INTERNATIONAL INSTITUTE OF MOLECULAR AND CELL BIOLOGY IN WARSAW
CENTRE OF EXCELLENCE IN MOLECULAR BIO-MEDICINE

Prof. dr hab. Marta Miączyńska
Pracownia Biologii Komórki
Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej
w Warszawie

Warszawa, 29.11.2014 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej pani mgr Moniki Rak

p.t.: "Zastosowanie kationowych pochodnych poliizoprenoidów jako nośników kwasów nukleinowych w lipofekcji"

wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Zbigniewa Madeji
w Zakładzie Biologii Komórki
Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego

Rozprawa doktorska pani mgr Rak dotyczy nowych nośników zdolnych do przenoszenia kwasów nukleinowych do wnętrza komórek na drodze lipofekcji. Wprowadzanie DNA i RNA do komórek to podstawowa technika laboratoryjna w badaniach biologicznych. Stale wzrasta również liczba jej zastosowań w branży biotechnologicznej i w praktyce klinicznej. Pomimo to, dostępne metody i nośniki mają swoje, często bardzo poważne, ograniczenia. Z tego względu bardzo istotne jest usprawnianie procedur i opracowywanie nowych nośników cechujących się przede wszystkim dużą wydajnością i małą toksycznością, ale także łatwością stosowania i konkurencyjną ceną.

W swojej pracy Doktorantka postawiła sobie za cel zbadanie potencjału lipofekcyjnego kationowych pochodnych poliizoprenoidów, konkretnie jodków trimetylopoliprenyloamoniowych (PTAI) o różnej długości łańcucha poliprenylowego. W rezultacie badań stwierdziła, że poliizoprenoidy PTAI mogą być używane jako wydajny i nietoksyczny nośnik DNA i RNA do lipofekcji komórek eukariotycznych. Wyniki te mają także dużą wartość aplikacyjną i stwarzają możliwość wprowadzenia na rynek nowego produktu do transfekcji komórek, w oparciu o udzielony patent i kolejne zgłoszenie patentowe, których Doktorantka jest współautorką.

Formalny opis rozprawy

Rozprawa licząca 147 stron maszynopisu ma układ typowy dla rozpraw doktorskich. Rozpoczyna się wykazem stosowanych skrótów i streszczeniami w języku polskim i angielskim. Wstęp (29 stron) zawiera 6 podrozdziałów, które wprowadzają czytelnika w zakres badań opisanych w rozprawie. Po jednostronicowym przedstawieniu celów pracy następuje opis materiałów i metod (16 stron). Wyniki (52 strony) są podzielone na 10 podrozdziałów, a dyskusja liczy 14 stron. Rozprawa kończy się dwustronicowym podsumowaniem najważniejszych wyników badań, suplementem w postaci pięciu dodatkowych rycin z wynikami oraz spisem literatury zawierającym 223 pozycje.

Ocena merytoryczna

Wstęp rozprawy przedstawia w sposób solidny i uporządkowany zagadnienia leżące u podstaw badań Doktorantki. Po ogólnym omówieniu znaczenia transferu kwasów nukleinowych w nauce, przemyśle i medycynie, opisane są metody wprowadzania DNA i RNA do komórek (biologiczne, fizyczne i chemiczne). Kolejne podrozdziały poświęcone są lipidom kationowym i etapom procesu lipofekcji, a wstęp kończy się opisem kationowych pochodnych poliizoprenoidów będących przedmiotem rozprawy.

Wstęp przeczytałam z dużym zaciekawieniem. Jest to rozdział dobrze skonstruowany, a informacje są przedstawione w sposób spójny i logiczny. W śledzeniu przedstawianych zagadnień pomagają czytelnikowi 3 rysunki oraz jedna tabela, choć w mojej opinii przydałyby się kolejne, np. schemat ogólnej struktury lipidów kationowych, szeroko omawianych w tekście. Wstęp niewątpliwie dokumentuje dużą wiedzę Autorki w przedmiocie rozprawy. Do tej części mam jedynie drobne uwagi, które nie zmieniają mojej pozytywnej oceny tego rozdziału. Nie znalazłam w tekście wytłumaczenia co to jest metoda „jet injection" wymieniona w Tabeli 1.1 jako technika fizyczna wprowadzania kwasów nukleinowych do komórek. Zabrakło mi również definicji potencjału zeta wymienionego w podrozdziale 1.4.2b, a jest to wartość, która była mierzona w rozprawie. Jako badacz endocytozy, nie zgodziłabym się z kategorycznym stwierdzeniem rozpoczynającym rozdział 1.5.5 „Ponieważ endosomy są zlokalizowane w pobliżu jądra komórkowego,...". Jest to znaczne uproszczenie, gdyż endosomy, w zależności od swojej funkcji (endosomy wczesne, późnej, recyklingowe), znajdują się w różnych częściach komórki, także na jej peryferiach, a nie tylko w pobliżu jądra. Wreszcie, na str. 16 wymieniono liczne choroby, w tym HIV, który oczywiście chorobą nie jest, a jedynie ją powoduje.

Dziesięć szczegółowych **celów pracy** zostało poprawnie sformułowanych, jasno przedstawionych i zrealizowanych w toku badań.

Materiały i metody zostały opisane w osobnych podrozdziałach. W części pierwszej Doktorantka wymieniła stosowane materiały wraz z podaniem źródeł odczynników oraz użytą aparaturę i oprogramowanie komputerowe. W części drugiej przedstawiono metody, które zostały prawidłowo dobrane do realizacji założonych celów. Mam tylko kilka zastrzeżeń do tej części rozprawy.

W podrozdziale 3.2.5 nie były dla mnie jasne podane zakresy stężeń PTAI + DOPE (dla PTAI-7, -8 oraz -11/15). Czy są to stężenia zbiorcze dla obu odczynników? Jaka była proporcja pomiędzy poszczególnym PTAI a DOPE?

W podrozdziale 3.2.6 (Określanie wydajności transfekcji) zabrakło mi podania jaką liczbę komórek analizowano i czy komórki z ekspresją EGFP liczono ręcznie czy automatycznie z użyciem oprogramowania do analizy obrazów. Podania liczby komórek analizowanych w jednym doświadczeniu zabrakło mi również przy opisie testów aktywności ruchowej (3.2.11) i komunikacji międzykomórkowej przez złącza szczelinowe (3.2.12).

W podrozdziale 3.2.15 nie zrozumiałam podania różnych liczb wysiewanych komórek i następnie w nawiasie czasu [„ $5x10^4$ (24h), $2,5x10^4$ (48h), $1,25x10^4$ (72h)..."], w zdaniu, w którym na końcu stwierdzono, że komórki hodowano przez 24 godziny. Czego dotyczy podany w nawiasach czas?

Wyniki pracy to szeroka i komplekowa charakterystyka właściwości PTAI pod kątem ich potencjału lipofekcyjnego, wpływu na procesy fizjologiczne komórek oraz możliwych zastosowań *in vitro* i *in vivo*. Przeprowadzenie tak szerokich analiz wymagało wielkiego nakładu pracy, zwłaszcza przy optymalizacji procedur lipofekcji, oraz dużej skrupulatności, które to cechy Doktorantka niewątpliwie wykazała. Doświadczenia zaplanowano i przeprowadzono w sposób logiczny, a interpretacja uzyskanych wyników jest prawidłowa i

krytyczna. Ogólnie wysoko oceniam jakość techniczną wyników, poprawność wyciąganych wniosków oraz znaczenie aplikacyjne wszystkich rezultatów rozprawy.

W tej części chcę jednak podnieść kilka kwestii, do których mam zastrzeżenia lub wątpliwości, głównie dotyczących prezentacji wyników.

- W rozprawie zabrakło mi wyjaśnienia, dlaczego do początkowych analiz wybrano komórki raka prostaty DU145. Ponadto, czy komórki te posiadają kaweole, za pomocą których mogłyby pobierać lipopleksy oparte na PTAI – co jest sugerowane na str. 66?

- Generalnie, w opisie niektórych rycin brakowało mi dokładnych informacji umożliwiających powtórzenie doświadczenia. Oczywiście zdaję sobie sprawę, że na prezentowanych rycinach zwykle występowało bardzo wiele zmiennych, różnych dla poszczególnych typów doświadczeń, i przedstawienie w ich sposób zrozumiały nie jest trywialne. Niemniej jednak w mojej opinii pewne dalsze informacje powinny były znaleźć się w legendach (szczegóły poniżej).

- Nie byłam pewna ile ostatecznie stosowano plazmidowego DNA na dołek płytki 24-dołkowej w większości doświadczeń – optymalizacje przeprowadzano w zakresie 1 - 5 μg, w niektórych legendach wskazano na użyte 1.5 lub 2 μg. Podobnie, jakie stosunki molowe poszczególnych PTAI do DOPE stosowano w większości doświadczeń już po optymalizacji?

- Rys. 4.4. Nie dopatrzyłam się strzałek wspomnianych w legendzie, które miałyby wskazywać „nowe optymalne stężenia lipopleksów" bez wpływu na proliferację komórek i wydajność transfekcji. Gdzie określono tę wydajność? Ile plazmidu pcDNA używano w tych doświadczeniach?

- Rys. 4.12 i 4.17: dlaczego na wykresach nie umieszczono kontroli bez poli-L-lizyny i PEG, do których można by porównać wpływ tych substancji? Generalnie, opis Rysunku 4.12 w tekście jest skomplikowany, a jego zrozumienia nie ułatwia błąd w podaniu jednej z wartości wydajności transfekcji w warunkach surowiczych: wedle wykresu wartość 58,5% osiąga PTAI-15 + mix3, a nie PTAI-11 + mix3, jak napisano (str. 81).

- Rys. 4.13, 4.14 i inne ryciny ze zdjęciami spod mikroskopu: zabrakło poprawnej legendy czyli opisu, że są to obrazy mikroskopowe, co przedstawiają poszczególne kanały, itp. Z obowiązku recenzenta wspomnę również, że na rycinie obok wyłącznie kontroli negatywnych powinna znaleźć się również kontrola pozytywna, demonstrująca poprawność wykonania doświadczenia. Z kolei na Rys. 4.22, 4.23, 4. 24, S.7.4 i S.7.5 kontrole pozytywne są, ale nie opisano co je stanowi.

- Zabrakło mi poszerzonego opisu badania komunikacji międzykomórkowej poprzez złącza szczelinowe (Rys. 4.7, 4.8), gdyż nie jest to metoda tak standardowa i powszechna jak testy proliferacji komórek. Jakie znaczenie ta komunikacja ma dla komórki, o czym mogą świadczyć jej zaburzenia i jaka jest zasada działania przeprowadzonego testu?

- Podrozdział 4.6, str. 91: w opisie transfekcji komórek HUVEC niejasne czego dotyczy wydajność transfekcji na poziomie 1%.

- W podrozdziale 4.8 warto było wspomnieć, że zastosowane komercyjne shRNA jest rzeczywiście dwuniciowym RNA z elementem spinki, a nie plazmidem kodującym shRNA, bo w takiej postaci (lub wirusów) shRNA najczęściej jest używane. Producent tego odczynnika sam określa go jako „siRNA GFP" i taka nazwa (a nie shRNA GFP) powinna była również pojawić się w rozdziale Materiały.

- Tabela 4.2. Bardzo zawile opisano parametr „Liczba godzin po transfekcji": „podano czas po transfekcji mającej na celu wprowadzenie plazmidu pEGFP-C1 z użyciem Lipofectamine® 2000, 24 h przed tą transfekcją wprowadzano shRNA z użyciem odczynników opartych na PTAI". Ta uwaga wiąże się też z moim powyższym komentarzem do metody opisanej w podrozdziale 3.2.15. Może dla jasności trzeba było przedstawić schemat poszczególnych transfekcji i analiz na skali czasu.

- Rys. 4.29. Dobrą praktyką prezentowania danych mikroskopowych jest przedstawianie na obrazie więcej niż jednej komórki.

Dyskusja jest solidnym omówieniem znaczenia uzyskanych wyników, w porównaniu do innych dostępnych metod transfekcji i na tle danych literaturowych. Rozdział ten jest

podsumowaniem całości danych doświadczalnych, więc w sposób naturalny odwołuje się do kwestii opisanych w rozdziale Wyniki, uzupełniając je o dodatkową dogłębną analizę i komentarz. We wszystkich poruszanych zagadnieniach Doktorantka porusza się bardzo sprawnie, celnie identyfikuje także obszary wymagające dalszych badań. Choć ja osobiście preferuję podział dłuższych tekstów na podrozdziały tematyczne, które porządkują treści i ułatwiają czytanie – to nie mam zastrzeżeń do tej części rozprawy. Podobnie wysoko oceniam końcowy rozdział **Najważniejsze wyniki badań**.

Ocena edytorskiej strony rozprawy

Praca jest napisana poprawnym językiem i bardzo starannie, praktycznie bez błędów literowych. Poniżej kilka drobnych niedoskonałości, których warto uniknąć przy przygotowywaniu przyszłych tekstów.

- Pierwsze odwołanie w tekście do Rys. 1.1 następuje na stronie 17, ale sama rycina jest umieszczona dopiero na stronie 20.
- Str. 19, zabrakło cytowania pracy prof. Szybalskiego w PNAS (1962), omówionej w tekście.
- W tekście i legendach są przypadki nierozdzielenia odstępem liczby i jej jednostki (np. 0,02g/100ml; 1mg/ml).
- Niespójne używanie w tekście skrótów kb oraz pz na określenie tego samego.
- W spisie literatury, w licznych pozycjach nie wymieniono wszystkich autorów, zastępując ich wielokropkiem – nie mając ograniczeń objętości, można było wymienić wszystkich. Niektóre pozycje, po podaniu danych bibliograficznych, kończą się zbędnymi słowami: „retrieved" lub „retrieved from" (np. pozycje 79, 123, 124, 150).

Pojedyncze błędy literowe:

- Str. 15 Summary, powinno brzmieć: ..lipofecting activity of PTAI allows...
- Str. 17, „reguły Chargraffa" powinny brzmieć: reguły Chargaffa.
- Str. 19, „hiperargninemii" powinno brzmieć: hiperargininemii.
- Str. 39, „endozytozy" powinno brzmieć: endocytozy.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska mgr Moniki Rak dotyczy ważnego problemu badawczego i metodycznego z zakresu biologii komórki, jakim są techniki wprowadzania kwasów nukleinowych do komórek. Doktorantka podjęła się szeroko zakrojonych badań charakteryzujących nowe nośniki lipofekcyjne PTAI pod względem ich charakterystyki fizycznej, wpływu na procesy fizjologiczne komórki i wydajności transfekcji w różnych warunkach i typach komórek. W rozprawie zaprezentowała ciekawe i solidne wyniki, wykazała się znajomością swojej tematyki badawczej oraz umiejętnością interpretacji i wyciągania wniosków z otrzymanych wyników. Co istotne, wyniki uzyskane przez Autorkę otwierają dalsze perspektywy badawcze i aplikacyjne na przyszłość. Przedstawione przeze mnie wątpliwości i uwagi nie umniejszają wartości naukowej rozprawy, a dotyczą głównie sposobu prezentacji wyników i mają za zadanie pomóc w przedstawianiu rezultatów badań w przyszłości.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wszystkie wymogi ustawowe stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Moniki Rak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Marta Miączyńska