

Posudek na diplomovou práci

Dynamika modifikovaných diamantových nanokrystalů v živých buňkách

Autor práce: Jan Majer

Posudek vypracoval: Radovan Fišer

Předkládaná práce se zabývá vývojem nových povrchů diamantových nanočástic (ND), které by byly schopny dopravovat do buněk cizorodou RNA. U těchto ND bylo cílem charakterizovat způsob jejich dopravy do buněk. Práce je psána poměrně čtivou angličtinou. Ve výsledkové části bohužel velmi zhuštěně.

Cíle na str.19 jsou poměrně jednoznačně formulované: I. Examine the transfection efficiency of NDs complexed with siRNA and their effects on cell physiology, II. Determine the mechanism of ND:siRNA complexes uptake, III. Observe intracellular fate of ND:siRNA complexes. Poněkud překvapivě pak zní názor, že pro lepší pochopení dopravy ND nám pomohou nanočástice s dosud nepopsaným, nově vyvinutým povrchem „...and how NDs interact with intracellular trafficking system. To achieve this, NDs with novel surface polymers, which may interact with cell's trafficking system in a yet unknown fashion, were developed“.

Práce obsahuje velmi pěkný literární přehled čerpající z recentní literatury. V seznamu literatury však chybí většina prací využitých při tvorbě obrázků.

Dále zde najdeme poměrně podrobný popis velkého množství použitých metod. Většinou jsou zde uváděny potřebné detaily, text působí vcelku profesionálně. Popis modifikace povrchu ND je sice velmi podrobný, ale jednotlivé kroky nejsou bohužel zdůvodněny. Není také jasné, k čemu byly užitečné jednotlivé kroky centrifugace a sonikace. V metodice chybí údaje o agregaci sledované např. DLS apod. Pokud byl celý protokol přejet z (Rehor et al., 2014), pak tato skutečnost měla být přesněji uvedena. Specifikace zrychlení "40 kG, 1 h" je nešťastná. Popis qPCR experiments, Cytotoxicity and proliferation assays, atd. je velmi přesný a podrobný.

Velmi oceňuji promyšlené porovnání účinnosti transfekce zkoumaných pomocí nanočástic s jinými postupy. K samotnému porovnání mám určité připomínky (místy chybná metoda normalizace). Není zde uvedeno žádné statistické hodnocení (kromě výpočtu PCC u kolokalizace).

Ve výsledkové části, která se týká mikroskopie, jsou výsledky představovány až příliš stručně. Fig 14, 15, 16, 17 a 18 jsou např. komentovány v jediném odstavci na str. 37. Výsledková část je celkově poměrně nepřehledná a hůře čitelná. Na Fig 27 je odkazováno před Fig 20. Komentář k Fig 27, str. 51 je už na straně 42! Poslední část výsledků je pro čtenáře již prakticky nepochopitelná. V tomto místě by se patrně hodilo kombinovat výsledky a diskusi, aby čtenář mohl průběžně pochopit, co si autor o získaných datech myslí.

Diskuse je výborná a dosti rozsáhlá - 8 stran velmi koncentrovaných úvah a porovnávání vlastních výsledků s literaturou. Oceňuji rozvahy nad specifitou použitých inhibitorů. V diskusi se řeší uplatnění jednotlivých typů endocytózy při transportu ND, význam konkrétních buněčných kompartmentů, ale třeba i kinetika disociace RNA z nanočástic. Bohužel se v diskusi neobjevují zpětné odkazy na obrázky z výsledkové části. Velmi by to pomohlo snazšímu pochopení uváděných úvah.

Autorovi se podařilo připravit/modifikovat diamantové nanočástice tak, že byly schopny dopravovat do savčích buněk molekuly siRNA. Uvolněná RNA pak byla použitelná pro regulaci genové exprese. Cílem práce bylo i prozkoumat, jakým mechanismem jsou ND do buněk transportovány. Autor dospěl k závěru, že se jedná o kombinaci endocytózy zprostředkované clathrinem i caveolinem. Role makropinocytózy zůstává nevyřešena. Ačkoliv mám k práci celou řadu připomínek, pokládám předkládaný rukopis za celkově velmi kvalitní. Je zjevné, že se autor naučil velkému množství metod a získal mnoho cených výsledků, které využije v dalším výzkumu.

Otázky oponenta

1. Autor zmiňuje, že velikost ND a jejich náboj, jsou zásadní pro "schopnost" ND projít do buňky. Jak se mění ζ -potenciál ND po navázání různého množství RNA?
2. Je "klastrování" ND v médiu během pokusů na živých buňkách ireverzibilní?
3. Účinnost tranfekce byla sledována snížením exprese genu GAPDH. Je tento gen dobrým reportérem, nebo by bylo možné očekávat odlišné výsledky při použití jiných genů?
4. Jak je závislé procento transfekovaných buněk na koncentraci ND:siRNA a jak je na koncentraci závislá cytotoxicita?
5. Jak se projeví úbytek RNA vázané na ND v "extracelulární" kolokalizační analýze? Jak byly upraveny intenzity, které byly do kolokalizace započítávány? (prosím stručnou odpověď)
6. Bylo by možné, že každá endocytická dráha povede u konkrétních částic k rozdílné efektivitě uvolnění RNA? Dalo by se to nějak testovat?
7. Autor v úvodu vyzdvihuje vlastnosti ND jako je jejich "netoxicity". Jak je to s toxicitou vůči bakteriím?
8. Jaký je mechanismus určení ζ -potenciálu a jaká je chyba jeho stanovení? Proč v 50% HPMA:DMAEMA při pH 10 je ζ -potenciál 0mV? (Fig 8). V jakém pufru bylo stanovení provedeno? V kapitole 3.2.5. to není jasně uvedeno.
9. Fig 16b ukazuje na naprosto dokonalou kolokalizaci ND a EEA1 a to pouze extracelulárně. Jedná se patrně o artefakt, prosím o komentář.

Faktické připomínky (netřeba reagovat, pouze k úvaze)

Využíváte ND jako fluorescenční sondy. Uvádíte, že bohužel svítí „málo“. Čím je to vyvoláno? Mají nízký extinkční koeficient nebo nízký kvantový výtěžek? Jakou mají dobu života excitovaného stavu?

RF: agregáty ND:siRNA o velikosti kolem 7 μm ve vzorku s FBS (Fig 11a, maximum vpravo) se nečekaně objevily i ve vzorku bez FBS po 5 minutách inkubace (Fig 10, červeně). Máte nějaké vysvětlení? Jak intenzita souvisí s počtem částic v tomto vynesení?

First, NDs coated with a novel cationic co-polymer were prepared. RF: Jak by se asi chovaly jiné částice s tímto ko-polymerem?

str.3: An undeniable advantage of organic NPs is their biodegradability and therefore there is no need for taking exocytosis into account in their design (Garbuzenko et al., 2014). RF: designuje někdo opravdu exocytózu NP?

RF: oceňuji zamyšlení nad vlivem tvaru a velikosti DNP pro průchod membránami...

RF: ale záhadné: Furthermore, all shapes passed the cell membrane similarly through diffusion and through ATP-mediated endocytosis.

RF: Čím by obecně mohla být vyvolána (cyto)toxicita ND?

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and other factors of hypoxic cancer cells induce angiogenesis in order to reach O_2 , release CO_2 / HCO_3^- and lower both their environmental and intracellular pH. RF: in order ?? jedná se o úmysl buněk nebo molekul??

In addition, introduction of NDs to cells do not cause reactive oxygen species (ROS) related genes upregulation (Hemelaar et al., 2018). RF: to bude asi záviset na povrchové modifikaci.

Nerozumím úvahám o "jiné pozici" UV laseru a ostatních zdrojů excitace. Pokud se obrazy pro různé vlnové délky liší posunem v XY rovině, pak je potřeba seřadit mikroskop, případně korigovat výsledný obraz. Nebyl zde spíš problém s odlišnou hodnotou laterálního rozlišení při velmi různých vlnových délkách?

Kvantifikace množství ND, které vstoupily do buněk, byla prováděna na snímcích z konfokálního mikroskopu. Jak je tato metoda závislá na vybrané rovině v Z ose? Nebo byly testovány všechny optické řezy buněk?

Technické připomínky (netřeba reagovat)

Legendy jsou připojené přímo k obrázkům v grafické podobě. Obrázek se proto nedá dohledat v pdf souboru pomocí Ctrl+F. Mnohem vážnějším následkem bohužel je, že práce, z nichž byly obrázky přežaty, nejsou citovány v seznamu literatury. Figure 2, 4, 5.

Desetinná čísla musí být psána s tečkou (str.52, Fig 9, 10, 11, 17, 19)

str.17: druhý odstavec o "Short interfering RNA (siRNA)" se zdá být poněkud vytržený z kontextu a je poněkud naivní a méně přehledný.

Při uvádění sekvencí (Tab.1) by bylo vhodné použít písmo s pevnou šířkou symbolů.

str.24.: 3.2.1. Surface silication: hned první část metod (příprava ND) obsahuje informace o sonikaci vzorků. Není však možné dohledat skutečné parametry sonikace (použitý přístroj, výkon [W], frekvence [kHz], chlazení). Sonikace s malým výkonem nemá např. na ND prakticky žádný vliv.

3.2.4. ND:siRNA complex preparation: RF: nerozumím, v jakém kroku měla RNA koncentraci 100mM. Jedná se zjevně o překlep.

RF: co to znamená "emission 450 nm/ background 630 nm"?? Jaká byla vlnová délka excitace?

Pro fluorescenční transferrin jsou používány různé zkratky.

3.2.12. Microscopy: chybí přesná specifikace objektivu, konkrétně NA.

Supplementary script 1,2: jsou spíše makra programu ImageJ, než scripty. Formátování kódu je nešťastné, ale celkově oceňuji, že autor tuto část v práci uvedl. Dá se nějak schématicky popsat co tato dvě "makra" s mikroskopickým obrazem provádějí?

Analyse particle within the ROI boundaries with a size range 5-500 pixels.

RF: nejedná se o px ale px^2 . Není hodnota "5" zbytečně malá?

RF: v textu se neuvádí rozlišení snímků.

Background noise was subtracted. RF: jednalo se spíše o konstantní intenzitu pozadí, která byla odečítána, než o odstranění šumu v obraze.

Coloc 2 calculated Pearson's Correlation Coefficient (PCC) which was selected for colocalization data interpretation.

RF: jaké hodnoty PCC bychom tedy měli pokládat za hraniční? Byla prováděna jakási "kalibrace" PCC pro tyto konkrétní snímky? Nepochybně není možné očekávat např. hodnotu PCC=1.

4.1: In order to determine their stability, NDs' hydrodynamic diameter and ζ -potential in pH 7.4, 8, 9, and 10 were measured (figs. 8b, c.). RF: aby bylo možno sledovat stabilitu, byla by patrně nutná určitá inkubace v různých podmínkách, což zde není uvedeno.

Effect of serum was observed overtime, but no significant shift in stability was observed at first.

RF: co je tedy "shift in stability" ???

Normalizace ve Fig 12 není patrně provedena správně, neboť "wildtype" (100%) nemá uvedeny chybové úsečky. V tomto provedení (kdy jeden vzorek má nulový rozptyl) není možné provést statistické porovnání efektu jednotlivých použitých látek. Co přesně znamená "wildtype"? Jedná se o "neopůsobené" buňky?

No significant differences were measured (fig 12b.) RF: byl prováděn nějaký test rozptylu? Pokud ne, pak je toto tvrzení neoprávněné.

Fig 13: musí obsahovat přesně hodnoty 0% a 100% pro pozitivní a negativní kontrolu. Proč tomu tak není? Na svislé ose postrádám "odrážky". Záporné hodnoty je zbytečné uvádět {také Fig 27, 28}.

Mezi Fig 16 a Fig 17 postrádám ukázkou, jaké "částice" byly rozpoznány a dále kvantifikovány pomocí Fiji.

Názvy obrázků jsou nepochopitelné bez znalosti celého textu - např. Fig 15: "DMSO control in Dynasore group".

U snímků z konfokálního mikroskopu postrádám podrobnější legendy. Není zřejmé, kdy byl použit "unmixing" a kdy se díváme na snímky pouze s upraveným kontrastem.

U Fig 18 je zmiňována kolokalizace ND a Cav-1. Pokud by však byla kvantifikována pomocí PCC, vyšla by patrně nevýznamná.

Opakovaně se vyskytující věty začínající číslem {str 42} jsou naprosto nevhodné:

7% colocalization of NDs with A488 secondary antibody labelled EEA1 was detected already 15 minutes after ND:siRNA complexes introduction to cells' medium.

45 minutes into incubation, the colocalization raised to 9%.

90 and 120 minutes after the beginning of incubation, increase of colocalization began to presumably reach a 15% plateau (fig. 27a),...

Výpočet PCC by mohl být dokumentován na ukázkce "dot plotu", kde by byly na osách intenzity

porovnávaných kanálů v jednotlivých pixelech. Tato analýza je totiž zásadně ovlivněna "prahováním" a tedy vlivem člověka. Není vůbec jasné, čemu odpovídají hodnoty % ve Fig 27. Jedná se o převedení PCC {v rozsahu 0...1} na procenta, nebo o určitá procenta plochy obrazu? Čemu pak odpovídají chybové úsečky při stanovení střední hodnoty PCC??? Fig 27, 28.

Neobratnosti a zkratkovité vyjadřování:

The exact same tactic...

Although the number of internalization mechanisms is large, ...

During caveolae pit formation, membrane-bound cholesterol binds to caveolin-1 (Cav-1) and Cav-3. Cav-1 can directly curve the membrane in vitro. In vivo, however caveolins require more

Measured data was automatically subtracted from blank wells.

VS does not dry, therefore nail polish was used to fix the coverslips in place.

Data was acquired through confocal microscopy.

Then, colocalization analysis data of NDs, siRNA and endosomal structures were acquired from Fiji Coloc 2 plugin Coloc 2

V legendách obrázků se objevují častější chyby kolem závorek.

Fig 11b nemá označní "b".

Fig 12b "widtype"

All data was related to housekeeping genes β -actin ... "normalized to"?

str.7: "neutrally charged N-V0" RF: nešťastná formulace