

Warszawa, 15 listopada 2019 r.

Prof. dr hab. Anna Lankoff
Centrum Radiobiologii i Dozymetrii Biologicznej
Instytut Chemii i Techniki Jądrowej
ul. Dorodna 16
03-195 Warszawa

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pani mgr Agaty Abramowicz

pt.: Scharakteryzowanie proteomu egzosomów uwalnianych z komórek poddanych stresowi genotoksycznemu

Recenzja została wykonana w odpowiedzi na pismo Koordynatora ds. przewodów doktorskich Rady Naukowej Centrum Onkologii – Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie, prof. dr hab. n. med. Zbigniewa Noweckiego, z dnia 22 października 2019 roku (pismo nr RNK-000/34119), w związku z decyzją Rady Naukowej Centrum Onkologii – Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie, na mocy której zostałam powołana na recenzenta rozprawy doktorskiej Pani mgr Agaty Abramowicz.

Rozprawa doktorska Pani mgr Agaty Abramowicz została przygotowana w Centrum Onkologii – Instytucie im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach, pod kierunkiem dr hab. Moniki Pietrowskiej. Rozprawa została przedstawiona w formie 92-stronicowego dzieła, obejmującego listę publikacji wchodzących w skład rozprawy, listę pozostałych publikacji, streszczenie rozprawy w języku polskim i angielskim, główne cele pracy, omówienie prac tworzących rozprawę doktorską, wnioski oraz zestaw czterech opublikowanych prac, wchodzących w skład rozprawy. Prace te są spójne tematycznie i zostały opublikowane w latach 2016–2019 w czasopismach naukowych znajdujących się w bazie Journal Citation Reports/Web of Science (Proteomes, Journal of Radiation Research, PLoS One oraz Molecular Biosystems). Zatem można uznać, że najbardziej istotna część rozprawy została już raz wstępnie zweryfikowana. Wszystkie publikacje są publikacjami wieloautorskimi, w których Doktorantka jest pierwszym autorem. Wkład pracy współautorów oraz Doktorantki w powstaniu publikacji został udokumentowany w stosownych oświadczeniach. Nie ma wątpliwości, że Doktorantka była głównym autorem koncepcji badań przedstawionych w pracy 1 i 4, autorem koncepcji i wykonawcą bardzo znacznej części badań eksperymentalnych we wszystkich 4 pracach oraz opracowania, analizy i interpretacji uzyskanych wyników. Bezdyskusyjny jest również udział Doktorantki w przygotowaniu i redakcji manuskryptów.

Przedstawiona rozprawa doktorska dotyczy charakterystyki składu białkowego egzosomów uwalnianych z komórek płaskonabłonkowego raka regionu głowy i szyi w odpowiedzi na promieniowanie jonizujące. Doktorantka postawiła sobie trzy zasadnicze cele:

1. opracowanie i optymalizację warunków hodowli komórkowej *in vitro* w doświadczeniach prowadzących do izolacji egzosomów z pożywki hodowlanej, między innymi w celu ograniczenia wpływu obecności pęcherzyków zewnątrzkomórkowych oraz białek pochodzenia surowiczego na wyniki analiz proteomicznych,
2. opracowanie i optymalizację metody izolacji egzosomów, zapewniającej materiał odpowiedni ilościowo i jakościowo do analiz proteomicznych z wykorzystaniem spektrometrii mas,
3. scharakteryzowanie proteomu egzosomów uwalnianych z komórek poddanych działaniu promieniowania jonizującego, w tym ocena wpływu dawki promieniowania jonizującego na skład białkowy egzosomów.

Punktem wyjścia do badań była pilna potrzeba standaryzacji metod badawczych egzosomów w celu poznania mechanizmów ich działania w komórkach docelowych. Zainteresowanie powyższą tematyką badawczą, która jest obecnie niezwykle aktualna, wynika z odkrycia kluczowego znaczenia tych małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w komunikacji międzykomórkowej oraz modulowaniu odpowiedzi immunologicznej. Chociaż termin „exosome” został po raz pierwszy zaproponowany przez Tramsa już w 1981 roku, to dopiero w ostatnich latach można obserwować bardzo duże zainteresowanie tymi strukturami. Na podstawie zestawienia danych z bazy PubMed wynika, że w ciągu 30 lat (1981-2011) opublikowano około 650 prac na temat egzosomów. Natomiast, w trakcie ostatnich 5 lat pojawiło się prawie 4.5 tysiąca prac o tej tematyce. Uzasadnione zainteresowanie egzosomami wynika z wykazania ich udziału w rozwoju niektórych chorób neurodegeneracyjnych i nowotworowych, szczególnie poprzez kształtowanie mikrośrodowiska guza. W związku z tym, jak najbardziej zasadnym jest opracowanie wiarygodnej metody izolacji egzosomów oraz poznanie ich składu białkowego w celu poznania mechanizmów ich działania.

Publikacja IV - Abramowicz A, Widlak P, Pietrowska M. Proteomic analysis of exosomal cargo: the challenge of high purity vesicle isolation. Mol Biosyst. 2016. 12(5):1407-19.

Zagadnienia związane z problematyką izolacji egzosomów oraz przygotowaniem próbek do analiz proteomicznych zostały przedstawione przez Doktorantkę w przeglądowej Publikacji IV. Publikacja ta 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. Doktorantka omawia w niej stosowane obecnie strategie izolacji egzosomów, znacznie różniące się pod względem metodyki i wydajności. Dynamiczny wzrost liczby publikacji naukowych dotyczących pęcherzyków zewnątrzkomórkowych znacznie utrudnia wypracowanie jednolitej metodyki prowadzenia badań w tej dziedzinie. Tymczasem zarówno właściwości materiału źródłowego, proces jego wstępnej obróbki, jak i wybór konkretnej metody izolacji, niesie ze sobą istotne konsekwencje ilościowe i jakościowe dla przygotowywanych próbek i bezpośrednio wpływa na wynik końcowy analiz. Doktorantka zwraca uwagę w ww. publikacji na rolę przeznaczenia izolowanych próbek przy wyborze procedury pozyskiwania egzosomów do badań oraz na ograniczenia związane z badaniami

egzosomów. Wskazuje między innymi na problemy wynikające z niewielkiej ilości materiału badawczego oraz obecność znacznych ilości zanieczyszczeń próbki, wynikających zarówno z wieloetapowej procedury izolacji (egzogenne zanieczyszczenia chemiczne, polimery, wysokie stężenia soli), jak i z obecności dużej ilości białek izolowanych wraz z pęcherzykami (endogenne zanieczyszczenia biologiczne, szczególnie białkami surowicy). Publikacja ta w zgrabny sposób uzasadnia wybrany przez Doktorantkę przedmiot badań własnych i stanowi bardzo dobre wprowadzenie do prac eksperymentalnych, związanych z opracowaniem metodyki przygotowania egzosomów pozyskiwanych z pożywki hodowlanej w warunkach *in vitro*, pozwalającej na uzyskanie odpowiednich jakościowo i ilościowo preparatów do wykonania analizy spektrometrycznej białek egzosomalnych.

Publikacja I - Abramowicz i wsp.: Different types of cellular stress affect the proteome composition of small extracellular vesicles: a mini review. *Proteomes*. 2019.7(2): E23.

Kolejna publikacja tworząca cykl prac wprowadza czytelnika w zagadnienia dotyczące badań proteomicznych, poświęconych zmianom składu białkowego egzosomów uwalnianych przez komórki znajdujące się pod wpływem różnych czynników stresu komórkowego. Doktorantka ujęła w pracy doniesienia dotyczące działania szoku cieplnego, hipoksji, stresu oksydacyjnego, czynników genotoksycznych czy niedoboru składników odżywczych oraz potencjalnych konsekwencji tych zmian dla komórek docelowych. Doktorantka przedstawiła również doniesienia wskazujące na to, że uwalniane egzosomy mogą indukować w komórkach niestymulowanych aktywację ścieżek sygnałowych bezpośrednio związanych z odpowiedzią na dany czynnik, mogą prowadzić do stymulacji proliferacji i migracji komórek docelowych czy wspierania procesu angiogenezy i modelowania macierzy zewnątrzkomórkowej. Pomimo intensywnych badań, wnoszących istotny wkład w poznanie egzosomów, kwestia wpływu czynników stresowych na skład białkowy egzosomów pozostaje wciąż zagadnieniem względnie słabo poznany. Publikacja ta stanowi bardzo dobre wprowadzenie do prac eksperymentalnych, związanych z analizą proteomiczną egzosomów uwalnianych z komórek płaskonabłonkowego raka regionu głowy i szyi traktowanych promieniowaniem jonizującym.

Publikacja III - Abramowicz i wsp.: Harmonization of exosome isolation from culture supernatants for optimized proteomics analysis. *PLoS One*. 2018. 13(10):e0205496.

W dalszej części rozprawy doktorskiej przedstawiono pracę oryginalną, poświęconą optymalizacji protokołu przygotowania próbek egzosomów, poczynawszy od zapewnienia odpowiednich warunków hodowli komórkowej, przez oczyszczanie próbki z białek niespecyficznie związanych z izolowanymi egzosomami, po zastosowanie różnych metod uwalniania białek egzosomalnych z przeznaczeniem do analizy spektrometrycznej. Modelem badawczym w prezentowanej pracy były ustalone linie komórek płaskonabłonkowego raka regionu głowy i szyi. Pierwszy etap badań, poświęcony opracowaniu procedury pozyskiwania i przygotowania egzosomów do analiz proteomicznych, rozpoczął się od zbadania potencjalnego wpływu warunków prowadzenia

eksperymentów na wyniki analizy proteomicznej egzosomów. Doktorantka stwierdziła, że krytycznym czynnikiem była płodowa surowica bydlęca, która jest jednym z powszechnie wykorzystywanych suplementów w hodowli komórek *in vitro*, warunkujących ich prawidłowy wzrost i podziały. W związku z tym, w dalszych badaniach Doktorantka przeanalizowała wpływ całkowitego wyeliminowania tego składnika z pożywki hodowlanej. W związku z istotną redukcją żywotności komórek w warunkach całkowitego niedoboru surowicy we wszystkich siedmiu liniach komórkowych, Doktorantka podjęła uzasadnioną decyzję o zachowaniu suplementacji, jednak przy zastosowaniu najniższej możliwej dawki, gwarantującej niezmienną żywotność komórek w założonym czasie. Następnie, Doktorantka podjęła próbę usunięcia pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pochodzenia odzwierzęcego z materiału badawczego. Uzyskane wyniki wykazały względnie niską efektywność oczyszczania przez ultrawirowanie, przy jednoczesnym braku obecności pęcherzyków w komercyjnym produkcie firmy Gibco.

W kolejnym etapie prac Doktorantka dokonała oceny przydatności wykorzystania chromatografii wykluczania w przygotowaniu próbek egzosomów do badań technikami spektrometrii masowej. Frakcje uzyskiwane w wyniku rozdzielania chromatograficznego zostały ocenione pod względem obecności białek markerowych dla egzosomów. Na tej podstawie wyciągnęła wniosek o skutecznej separacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych obecnych w początkowych frakcjach od białek uwalnianych z kolumny w późniejszych frakcjach. Doktorantka wykazała, że zastosowanie metody chromatografii wykluczania pozwoliło na istotną redukcję ilości białek surowiczych w próbkach zawierających egzosomy, choć ich całkowite wyeliminowanie nie było możliwe. Ponieważ obecność białek pochodzenia odzwierzęcego w próbkach egzosomów izolowanych w warunkach *in vitro* powoduje konieczność oceny ich potencjalnego wpływu na uzyskiwane wyniki analiz proteomicznych egzosomów oraz opracowania sposobu ograniczenia tego wpływu na etapie analizy danych, Doktorantka porównała listę białek zidentyfikowanych w próbce pozyskanej z pożywki nie mającej kontaktu z komórkami z listą 100 najczęściej identyfikowanych białek egzosomalnych (wg. bazy ExoCarta). Pozwoliło to na określenie 8 białek, których obecność była w rzeczywistości niezwiązana z obecnością egzosomów. Ponadto, Doktorantka wykazała nieskuteczność zaostżenia kryteriów przeszukiwania baz danych sekwencji białkowych do zbiorów sekwencji białek ludzkich w celu wyeliminowania wpływu białek bydlęcych na końcowy rezultat analiz, wynikającą z wysokiego podobieństwa sekwencji aminokwasowych niektórych białek ludzkich i bydlęcych. W dalszej części pracy Doktorantka porównała różne strategie przygotowania próbek egzosomów bezpośrednio do analiz spektrometrycznych. Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka stwierdziła, że ultradźwięki okazały się najmniej efektywne w uwalnianiu białek egzosomalnych, natomiast traktowanie acetonitrylem pozwoliło na zidentyfikowanie największej liczby białek, chociaż mrożenie/rozmarzanie oraz traktowanie detergentem nie wykazywały pod tym względem różnic istotnych statystycznie. W wyniku przeprowadzonych badań optymalizacyjnych Doktorantka zaproponowała schemat postępowania w badaniach proteomicznych pęcherzyków

zewnątrzkomórkowych, obejmujący etapy hodowli komórkowej, izolacji oraz trawienia i analizy danych.

Publikacja II - Abramowicz i wsp.: Ionizing radiation affects the composition of the proteome of extracellular vesicles released by head-and-neck cancer cells *in vitro*. J Radiat Res. 2019. 60(3):289-297.

Bardzo ciekawym aspektem rozprawy doktorskiej była analiza proteomiczna egzosomów uwalnianych z komórek płaskonabłonkowego raka regionu głowy i szyi traktowanych różnymi dawkami promieniowania jonizującego. Doktorantka wykonała serię eksperymentów z użyciem linii płaskonabłonkowego raka regionu głowy i szyi UM-SCC6. Komórki poddano działaniu promieniowania jonizującego w dawkach 2, 4 oraz 8 Gy a następnie po upływie 24 godzin zebrano pożywkę hodowlaną, którą procedowano zgodnie z opracowanym wcześniej protokołem. Otrzymana populacja pęcherzyków zewnątrzkomórkowych została scharakteryzowana przy użyciu mikroskopii elektronowej, metody dynamicznego rozpraszania światła oraz Western blot. Następnie białka zostały uwolnione ze struktury pęcherzykowej działaniem silnego detergentu jonowego w wysokiej temperaturze. Tak uzyskana mieszanina białkowa została zidentyfikowana przez Doktorantkę spektrometrycznie metodą „shotgun”. Białka egzosomalne zostały poddane działaniu trypsyny, a następnie rozdzielone chromatograficznie i analizowane w spektrometrze masowym sprzężonym z chromatografem cieczowym. W wyniku tej analizy Doktorantka zidentyfikowała białka kodowane przez ponad 1200 różnych genów. W ocenie ilościowej ponad 400 z nich wykazywało istotnie zwiększony, a blisko 50 z nich istotnie zmniejszony poziom w egzosomach uwalnianych po stymulacji promieniowaniem, w porównaniu ze składem pęcherzyków z komórek niestymulowanych. Co ciekawe, poziom żadnego ze zidentyfikowanych białek nie ujawniał wyraźnej zależności od zastosowanej dawki. Analiza funkcjonalna pokazała, że pośród białek, których ilość istotnie wzrastała w próbkach egzosomów po promieniowaniu były białka zaangażowane w odpowiedź komórek na promieniowanie, metabolizm wolnych rodników tlenowych, a także bezpośrednio biorących udział w naprawie DNA, co może wskazywać ich potencjalną funkcję w komórkach docelowych.

Podsumowanie

Reasumując, w opinii recenzenta cel pracy został sprecyzowany jasno i konkretnie. Treść założeń i rozumowań jest jednoznaczna. Metody badań zostały poprawnie dobrane. Wyniki pracy są spójne, wzbudzają wysoki stopień zaufania czytelnika i poszerzają w istotny sposób wiedzę na temat zalet i wad stosowania spektrometrii mas w badaniach egzosomów. Dyskusja własnych wyników badań prowadzona jest w sposób dowodzący doskonałej znajomości nie tylko piśmiennictwa, a także wiedzy ogólnej z zakresu pracy i dowodzi odwagi Autora w formułowaniu własnych wniosków, a także zdolności logicznego i syntetycznego myślenia. W opinii recenzenta uzyskane wyniki są nowatorskie i stanowią niezwykle istotny wkład do osiągnięć naukowych w Polsce i na świecie. Opracowanie metody izolacji egzosomów przez Doktorantkę oraz charakterystyka składu białkowego pęcherzyków

zewnątrzkomórkowych może znacząco przyczynić się do wyjaśnienia ich roli w organizmie. Natomiast wykazanie istotnej zmiany składu białkowego egzosomów po stymulacji czynnikiem genotoksycznym (promieniowaniem jonizującym), otwiera nowy rozdział nie tylko w badaniach podstawowych nad komunikacj  międzykomórkową, ale również w badaniach translacyjnych nad mechanizmem nabywania oporności na terapi  antynowotworowe. Przedstawione wnioski i zalecenia mogą być zastosowane nie tylko w warunkach badań *in vitro*, ale również w badaniach przedklinicznych i klinicznych egzosomów izolowanych z płynów ustrojowych, takich jak surowica czy osocze. Biorąc powyższe pod uwagę, ciekawi  mnie plany naukowe Doktorantki. Oceniając całość recenzowanej rozprawy należy uznać, iż jest ona świadectwem ogromnej pracowitości Doktorantki i bardzo dobrej znajomości podjętego tematu. Zawartość merytoryczna rozprawy, która została opublikowana w recenzowanych czasopismach, świadczy o jej dojrzałości naukowej, doskonałym warsztacie badawczym i w pełni uzasadniają ubieganie się o stopień doktora. Wnioskuj  zatem o dopuszczenie Pani mgr Agaty Abramowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na szeroki zakres prac doświadczalnych, ich interdyscyplinarność, wysoki poziom naukowy, nowatorski charakter i kluczowy wpły  na rozwój nauki oraz wartość praktyczną, wnioskuj  o wy r nienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Agaty Abramowicz.

Sune Lauko 