

Recenzja rozprawy doktorskiej pana **Rafała Mańki** pt. „**Badanie oddziaływań aptamerów RNA z błonami pęcherzyków lipidowych**” przygotowanej pod opieką prof. dr hab. Tadeusza Janasa w Instytucie Biologii Uniwersytetu Opolskiego.

Przedmiotem pracy doktorskiej była analiza oddziaływań pomiędzy cząsteczkami RNA (w formie aptamerów) a pęcherzykami lipidowymi – utworzonymi *in vitro* liposomami o różnym składzie oraz izolowanymi z surowicy małymi pęcherzykami pozakomórkowymi (nazywanymi w pracy egzosomami). Cząsteczki RNA są jednym ze składników egzosomów (i innych typów pęcherzyków pozakomórkowych uwalnianych *in vivo* przez komórki), będących kluczowym elementem komunikacji międzykomórkowej, a szereg danych wskazuje, że zawarte w egzosomach RNA może w istotny sposób zmieniać fenotyp komórek docelowych. Różne klasy cząsteczek RNA mają charakter czynników stosowanych w terapiach ludzkich chorób. Z kolei liposomy stosowane są powszechnie jako nośniki wielu klas leków. Również produkowane endogennie egzosomy traktowane są jako potencjalne czynniki terapeutyczne i/lub nośniki leków. Co istotne, mechanizmy swoistego pakowania cząsteczek RNA do egzosomów i innych pęcherzyków lipidowych kryją jeszcze wiele zagadek. Z tego powodu temat wybrany przez Kandydata dotyczy bardzo ciekawego obszaru badań, a wyniki są nie tylko ważne poznawczo, ale mogą mieć również istotne implikacje praktyczne.

Kandydat podjął się przetestowania hipotezy, że na oddziaływanie RNA-pęcherzyki lipidowe ma wpływ zarówno struktura błony lipidowej (w tym obecność tzw. tratw lipidowych) jak i motywy sekwencyjne oraz struktura drugorzędowa cząsteczek RNA. Do badań wykorzystany został poprawnie dobrany model badawczy i metody analityczne, które można uznać za złoty standard w tym typie badań.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma typową strukturę. Praca liczy 174 numerowane strony, zawiera 30 rycin i 30 tabeli, a jej bibliografia odnosi się do 112 poprawnie dobranych pozycji literaturowych. Rozprawa uzupełniona jest o dwa złączniki (sekwencja aptamerów RNA oraz schematyczne przedstawienie struktury drugorzędowej części aptamerów RNA). Napisana w języku polskim rozprawa jest w warstwie edytorskiej przygotowana poprawnie, a jej treść jest czytelna i pozbawiona istotnych błędów językowych. Rozprawa poprzedzona jest streszczeniem w języku polskim i angielskim.

„Część teoretyczna” pracy (Rozdział 1 – **Wstęp literaturowy**) stanowi syntetyczne wprowadzenie do zagadnień będących przedmiotem rozprawy i składa się z czterech podrozdziałów. W tej części Kandydat omawia: błony lipidowe (1.1), strukturę i funkcje egzosomów (1.2), strukturę RNA w kontekście zagadnień, których dotyczy praca (1.3) oraz założenia spektroskopii fluorescencyjnej, tj. podstawowej metody badawczej zastosowanej w pracy (1.4). Informacje przedstawione w Rozdziale 1 stanowią wystarczające wprowadzenie do tematyki badań i pozwalają zdefiniować Cele pracy.

Uwagi: W rozdziale 1.3 brakuje odniesienia do tzw. „motywów 5-nukleotydowych”, których dotyczy część eksperymentów. Ponadto niekonsekwentnie stosowana jest konwencja wprowadzania skrótów – w przypadku niektórych terminów ich skrót nie są wyjaśnione (np. GPI), a inne są wyjaśniane wielokrotnie (np. MVB).

Część „Badania własne” składa się z czterech rozdziałów: Założenia i cele pracy (rozdział 2) Materiały i Metody (rozdział 3), Wyniki (rozdział 4), Dyskusja (rozdział 5). Pracę uzupełnia bibliografia oraz spis rysunków i tabel (oraz wykaz skrótów i wspomniane wcześniej załączniki).

W rozdziale 2 (**Założenia i cele pracy**) Kandydat poprawnie przedstawia przyjęte przez siebie hipotezy badawcze i służące ich weryfikacji zadania badawcze (cele szczegółowe).

W rozdziale 3 (**Materiały i Metody**) Kandydat szczegółowo przedstawił zarówno materiały jak i procedury badawcze wykorzystane w części doświadczalnej. Na podkreślenie zasługują drobiazgowo opisy metody umożliwiające pełne odtworzenie warunków, których prowadzone były doświadczenia. Częścią rozdziału 3 jest również ważny opis doświadczeń służących optymalizacji układu pomiarowego.

Uwagi:

1. Analiza statystyczna. Kandydat poprawnie wybrał test Kruskala-Wallisa do analizy zmienności w więcej niż dwóch grupach o rozkładach odbiegających od rozkładu normalnego. Jednak zastosowanie testu U Manna-Whitney’a w roli testu typu post-hoc do identyfikacji różnic między parami wpływającymi na zmienność w porównaniu wielu grup nie jest rozwiązaniem typowym (należało raczej wybrać któryś z klasycznych testów post-hoc). W wykorzystanych metodach statystycznych brak również testów analizujących siłę korelacji między parametrami (oraz, już w części wynikowej, takiej analizy). W opisie metod statystycznych brak również informacji jak Kandydat definiuje/identyfikuje wartości odstające.
2. Drobne uwagi dotyczące czytelności tego rozdziału. W sekcji 3.2.5. zastosowano nazwę sondy fluorescencyjnej „Lizamina Rodamina B”, która to nazwa nie była użyta w pozostałej części pracy. Ewentualne zaznaczenie w Tabeli 5 sekwencji zmienionych w wariantach mutacyjnych (w stosunku do sekwencji wyjściowej) poprawiłoby czytelność przedstawionych informacji.

Rozdział 4 (**Wyniki**) składa się z dwóch głównych części. W pierwszej Kandydat analizuje obecność interesujących go motywów sekwencyjnych w badanych cząsteczkach RNA (sekcja 4.1) oraz przedstawia hipotetyczną strukturę drugorzędową badanych cząsteczek RNA uzyskaną w analizie *in silico* (sekcje 4.2 i 4.6). Ta część pracy jest bogato ilustrowana rycinami przedstawiającymi lokalizację badanych motywów sekwencyjnych w (hipotetycznej) strukturze drugorzędowej RNA. W drugiej części rozdziału Kandydat przedstawia wyniki przeprowadzonych pomiarów zmian fluorescencji (zjawisko FRET), umożliwiające ocenę siły oddziaływań RNA/błona lipidowa w układzie: aptamery „wyjściowe” vs. liposomy (sekcje 4.3 i 4.4) i egzosomy (sekcja 4.5) oraz aptamery „zmutowane” vs. liposomy (sekcja 4.7) i egzosomy (sekcja 4.8). Jako liposomy zawierające domeny tratw lipidowych (liposomy tratwowe) wykorzystano pęcherzyki utworzone z mieszaniny fosfatydylocholiny (DOPC), sfingomieliny i cholesterolu, a jako liposomy bez tratw lipidowych – te utworzone wyłącznie z DOPC, co było racjonalnym wyborem modelu badawczego. Kandydat wykazał silniejsze wiązanie aptamerów RNA z liposomami posiadającymi domeny tratwowe (sekcja 4.3). Kandydat wykazał również, że aptamery zawierające różne motywy sekwencyjne/strukturalne

w zróżnicowany sposób wiążą się do liposomów z domenami trawowymi (sekcja 4.4), jednak z powodu niereprezentatywnego doboru aptamerów (uwagi 3 i 4 poniżej), uzyskane wyniki nie pozwalają na określenie zależności systemowych. Kandydat wykazał również, że aptamery, które silnie wiążą się do liposomów z domenami trawowymi wiążą się również silnie z błonami egzosomów (sekcja 4.5). Ponadto Kandydat wykazał, że mutacje zmieniające motywy sekwencyjne aptamerów zmieniają oddziaływania RNA z liposomami trawowymi (sekcja 4.7). Niestety, z powodu niereprezentatywnego doboru aptamerów (uwaga 3 poniżej), uzyskane wyniki nie pozwalają na zdefiniowanie zależności systemowych (uwaga 4 poniżej). Kandydat podjął również próbę analizy wpływu mutacji sekwencji na oddziaływania aptamerów RNA z błonami egzosomów (sekcja 4.8), jednak z powodu dużego rozrzutu pomiarów uzyskane wyniki były trudne do interpretacji.

Uwagi:

3. W pracy nie przedstawiono kryteriów jakimi kierował się Kandydat wybierając do badań 19 aptamerów RNA z zestawu 148 aptamerów jakie miał do dyspozycji. W mojej opinii brak jasnych kryteriów takiego wyboru, w wyniku czego badany zestaw w niesystematyczny sposób odzwierciedla różne możliwe warianty motyw/struktura, co stanowi istotną słabość pracy. W wyniku takiego wyboru uzyskane wyniki można co prawda przyporządkować na zasadzie pojedynczego przykładu do różnych wariantów motyw/struktura, jednak bez możliwości analizy systematycznej. Być może lepszym rozwiązaniem byłby wybór umożliwiający porównanie kilku reprezentatywnych grup aptamerów; np.: (i) bez żadnych motywów, (ii) tylko z motywami egzosomowymi, (iii) tylko z motywami trawowymi. Ta sama uwaga dotyczy wariantów mutacyjnych (sekcja 4.6). W mojej opinii analiza, w której porównano by wyłącznie zestaw aptamerów nie posiadających wyjściowo żadnych motywów z wariantami, do których motywy zostały wprowadzone (i analogicznie, porównanie zestawu aptamerów posiadających dany motyw z wariantami, z których wszystkie motywy zostały usunięte) pozwoliłoby na bardziej systemowe scharakteryzowanie zjawiska. Wyniki obecnej analizy, z powodu jednostkowości przykładów, są dużo trudniejsze do miarodajnej interpretacji.
4. Na skutek nieokreślonej reprezentatywności zestawu aptamerów wybranych do badań (uwaga 3), wyniki uzyskane dla pojedynczych przykładów można kwestionować wykorzystując inne pojedyncze przykłady. Przykładowo, aptamer 111 nie mający żadnego wskazanego motywu trawowego lub egzosomowego wiąże się z błonami lipidowymi silniej niż większość badanych aptamerów z takimi motywami (Rysunek 25). Ta sama uwaga dotyczy (nawet w większym stopniu) doświadczeń wykorzystujących zmutowane warianty aptamerów RNA. I tak w przypadku motywu CCCU można wskazać przykład, w którym usunięcie motywu nie ma wpływu na wiązanie (mutant 13A) lub zwiększa siłę wiązania (mutant 102D), a dodanie tego motywu zwiększa siłę wiązania (mutant 10A i 145A) lub nie ma wpływu na wiązanie (mutant 111). Zależy to zapewne od kontekstu strukturalnego i/lub obecności innych motywów sekwencyjnych, jednak brak systemowego podejścia do wyboru zestawu aptamerów (uwaga 3) utrudnia wiarygodną interpretację uzyskanych wyników.
5. Drobne uwagi edytorskie. Tabele 23, 24, 25 i 26 to raczej rysunki. Sformułowanie „medialne wartości” jest niezręczne, należałoby użyć sformułowania „wartości median”.

Część **Dyskusja** (rozdział 5) zawiera wiele elementów typowo znajdujących się w tej części rozprawy, do których należą podsumowanie uzyskanych wyników, dyskusja tych wyników w świetle dostępnej literatury przedmiotu oraz wnioski. Sposób prezentacji tych elementów wskazuje na dobrą znajomość tematu przez Kandydata oraz krytyczne podejście do własnych wyników (Kandydat dostrzega, że na podstawie uzyskanych wyników nie można jednoznacznie określić znaczenia badanych motywów sekwencyjnych i strukturalnych). Kandydat ma również świadomość słabości zastosowanego podejścia badawczego (np. możliwych wad metod modelowania struktury przestrzennej RNA). Moje zdziwienie wzbudziło jednak włączenie do części Dyskusja sekcji 5.2.2 i 5.2.3, które były *de facto* jedynym miejscem przedstawienia w pracy szeregu ważnych rezultatów otrzymanych w trakcie przeprowadzonych przez Kandydata doświadczeń (i raczej powinny znaleźć się w rozdziale 4 Wyniki). Rozdział Dyskusja jest zakończony czteropunktowym podsumowaniem (sekcja 5.3). Pierwsze trzy punkty mają pełne odniesienie do treści pracy, pewne wątpliwości budzi jednak rozbudowany punkt 4 dotyczący wpływu indywidualnych motywów sekwencyjnych/strukturalnych RNA na siłę oddziaływania z błonami lipidowymi (uwaga 9 poniżej). Trudno jednak nie zgodzić się z finalną konkluzją Kandydata zawartą w ostatnim akapicie wniosków („W przyszłości warto by znaleźć bardziej złożony model, który lepiej mógłby wyjaśnić zależności pomiędzy tymi elementami i stopień w jakim wpływają na powinowactwo RNA-błona”, str. 164).

Uwagi:

6. Kandydat w wielu miejscach podkreśla, że na oddziaływania RNA z błoną lipidową ma wpływ zarówno obecność motywów sekwencyjnych jak i motywów strukturalnych obecnych w strukturze drugorzędowej cząsteczki RNA (oraz kontekst strukturalny dla motywów sekwencyjnych). Niestety, przeprowadzone analizy dotyczą niemal bez wyjątku motywów sekwencyjnych, podczas gdy potencjalne znaczenie motywów strukturalnych jest jedynie pobieżnie wzmiankowane w dyskusji (wyjątkiem jest motyw spinki do włosów). Istotnie obniża to potencjalną wartość poznawczą pracy.
7. Biorąc pod uwagę nieokreśloną reprezentatywność zestawu aptamerów (uwagi 3 i 4) ważnym sposobem wzmocnienia miarodajności uzyskanych wyników byłoby wykazanie istnienia korelacji między siłą wiązania z błonami a liczbą danego typu sekwencji czy motywów strukturalnych RNA. Niestety, analiza taka została przeprowadzona jedynie w przypadku motywu strukturalnego spinki do włosów (Rys. 29) oraz liczby nukleotydów i wartości energii swobodnej fałdowania (Rys. 30); przedstawiona analiza wpływu liczby delecji/insercji bez uwzględnienia ich indywidualnych cech jakościowych nie wydaje się mieć racjonalnego uzasadnienia. Należałoby oczekiwać, że analiza taka zostanie przeprowadzona dla wszystkich motywów sekwencyjnych i strukturalnych. Przykładowo, dyskusja na temat ew. roli sekwencji CCCU (sekcja 5.2.1.) powinna być poparta poprawną analizą korelacji siły wiązania z liczbą tych sekwencji. Recenzent oczekiwałby również, że analiza siły korelacji zostanie przeprowadzona ze wsparciem metod statystycznych. Przykładowo, co oznacza sformułowanie „analizy korelacji nie dostarczyły satysfakcjonującego wyjaśnienia zmienności wartości K_D biorąc pod uwagę obecność motywów strukturalnych” (str. 157)? Kandydat nie definiuje poziomu współczynnika korelacji i jego istotności statystycznej, które uznałby za „satysfakcjonujące”.


8. Konsekwencją zastosowania analizy statystycznej i wprowadzenia progów istotności jest uznanie, że zmiany/różnice nieosiągające takich progów powinny być traktowane jako nieistotne. Dlatego podsumowanie doświadczeń analizujących wpływ mutacji w sekwencji RNA na siłę wiązania do błon lipidowych przedstawione w tabelach 29 i 30 jest niepoprawne metodycznie, gdyż nie rozróżnia efektów uznanych za istotne statystycznie i nieuznanych za takie. W efekcie łączna dyskusja tych wyników rodzi wątpliwości (w tabelach 29 i 30 należałoby przynajmniej zaznaczyć, które efekty zostały uznane za istotne statystycznie).
9. Przedstawione w punkcie 4 wniosków (sekcja 5.3) konkluzje dotyczące potencjalnej roli badanych motywów sekwencyjnych osłabia jednostkowy charakter obserwacji – praktycznie dla każdego proponowanego typu efektu można podać przykład braku takiego efektu lub nawet efektu odwrotnego (patrz uwaga 4). Tak jest również w przypadku najszerzej omówionego motywu CCCU (np. zmiana wiązana aptameru 10A, chociaż znaczna (64%), nie jest istotna statystycznie i trudno na jej podstawie wyciągać wiążące wnioski). Podobnie wniosek o możliwym wpływie jednoniciowego odcinka przy końcu cząsteczki oparty jest o obserwację tylko jednej cząsteczki (aptamer 20).

Podsumowanie.

Recenzowana praca doktorska dotyczy ważnego zagadnienia o istotnej wartości poznawczej i możliwym znaczeniu aplikacyjnym (dostarczenie wiedzy przydatnej dla konstrukcji nowych kombinacji nośnik lipidowy – terapeutyczna cząsteczka RNA). Doktorant wykazał się wymaganą wiedzą i umiejętnościami praktycznymi niezbędnymi do prowadzenia pracy badawczej. W mojej opinii rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata i umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Dlatego niezależnie od szeregu zawartych w recenzji uwag krytycznych przedstawioną mi do oceny rozprawę doktorską pana Rafała Mańki oceniam pozytywnie.

Wniosek końcowy:

W mojej opinii przedstawiona rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 (ust 1-2) Ustawy z dnia 20 lipca 2018r – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018, poz.1668, z późniejszymi zmianami). W związku z tym wnoszę do Rady Naukowej Uniwersytetu Opolskiego o kontynuację postępowania o nadanie panu Rafałowi Mańce stopnia doktora.



prof. dr hab. Piotr Widłak
Gdański Uniwersytet Medyczny