

Dr hab. Magdalena Łuczak, prof. ICHB PAN

Poznań, 08.03.2022

Zakład Proteomiki Biomedycznej

E-mail: magdału@ibch.poznan.pl

Recenzja pracy doktorskiej mgr Aleksandry Boguckiej zatytułowanej „Label-free mass spectrometry quantification of proteins linked to the oocyte quality in human follicular fluid: development of suitable methodology for clinical studies”.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w Pracowni Struktury Biopolimerów Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem dr hab. Stanisława Ołdzieja, profesora Uniwersytetu Gdańskiego.

Głównym celem pracy było opracowanie ilościowego podejścia proteomicznego do oceny jakości oocytów na podstawie zmian w proteomie płynu pęcherzykowego (hFF) kobiet przechodzących procedurę zapłodnienia pozaustrojowego. Ze względu na opisywane w literaturze różnice związane z jakością oocytów pobranych od tej samej pacjentki i tym samym ich różną zdolnością do zapłodnienia, temat ten wydaje się niezwykle ważny. Płyn pęcherzykowy zawiera białka i inne cząsteczki, które mogą wpływać na wzrost pęcherzyka, dojrzewanie oocytów i nabywanie przez nie kompetencji do zapłodnienia. Szybka charakterystyka potencjału rozwojowego oocytów stanowi jednak wciąż duże wyzwanie. Możliwość oceny zdolności do zapłodnienia na podstawie wybranych znaczników proteomicznych przy wykorzystaniu nie samych oocytów, lecz płynu pęcherzykowego, który niejako stanowi materiał odpadowy podczas procedury pobierania komórek jajowych, mogłaby stanowić punkt wyjścia do dokładnego oszacowania jakości oocytów i zdefiniowania spersonalizowanych terapii w medycynie rozrodu. Aby osiągnąć zamierzony cel, Doktorantka zoptymalizowała i przetestowała dwa bezznacznikowe podejścia proteomiczne oparte na spektrometrii mas oraz różne techniki frakcjonowania do analizy zarówno proteomu jak i peptydomu płynów pęcherzykowych pobranych od pacjentek. Użyteczność badanych podejść badawczych do identyfikacji biomarkerów jakościowych oocytów została sprawdzona na niewielkiej liczbie próbek klinicznych. Zadanie, którego podjęła się mgr Bogucka było sporym wyzwaniem. Należy tu podkreślić, że sformułowane zamierzenia i przede wszystkim obiekt badawczy, jakim jest płyn pęcherzykowy stanowią poważne wyzwanie badawcze. Płyn pęcherzykowy nie jest materiałem biologicznym powszechnie dostępnym, ponadto stanowi matrycę o bardzo dużym zakresie dynamicznym stężeń jego składników. Podobnie jak w osoczu, występują w nim tzw. białka wysokokopijne, syntezowane i wydzielane do płynu w bardzo dużych stężeniach, które często maskują białka produkowane w stężeniach 100, a nawet 1000-krotnie niższych, co utrudnia ich separację i identyfikację. Z tego względu na uznanie zasługuje, że Doktorantka zdecydowała się podjąć tego niełatwego zadania.

Przedstawiona do recenzji praca ma układ zbioru prac, której podstawą są trzy artykuły naukowe opublikowane w bardzo dobrych czasopismach o zasięgu międzynarodowym z listy JPR: Journal of Proteome Research, Journal of Proteomics oraz International Journal of Molecular Sciences. Dlatego rola recenzenta jest w tym przypadku odrobinę marginalna, ponieważ prace przeszły już proces recenzji w czasopismach.

Praca napisana jest w języku angielskim i składają się na nią: streszczenie, streszczenie w języku polskim, wykaz artykułów zawarty w rozprawie doktorskiej, wykaz skrótów, wprowadzenie, cel rozprawy doktorskiej, skrótowe omówienie wyników oraz ich dyskusja, wnioski i perspektywy badań, piśmiennictwo. Na końcu pracy zamieszczone zostały dwa załączniki w postaci kopii publikacji na których oparta była rozprawa doktorska oraz oświadczeń o wkładzie doktorantki i innych współautorów. Praca doktorska liczy 49 stron bez załączników i 112 stron uwzględniając załączniki. Brakuje mi krótkiego opisu całkowitego dorobku naukowego Doktorantki. Szkoda również, że nie podano liczby cytowań opublikowanych artykułów wchodzących w skład rozprawy, które są rzeczywistym odzwierciedleniem wpływu tych prac na środowisko naukowe.

Wstęp literaturowy zawiera informacje o technikach stosowanych w proteomice, zarówno dotyczących przygotowania próbek, metod ich rozdzielania oraz analizy z wykorzystaniem spektrometrii mas. Znajdujemy tu również rozdział dotyczący metod wspomaganego rozrodu oraz opis ścieżki rozwojowej oocytu. Na końcu wstępu otrzymujemy zebrane wyniki proteomiczne analiz płynów pęcherzykowych opublikowanych do tej pory. Ta część pracy jest bardzo klarowna, napisana przystępnym językiem i zawiera wszystkie informacje niezbędne do zrozumienia tematyki badawczej. Jedynie ostatnie dwa podrozdziały dotyczące proteomiki płynów pęcherzykowych oraz prezentowanych do tej pory w literaturze potencjalnych biomarkerów jakości komórek jajowych, nieco rozczarowuje. Z tych podrozdziałów dowiadujemy się, że tematyka badawcza, której podjęła się Doktorantka jest intensywnie badana przynajmniej od 2006 roku i że do tej pory zidentyfikowano już ponad 1000 białek wchodzących w skład proteomu płynów pęcherzykowych. Co więcej, jak widać w tabeli nr 1, stosując proteomikę opartą na spektrometrii mas, do tej pory zidentyfikowano wiele potencjalnych biomarkerów. Doktorantka również wspomina co najmniej 4 artykuły opisujące analizy płynów w podobnym układzie jak w prezentowanej pracy doktorskiej, czyli pobranych z kilku pęcherzyków od tej samej dawczyni. Są to między innymi analizy porównawcze zapłodnionych i niezapłodnionych oocytów pobranych od tej samej pacjentki czy porównania komórek, które dojrzały do tych, które nie były zdolne do wejścia w stadium MII. Niestety, brak tu wskazania choćby jednego, konkretnego białka, które mogłoby pełnić rolę markera jakości oocytów. Widzimy jedynie mnóstwo numerycznych informacji o liczbach zidentyfikowanych potencjalnych biomarkerów w poszczególnych pracach. Nie jest to bardzo interesujące, a przede wszystkim mało w tym wszystkim tzw. „biologii”. Poprosiłabym więc aby Doktorantka naświetliła trochę tę biologiczną wartość dotychczasowych analiz proteomicznych w kontekście własnych badań. Poproszę o krótką dyskusję do tej pory sugerowanych w literaturze biomarkerów jakości oocytów i potencjalny mechanizm molekularny w którym mogą uczestniczyć. W tym miejscu chciałabym również aby Doktorantka wyjaśniła dlaczego pomimo identyfikacji do tej pory kilkudziesięciu potencjalnych sygnatur proteomicznych płynów pęcherzykowych, nadal żaden z nich nie jest na etapie weryfikacji? Warto byłoby również zaznaczyć jakie kryteria muszą spełniać potencjalne biomarkery aby mieć szansę zaistnienia w badaniach klinicznych.

Opis wyników i ich dyskusja stanowią w recenzowanej pracy kolejny rozdział. Liczba wykonanych analiz i przetestowanych technik jest imponująca. Celem pierwszej z opublikowanych prac było wykonanie pilotowej analizy proteomicznej płynu pęcherzykowego w celu identyfikacji potencjalnych biomarkerów jakości oocytów. Próbkę została zebrana w ten sposób aby wskazać ewentualne różnice pomiędzy oocytami tej samej pacjentki oraz

między różnymi pacjentkami. Ponadto analizowano jednocześnie proteom oraz peptydom hFF w celu poszerzenia zakresu potencjalnych biomarkerów. Technika ultrafiltracji została zastosowana do uzyskania 2 frakcji białek: o masie poniżej i powyżej 10 kDa. Technika mikro LC została zastosowana do rozdziału chromatograficznego zamiast zwykle stosowanej w proteomice chromatografii nanoprzepływowej. Technika mikro LC, jak Autorka słusznie zaznaczyła w pracy przyspiesza znacznie analizy co mogłoby być wartością dodaną przy konieczności szybkiej przesiewowej analizy. Jednocześnie jednak, wymaga większej ilości materiału nakładanego na kolumnę, co w przypadku tak rzadkiego materiału biologicznego pobieranego od pacjentek, może być sporym ograniczeniem. I tu moje pytanie o ilość białka nastrzykiwanego na kolumnę? Nie znalazłam takiej informacji ani w pracy, ani w opublikowanym artykule. Przeczytać możemy, że stężenie białek w frakcji białek o masie powyżej 10kDa wynosiło 1 mg/mL ale nie podano jaką konkretnie objętość tej mieszaniny pobrano do trawienia. Z tej przyczyny nie wiemy ile dokładnie białka nastrzyknięto na kolumnę? Proszę również aby Doktorantka podała metodę, która została wykorzystana do zmierzenia wyjściowego stężenia białka gdyż tej informacji również brakuje. Analiza MS została przeprowadzona z użyciem metodologii SWATH w celu identyfikacji jak największej liczby białek. W tym miejscu należy podkreślić, że nie jest to najprostsza metoda ze względu na konieczność stworzenia odpowiednich bibliotek. W wyniku przeprowadzonych badań zidentyfikowano 158 białek, w tym 59 dotąd nie opisanych dla płynów pęcherzykowych. Co ważne, uzyskane dane zostały zdeponowane w publicznej bazie danych PRIDE i są dostępne dla społeczności naukowej. Dla 72 białek powiodła się analiza ilościowa co oznacza, że zostały zidentyfikowane z użyciem 2 lub więcej peptydów. Pozostałe 86 zidentyfikowano na podstawie 1 unikalnego peptydu. Zwrócę jednak uwagę na niepoprawne sformułowanie którym Doktorantka posługuje się w pierwszej z prac, a mianowicie termin „stężenia białek”. W przedstawionej pracy stężenia białek nie były kalkulowane, a jedynie przeprowadzono tzw. analizę relatywną, w której dokonano oceny zmiany poziomu poszczególnych białek pomiędzy analizowanymi grupami eksperymentalnymi. W tym przypadku lepiej mówić o akumulacji lub po prostu poziomie białek.

Za najważniejszy wynik tej pracy uważam identyfikację kilkunastu białek których akumulacja różniła się istotnie pomiędzy hFF pobranymi od tej samej dawczyni i te białka zostały wskazane jako biomarkery o potencjalnym zastosowaniu w badaniu jakości oocytów. Wynik ten jest ważny, ponieważ jak sama Doktorantka zaznacza, większość z nich była wskazana jako obiecujące biomarkery jakości oocytów w poprzednio publikowanych badaniach. Jednak brak jest w pracy próby dyskusji otrzymanych wyników pod kątem biologicznym. Doktorantka przeprowadziła również analizę ilościową 43 peptydów pochodzących z 23 białek. Czy mogłabym prosić o wyjaśnienie, na jakiej podstawie zostały wybrane te peptydy i w jaki sposób przeprowadzono ich analizę ilościową?

Listy białek i peptydów różnicujących w sposób istotny statystycznie pojedyncze pęcherzyki od danej pacjentki i pęcherzyki uzyskane od różnych pacjentek zebrane zostały w czytelnych tabelach. Publikacja napisana jest w przystępny sposób i zakończona jest konkluzją, że zidentyfikowane białka powinny być rozważane w badaniach dążących do opracowania metod badania jakości oocytów przed procedurą zapłodnienia. Autorka zwraca również uwagę na ograniczenia pracy, którym była mała liczba próbek (12 próbek od 4 dawczyń) i konkluduje planami przeprowadzenia dużego badania z wykorzystaniem 100-400 próbek pochodzących od 50-70 pacjentek oraz

połączenia analiz proteomicznych płynów pęcherzykowych z profilowaniem hormonów steroidowych. Czy podjęto próby wykonania takich analiz?

Celem kolejnej opublikowanej pracy było przetestowanie potencjału techniki SWATH MS do ilościowej analizy białek i peptydów po zastosowaniu bardziej kompleksowej procedury frakcjonowania składników białkowych płynów pęcherzykowych. Autorka zdecydowała się zastosować połączenie ultrafiltracji, immunodeplecji oraz chromatografii faz odwróconych w wysokim pH w różnych warunkach. Przetestowano między innymi różne kolumny chromatograficzne, skład i pH eluentów, gradient oraz czas trwania rozdziału. To bardzo dużo żmudnej pracy zasługującej na podkreślenie.

W tej pracy nie analizowano próbek od indywidualnych pacjentów tylko spulowane próbki płynów pobranych z 2-5 pęcherzyków losowo wybranych pacjentek. Ile próbek płynów oraz ile łącznie pacjentek włączono do badania? Nie znalazłam takich danych w artykule. Znajduje się tam jedynie informacja, że wykonano 3 powtórzenia techniczne i 5 biologicznych co daje łącznie 15 analiz LC-MS. Podobnie jak w poprzedniej pracy metoda pomiaru stężenia białek nie jest tu wspomniana, choć otrzymujemy informację, że do trawienia pobrano

18 µg białka. Nie wiadomo jednak ile materiału nastrzyknięto na kolumnę chromatograficzną.

Zastosowanie bardziej kompleksowych metod frakcjonowania zaskutkowało identyfikacją znacznie wyższej liczby białek w porównaniu do pracy poprzedniej. Łącznie powiodła się identyfikacja ponad 400 białek, a 108 białek o masie powyżej 10kDa zidentyfikowano z użyciem 2 lub większej liczby peptydów. Artykuł jest wynikiem typowej pracy metodycznej, w której testowano różne podejścia. Ponieważ analizowano spulowane próbki nie można wyciągać tutaj żadnych wniosków biologicznych na temat sygnatur związanych z jakością oocytów i ich ewentualnego potencjału do zapłodnienia. Konkluzja pracy zwraca uwagę na frakcjonowanie metodą chromatografii cieczowej w odwróconej fazie w wysokim pH jako skuteczną technikę do analizy składników płynów pęcherzykowych. Zastosowanie tej metody pozwoliło na identyfikację kilkunastu białek, które nie zostały zaprezentowane dotąd w literaturze. Praca napisana jest dość poprawnym językiem, aczkolwiek dość trudno się ją czyta ponieważ głównie składa się z danych numerycznych i procentowych, które choć ważne, sprawiają, że całość trudno zrozumieć.

W trzecim artykule porównano wyniki analizy proteomicznej uzyskane z zastosowaniem 2 platform MS. Wykorzystano spektrometr stosowany w poprzednich badaniach czyli potrójny kwadrupol sprzężony z chromatografią mikroprzepływową oraz spektrometr typu Orbitrap z LC w nanoprzepływach. Oba podejścia optymalizowano poprzez przetestowanie różnych technik frakcjonowania i protokołów trawienia. Zidentyfikowano łącznie około 1000 białek, a informacje ilościową uzyskano dla 215 i 455 białek dla obu podejść. Porównano uzyskane wyniki z danymi literaturowymi. Większość ze zidentyfikowanych białek było tożsamyh z białkami ludzkiego osocza, co nie było specjalnym zaskoczeniem. Czy zastosowano te same parametry przeszukiwania baz danych dla obu platform MS? MaxQuant użyty dla danych z orbitrapa i Protein Pilot zastosowany dla danych z potrójnego kwadrupola korzystają z zupełnie innych algorytmów do przeszukiwania, co może wpływać na wyniki identyfikacji, stąd moje pytanie.

Jak widzimy już w tytule pracy, tym razem Doktorantka podjęła próbę absolutnej kwantyfikacji białek co jest niezwykle ważne podczas opracowywania metodyki opartej na potencjalnych biomarkerach. Precyzyjne informacje

o stężeniu danego związku są konieczne aby móc w praktyce klinicznej odnosić go do próby kontrolnej. W tym celu autorka zastosowała nowatorskie podejście TPA. Jednak z drugiej strony do pomiaru stężenia białka całkowitego wykorzystano jedną z najbardziej niedokładnych, metodę spektrofotometryczną opartą na pomiarze absorbancji białek przy 280 nm. Czy mogłabym prosić o przedyskutowanie tej kwestii? Proszę również o porównanie zastosowanej metody TPA w kontekście innych technik stosowanych do pomiarów absolutnych w proteomice?

Najważniejszym w mojej opinii wynikiem zaprezentowanym w trzecim artykule, jest identyfikacja 20 białek związanych z procesem dojrzewania oocytów oraz 22 białek specyficznych dla procesu rozwoju blastocysty. Niestety, wynik ten prawie nie jest przedyskutowany i podobnie jak w poprzedniej pracy, w gąszczu cyferek i procentów gdzieś się rozmywa cały kontekst biologiczny. Zdaje sobie sprawę, że głównym celem pracy było opracowanie metodyki, jednak prosiłabym, aby Doktorantka uzupełniła ten brak podczas obrony. Nawet świetna metodyka bez kontekstu biologicznego będzie miała niewielkie znaczenie. Wyniki przedstawiono w postaci licznych tabel i kilku rysunków. Niestety rysunki 4ab oraz 5 są mało zrozumiałe. Heat mapy prezentowane w suplementach S7–S14 są zupełnie nieczytelne, co nie dziwi gdyż są one wykonane dla kilkuset białek. Może lepiej aby Doktorantka wybrała tylko najważniejsze białka, np. te specyficznie związane z dojrzewaniem oocytów i rozwojem blastocysty i przedstawiła tylko dla nich bardziej szczegółowe wyniki?

Moje uwagi zawarte w recenzji nie umniejszają oceny przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej. Doktorantka postawiła przed sobą ambitne cele badawcze i je zrealizowała. Zoptymalizowała 2 różne podejścia proteomiczne do analizy płynów pęcherzykowych i przetestowała je na małej liczbie próbek klinicznych. Wykazała się wiedzą teoretyczną oraz praktyczną z zakresu prowadzonych przez siebie prac. Wykonała ogromną liczbę analiz i obliczeń. Z pełnym, przekonaniem i w świetle powyższych danych stwierdzam, że recenzowana przeze mnie dysertacja zawiera istotne elementy oryginalności i nowości naukowej, spełnia zwyczajowe oraz ustawowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim sformułowane w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami) oraz art. 179 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. - Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. poz. 1669, z późn. zm.). W związku z tym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Aleksandry Boguckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Magdalena Łuczak

Dr hab. Magdalena Łuczak, prof. IChB PAN

DOCUMENT
CREATED
WITH



PDF
COMBINER

PDF Combiner is a free application that you can use to combine multiple PDF documents into one.

Three simple steps are needed to merge several PDF documents. First, we must add files to the program. This can be done using the Add files button or by dragging files to the list via the Drag and Drop mechanism. Then you need to adjust the order of files if list order is not suitable. The last step is joining files. To do this, click button Combine PDFs.

Main features:

secure PDF merging - everything is done on your computer and documents are not sent anywhere

simplicity - you need to follow three steps to merge documents

possibility to rearrange document - change the order of merged documents and page selection

reliability - application is not modifying a content of merged documents.

Visit the homepage to download the application:

www.jankowskimichal.pl/pdf-combiner

To remove this page from your document, please donate a project.