Uniwersytet Wrocławski

Wydział Biotechnologii
Zakład Cytobiochemii

ul. Stanisława Przybyszewskiego 63/77
51-148 Wrocław
tel.+48 71 375 62 33
fax +48 71 375 62 08

Prof. dr hab. Aleksander F. Sikorski
ul. Fryderyka Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław

Recenzja rozprawy doktorskiej p.t."Zastoswanie kationowych poliizoprenoidów jako nośników kwasów nukleinowych w lipofekcji" autorstwa Pani mgr Moniki Rak

Lipofekcja jest jednym z podstawowych procesów wykorzystywanych jako narzędzie do przenoszenia kwasów nukleinowych do komórek. Postęp w tej dziedzinie badań przyniósł i przynosi rozwój wielu technik w praktyce laboratoryjnej i klinicznej. Z drugiej strony, wysokie ceny oraz zróżnicowana skuteczność dostępnych preparatów handlowych promuje dalsze poszukiwania zarówno nowych czynników jak i nowych kompozycji znanych lipidów zdolnych do przenoszenia kwasów nukleinowych do komórki. Takimi próbami od pewnego czasu zajmuje się zespół Pana Profesora Zbigniewa Madeji, promotora recenzowanej rozprawy we współpracy z zespołami z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN oraz Instytutu Chemii Organicznej PAN w Warszawie oraz zespołami z macierzystego Wydziału.

Przedstawiona do recenzji praca ma typowy dla rozpraw doktorskich układ treści, zaopatrzona została w streszczenie w języku polskim i angielskim, liczący 28 stron „Wstęp", Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki (46 stron, 32 złożone ryciny i 2 tabele plus 5 rycin w rozdziale 7, „Suplement"), Dyskusja oraz podsumowanie zatytułowane „Najważniejsze wyniki badań". Autorka cytuje 223 pozycje literatury, wśród których znakomita większość to prace oryginalne opublikowane po 2005 roku.

Cel pracy przedstawiony w rozdziale 3 pod tym samym tytułem został bardzo dobrze i szczegółowo określony jako zbadanie potencjału lipofekcyjnego jodków trimetylo-cis-poliprenyloamoniowych - „PTAI", nowych kationowych pochodnych poliizoprenoli pod kątem ich wykorzystania w warunkach in vitro jak i in vivo.

Autorka przeprowadziła szereg doświadczeń celem uzyskania odpowiedzi na szczegółowe kwestie przedstawione w celu pracy. Trzeba dodać, że projekt doświadczalny jest bardzo obszerny: obejmuje badania czterech pochodnych PTAI o różnej długości (7,8,11 i 15 jednostek izoprenowych) oraz ich mieszanin z lipidami pomocniczymi takimi jak DOPE,

DOPC, Cholesterol oraz DC-Cholesterol. Autorka badała właściwości fizykochemiczne supramolekularnych agregatów tworzonych przez poszczególne mieszaniny lipidowe oraz ich kompleksy z DNA. Tu jednak jest pewna niekonsekwencja, badania odnoszą się do układów dwu-/trójskładnikowych PTAI-DOPE/PTAI-DOPE-DNA a preparatami najskuteczniejszymi i najstabilniejszymi okazały się, jak rozumiem, wieloskładnikowe układy, np. „PTAI/mix3". Tu nasuwa się pytanie, czy kompleks takiej mieszaniny lipidów z kwasem nukleinowym w dalszym ciągu charakteryzował się ładunkiem ujemnym. Rolę tego ładunku Autorka podkreśla w „Dyskusji".

Te wieloskładnikowe konstrukcje okazały się również wysoce skuteczne w obecności surowicy, co jak się wydaje, jest ich bardzo istotną cechą jako nośników kwasów nukleinowych. Autorka analizowała tez trwałość konstrukcji w trakcie przechowywania i tu znowu układ „PTAImix3" okazał się stabilny pod względem aktywności transfekcyjnej przez 8 miesięcy w $4^{o}C$.

Autorka przeanalizowała wpływ lipofekcji za pomocą mieszanin PTAI z DOPE na aktywność migracyjną komórek oraz na komunikację pomiędzy komórkami za pomocą złączy szczelinowych „gap jnctions" stwierdzając, że lipopleksy w stężeniach poniżej stężeń cytostatycznych nie wpływają na te funkcje komórek.

Mieszaniny PTAI z lipidami pomocniczymi okazały się również wydajnymi nośnikami shRNA, przy czym różne mieszaniny okazały się optymalne dla różnych linii komórkowych a większość komórek przebadanych linii dobrze przyjmowała shRNA w postaci lipopleksów PTAI-7/DOPE.

Co więcej, uzyskane lipopleksy zostały zastosowane z sukcesem do transfekcji komórek, których transfekcja za pomocą standardowych, dostępnych na rynku preparatów jest zwykle trudna do przeprowadzenia. Przede wszystkim jednak, zastosowano specjalnie zaprojektowane mieszaniny lipidów zawierających PTAI do sporządzenia szczepionki DNA. To ostatnie zastosowanie, choć z oczywistych względów opisane bez szczegółów doświadczalnych wykazało bardzo dużą skuteczność uzyskanych konstrukcji, konkurencyjną w stosunku do dostępnych komercyjnie preparatów.

Zatem pod względem innowacyjności oceniana praca stanowi sukces, gdyż jej wyniki mogą posłużyć do konstrukcji nawet kilku preparatów komercyjnych. Na uwagę zasługuje ogromna liczba układów doświadczalnych oraz szczegółowa dokumentacja prezentowana w rozprawie.

Autorka dokonała ciekawej obserwacji wskazującej na to, że obdarzone ładunkiem ujemnym lipopleksy bardzo dobrze przenoszą materiał genetyczny do komórek nie

powodując w zasadzie ujemnych skutków (żywotność, zaburzenie funkcji migracyjnych lub tworzenie złączy szczelinowych). Temu zjawisku poświęca znaczną część „Dyskusji" analizując swoje wyniki na tle wyników innych autorów. Ten rozdział jest bardzo dobrze napisany, podkreśla osiągnięcia własne Autorki, ale też z rezerwą odnosi się do uzyskanych ewidentnie pozytywnych rezultatów.

Rozdział „Wstęp" stanowi obszerny przegląd literatury dotyczący terapii genowej a przede wszystkim metod wprowadzania kwasów nukleinowych do komórki żywej oraz transfekcji za pomocą lipidów kationowych i ich mieszanin z lipidami pomocniczymi. Ten rozdział z powodzeniem może stać się artykułem przeglądowym opublikowanym w języku polskim lub angielskim.

Rozdział „Materiały i metody" budzi mieszane odczucia recenzenta, bo z jednej strony jest chyba najbardziej szczegółowo przedstawiony rozdział poświęcony części metodycznej, jaki miałem możliwości oceniać i to jest bardzo pozytywny element. Z drugiej strony, używanie lipidów, szczególnie zawierających reszty nienasycone reszty kwasów tłuszczowych produkcji Sigma-Aldrich nie jest najlepszym wyborem. Jak rozumiem, podane zostało źródło tylko jednej linii komórkowej DU145, pochodzenie pozostałych linii nie zostało ujawnione.

Natomiast cała część doświadczalna cierpi z powodu nieprecyzyjnego podawania stężeń stosowanych lipopleksów/lipofektantów: Autorka podaje ilości tych odczynników w jednostkach μg/dołek (płytki hodowlanej), nie wiadomo dokładnie jaka była objętość. Te wartości powinno się wyrażać w stężeniach (μg/ml, μg/μl itd.). Np. w Tabeli 4.1 podane zostały ilości a brak jest stężeń lub choćby objętości. W tym przykładzie w rozdz. „Materiały i metody" Autorka pisze o teście w probówkach i odczytywaniu absorbancji w płytce 96 dołkowej. W opisie dośw. W rozdz. „Wyniki" pisze tylko o ilościach lipopleksów w „dołku". Brak jest definicji parametru PDI (str. 57). Redakcyjna strona tego rozdziału (Materiały i metody) odbiega o całej reszty pracy: cały tekst zawiera wiele zdań w stronnie biernej, co języku polskim jest błędem. Zdaniem recenzenta zbędne jest też stosowanie angielskiego skrótu RBC do określenia krwinki czerwonej. Pozostałe części pracy, poza ewidentnymi pomyłkami, np. na str. 63: „Dodatkowo…..jest zależny nie tylko od łańcucha hydrofobowego, ale również od części hydrofobowej" – miał zapewne, być: „hydrofilowej" nie budzą najmniejszych zastrzeżeń od strony redakcyjnej.

Wspomniane powyżej, w sumie drobne usterki redakcyjne w żadnym razie nie zmniejszają wartości naukowej ocenianej dysertacji. W opinii recenzenta oceniana praca

doktorska stanowi oryginalne osiągnięcie o charakterze naukowym o znacznych perspektywach zastosowania w praktyce laboratoryjnej oraz klinicznej.

Zatem Autorka osiągnęła założony cel i jej dysertacja zdaniem recenzenta z powodzeniem spełnia wymogi Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku "O stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki". Z przyjemnością przedstawiam Wysokiej Radzie Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego wniosek o dopuszczenia Pani mgr Moniki Rak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę fakt, że preparaty skonstruowane i przebadane w trakcie realizacji projektu doktorskiego staną się zapewne przedmiotem wdrożeń a także fakt, że Doktorantka jest współautorką kilku publikacji naukowych oraz jednego patentu i jednego zgłoszenia patentowego wnoszę o jej wyróżnienie stosowną nagrodą.

Wrocław 30.11. 2014

