanie proteomu egzosomów uwalnianych z komórek poddanych stresowi genotoksycznemu”

Praca doktorska p. mgr Agaty Abramowicz podsumowuje własne wyniki prac eksperymentalnych zaprezentowane w dwu publikacjach i szerzej omówione na tle innych badań w dwu pracach przeglądowych. Rozprawa ma formę „zszywki” tych publikacji poprzedzonych krótkim wprowadzeniem. Prace dotyczą proteomiki egzosomów, ważnych substruktur komórkowych, wydzielanych na zewnątrz komórek, a uczestniczących w przekaźnictwie sygnału i zaangażowanych też w procesy patologiczne. Do rozprawy włączono również dwie prace przeglądowe. W pierwszej z nich opisano i porównano znane podejścia eksperymentalne poświęcone preparatyce egzosomów uzyskiwanych albo z hodowli komórkowych albo ze źródeł naturalnych. Ujawniona w poprzednich badaniach ważna rola egzosomów uruchomiła zainteresowanie proteomiką tych struktur, a raczej niesionego przez nie białkowego cargo, ponieważ białkowa zawartość egzosomów decyduje o ich funkcji i może stanowić ważny punkt uchwytu leków skierowanych na przerwanie patologicznej transmisji sygnałów mediowanej przez egzosomy. Publikacja pokazuje jak intensywnie eksplorowany jest temat ekstrakcji i oczyszczania egzosomów, i jak jest krytyczny dla uzyskania satysfakcjonujących rezultatów analiz proteomiki różnicowej. Zależą one od sukcesu w powtarzalnym uzyskiwaniu maksymalnie oczyszczonych egzosomów, pozbawionych białek pożywki i białek niespecyficznie wiążących się do egzosomów. Opracowane tabele i schematy dobrze ilustrują „drzewa wyboru” jakich eksperymentator musi dokonać między ultrawiroowaniem, filtracją, chromatografią SEC lub powinowactwa i wreszcie precypitacją, opracowując optymalną strategię ze świadomością wad i zalet różnych podejść. Autorzy podkreślają brak ustalonych standardów i potrzebę ich opracowania. Publikacja stanowi zatem dobre uzasadnienie własnych prób optymalizacji procedur preparatyki materiału zaprezentowanych w pierwszej publikacji eksperymentalnej. Przedstawiono w niej wyniki porównywania różnych kroków preparatyki egzosomów z wybranego zestawu linii komórkowych raka głowy i szyi, począwszy od wyznaczenia minimalnej zawartości serum w pożywce niezbędnej dla utrzymania 100 % przeżywalności komórek w 24 godzinnej hodowli. Następnie porównano efekt eliminacji zanieczyszczeń związanych z obecnością egzosomów bydlęcych w pożywce przez wstępne odwirowanie tych egzosomów lub użycie komercyjnie dostępnej pożywki pozbawionej egzosomów. Spośród sposobów separacji egzosomów i białek pożywki Autorka testuje jedynie chromatografię wykluczania, pozwalającą na uzyskanie frakcji, w której przeważają białka egzosomów. Porównują za to trzy metody dysrupcji egzosomów i ekstrakcji białek cargo uzyskane w jednym eksperymencie. Wyniki byłyby bardziej



przekonujące, gdyby zbadano powtarzalność uzyskanych rezultatów w bardziej znamiennej statystycznie serii, wnioski wysnute w oparciu o jednokrotny eksperyment nie pozwalają ocenić ich powtarzalności, zatem ich wartość jest niewielka. W rezultacie autorzy rekomendują jeden protokół zakładający hodowle komórek w medium o zmniejszonym stężeniu serum, pozbawionych egzosomów bydłowych, oczyszczanie egzosomów przez chromatografię SEC i eliminację białek serum na etapie analizy danych z użyciem kontrolnego przebiegu analizy proteomicznej samego serum.

Optymalizacja protokołu preparatyki egzosomów nie jest celem samym w sobie. Umożliwia prowadzenie eksperymentów proteomiki różnicowej białkowego komponentu egzosomów powstałych w różnych warunkach. Uważa się bowiem, że to skład białkowy egzosomów decyduje o ich funkcjonalności i indukuje ich protekcyjne i destrukcyjne działanie. Autorka w następnych dwu publikacjach podejmuje to wyzwanie wykonując analizę proteomiczną egzosomów uzyskanych podczas hodowli komórek raka głowy i szyi poddanych stresowi napromieniowania promieniowaniem jonizującym, a następnie podsumowując w przeglądówce wiedzę literaturową na temat podobnych eksperymentów. Zoptymalizowany protokół zastosowano do zmapowania różnic w składzie białkowym egzosomów linii komórkowej poddanej ekspozycji na 4 różne poziomy natężenia promieniowania. W analizie ilościowej wykorzystano program Protein Discoverer i miarę ilości białka zależną od wielkości sygnału trzech najsilniej reprezentowanych peptydów dla danego białka w procedurze „Precursors Ion Area”. Wartości tych sygnałów normalizowano w oparciu o parametr zwany Total Ion Count. Jak Autorka ocenia zastosowanie tej metody normalizacji, gdy grupa białek różnicowych nie jest marginalna, lecz obejmuje ponad 39 % białek i charakteryzują się one bardzo dużymi wartościami ratio, dla większości białek ponad 4,5 krotnymi wzrostami? Jeżeli 40% białek ma więcej niż 4,5-krotnie silniejszy sygnał w próbkach naświetlonych to znormalizowanie na sumę intensywności sygnałów białek nie różnicowych i różnicowych powoduje, że wiele z białek o prawdziwym ratio 1 na skutek tej normalizacji uzyska ratio różne od 1 i może zostać zakwalifikowane do grupy różnicowych. Metoda normalizacji na TIC działa prawidłowo gdy zaburzenie związane z obecnością białek różnicowych jest niewielkie lub gdy białka różnicowe są wyłącznie niskopopulowane, co chyba nie mam miejsca, ale też nie zostało to określone. Spośród ponad 1200 zidentyfikowanych białek prawie co trzecie białko okazało się wykazywać różne poziomy przed i po naświetleniu. Białka różnicowe identyfikowano na podstawie analizy „outlierów” rozkładu uzyskanych w eksperymencie wartości „ratio”, a nie klasycznej metodyki wyliczania wartości p. Przyjęto ten sposób postępowania za względu na „sample size – limited power of statistical testing”. Rzeczywiście, wyniki oparte są tylko na jednej preparatyce, trudno w tym przypadku w ogóle mówić o analizie statystycznej, bez powtórzeń eksperymentu ocena poziomu zmienności cechy jest niemożliwa, nie jest możliwe testowanie przynależności danej cechy do grupy białek różnicowych i nieróżnicowych, a tym samym nie jest możliwa ocena poziomu fałszywie pozytywnych rezultatów. Nie wiadomo zatem, jaka część z podanej listy białek różnicowych to artefakty. Szczególnie że, jak sami autorzy podkreślają, przyjęty sposób pomiaru wartości sygnału jest „półilościowy”. Brak analizy replikatów biologicznych, które zazwyczaj stosuje się, by można było zastosować analizę statystyczną, bez której trudno ocenić czy uzyskane rezultaty są powtarzalne znacznie obniża wartość i wiarygodność uzyskanego zestawu białek różnicowych. Dodatkowo, wynika też z tego, że nie można zastosować klasycznych metod analizy statystycznej danych proteomiki różnicowej. Opis zastosowanej nierutynowej metody ograniczono w publikacji do wskazania innej publikacji: Marczyk M1, Jaksik R, Polanski A, Polanska



J. (2013) BMC Bioinformatics. 2013 Mar 20;14:101. doi: 10.1186/1471-2105-14-101. „Adaptive filtering of microarray gene expression data based on Gaussian mixture decomposition.”, w której stosuje się rozkład na dystrybucje gaussowskie danych mikromacierzy w celu filtrowania nieinformatywnych cech.

Przeniesienie tej metodologii na dane proteomiczne, zwłaszcza jej zastosowanie do danych z jednego powtórzenia eksperymentu, wymagałoby bardziej dokładnego opisu, niż zamieszczony w publikacji, tak by zgodnie z wymogami sztuki możliwe było powtórzenie całego doświadczenia, łącznie z etapem analizy danych. Byłoby chociaż wskazane móc zapoznać się z uzyskanym rozkładem „ratio” i proponowanym rozkładem na składowe gaussowskie. Szkoda, że nie zostało to pokazane na przykład w sekcji „Supporting Materials”. Tak duża frakcja białek różnicowych o tak dużych wartościach „fold change” nie jest typowa dla eksperymentów proteomicznych i warto byłoby ten fakt bardziej dogłębnie przedyskutować. Nie ma też informacji o białkach, które były obecne tylko w jednym ze stanów przed lub po naświetlaniu. Czy takich nie było? Co więcej żadne z białek różnicowych nie wykazało trendu wzrostowego wraz ze zwiększeniem dawki promieniowania. Jak można skomentować ten niepokojący wynik?

Lista uzyskanych białek różnicowych i przeprowadzona analiza GO wskazuje raczej na protekcyjną funkcję zawartości białkowej egzosomów poddanych irradacji. Szkoda, że te wnioski nie opierają się na analizie odpowiedniej serii replikatów biologicznych. Oprócz badań własnych Autorka porównała ich wyniki z wynikami innych zespołów w pracy przeglądowej, dobrze ilustrującej narodziny tego nowego kierunku badawczego.

Odkładając na bok powyższe pytania, zrodzone raczej z ciekawości i chęci pobudzenia dyskusji, można stwierdzić, że praca Autorki przyczyniła się do usystematyzowania metodyki analiz proteomicznych bardzo ważnego obiektu badań biomedycznych, jakim są egzosomy. Zawężenie pola widzenia do frakcji egzosomalnej proteomu, pozbycie się w analizach proteomicznych często nieistotnego bagażu nieinformatywnych białek, daje nadzieję na stosunkowo łatwy dostęp do niskopopulowanych białek, potencjalnych markerów chorób, markerów postępu terapii, czy wręcz nowych celów terapeutycznych. Należy przypuszczać, że analizy egzosomów będą szybko zyskiwać na popularności i istotności i że opracowania kandydatki przydadzą się wielu zespołom. Autorka pokazała też przydatność zoptymalizowanego protokołu ekstrakcji proteomu egzosomalnego do wykonywania proteomicznych analiz różnicowych i uzyskała wstępne informacje na temat zmian składu proteomu egzosomów w komórkach poddanych stresowi naświetlenia promieniowaniem jonizującym.

W podsumowaniu, pani mgr Agata Abramowicz uzyskała rezultaty o istotnej wartości, obrany kierunek niewątpliwie będzie rozwijany w przyszłości. W przedstawionej rozprawie Autorka jasno opisała uzyskane rezultaty. Powyższa ocena pozwala wnioskować o dopuszczenie p. mgr Agaty Abramowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

prof. dr hab. Michał Dadlez