

Stanislav Indik, PhD  
Institute of Virology  
University of Veterinary Medicine Vienna  
Veterinärplatz 1  
A-1210 Vienna  
Austria

vetmeduni  
vienna 



**Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Dalibora Miklíka nazvané "Integration site distribution of expressed proviruses" .**

Předkládaná disertační práce Mgr. Dalibora Miklíka, vypracovaná v laboratoři Jirky Hejnara na Ústavu molekulární genetiky v Praze, se zabývá integrační specificitou retrovirů. Jde o velice důležité téma s bezprostředním přesahem do kliniky a léčby pacientů se závažnými onemocněními metodou genové terapie. Retroviróvé vektory na bázi viru HIV-1 byly před dobou nedávnou minulou schváleny ústavem pro kontrolu léčiv v USA (FDA) pro léčbu některých druhů rakovinových onemocnění. Například se tyto nástroje, díky své efektivitě, používají pro vnášení genů pro expresi "chimeric antigen receptoru" (CAR-T) do T lymfocytů. Následně se tyto modifikované T buňky používají na cílenou imunoterapii.

Neřízená integrace retroviróvé vektorů je jedním z nedostatků těchto léčiv. Práce zabývající se pochopením zákonitostí, které určují specificitu integrační reakce, jsou tudíž velice žádané a mohou přispět ke zvýšení bezpečnosti retroviróvé vektorů. Stejně tak je důležité pochopit mechanismy a zákonitosti vedoucí k zastavení exprese genů integrovaných prostřednictvím retroviróvé vektorů, což si dal za cíl autor tohoto rukopisu.

Z výše uvedeného vyplývá, že téma zvoleného výzkumu je velice atraktivní. Vzhledem k tomu, že tuto problematiku sleduji, jsem se na čtení rukopisu velice těšil. Nicméně musím konstatovat, že manuskript je napsán velice těžkopádně a v podstatě znemožňuje úplné pochopení myšlenkových pochodů autora. Autor rukopisu se snažil pro popis problému použít vědeckou angličtinu. Podle mého názoru se to autorovi nepovedlo a použitý jazyk, jakkoliv ho nazveme, je spíše na škodu věci. Autor používá celou řadu nevědeckých termínů, žargon a velice dlouhá souvětí. V některých souvětích dokonce na konci věty vedlejší vyvrací tvrzení uvedená na začátku věty hlavní. Jako by si autor nebyl jistý tím, o čem chce čtenáře přesvědčit a raději to nechá na jejich úsudku. Rovněž je zajímavé, že autor nechal celou řadu vět nedokončených, respektive ukončených uprostřed slova. Nabízí se otázka, jestli po sobě autor manuskript četl nebo jestli požádal kolegu či kolegini, aby text prošel a pomohl odhalit chyby tohoto typu. Spíše to vypadá na to, že se autor pokusil nahradit kvalitu zpracování kvantitou podaných informací. Bohužel jsou tyto informace často nepřesné či neúplné, což znemožňuje ocenit rozsah provedené práce. Je mi jasné, že se jedná po experimentální a bioinformatické stránce o velké množství práce, která je zahrnuta v tomto rukopisu. Proto je nesmírná škoda to, že autor nevěnoval více pozornosti preciznosti písemného zpracování, což by umožnilo práci dostatečně ocenit. Evidentně autor podcenil složitost vytváření výstupu vědeckého bádání, které musí být přesné, dostatečně podrobné a musí složité věci podávat formou, která vtáhne čtenáře do děje. Nerozumím tomu, že jsou obrázky v textu v některých případech popsány nedostatečně. A naopak, v některých obrázcích chybí důležité informace jako např. poukázání na to, že

byla provedena nějaká statistická analýza, zapomenutá legenda (legenda musí být uvedena u každého podobrázku a ne jen pro panel A), atd. Vypadá to jako by ke konci výsledkové části došla autorovi síla a chuť popsat co vše analyzoval a nechává to na čtenáři aby si to jaksi odvodil sám. Rovněž by bylo dobré kdyby autor sjednotil formu, kterou uvádí citace ....studies of Narezkina et., al (2004) -> studies of Narezkina group (Narezkina et al., 2004). Nezbývá než doufat, že experimenty a následné bioinformatické analýzy byly provedeny s větší precizností než popis metodiky a výsledků pospaných v rukopisu.

#### **Věcné připomínky:**

Má největší věcná připomínka se týká použité metodiky pro stanovování integračních míst. Autor píše, že použil různé restriční enzymy (MseI, DpnII, NlaIII, SpeI, NheI, XbaI (mimořádně není DpnII methylation sensitive? Je dobré používat takový enzym?)) i nahodné štěpení DNA, pro různé viry. Proč autor nepoužil stejný enzym pro všechny viry? Proč nebyl experiment designován tímto směrem? Stačilo by pozměnit sekvenci molekulárního klonu virového vektoru takovým způsobem, že by bylo možné použít stejný enzym pro všechny viry. Tím by odpadl problém s vytvářením různých „uniquely matched random controls“ (umMRC). Mimořádně, autor dostatečně nevysvětlil proč tyto kontroly dělal a pro čtenáře neznalé této problematiky je to v podstatě nepochopitelné. Podle mého názoru, použití různých enzymů znemožňuje mezivirové srovnání. Krásně je tento problém zdokumentován např. v obrázku č. 16. Sice to není popsáno, ale předpokládám, že pro ASLV, HIV a MLV byly vytvořeny různé umMRC kontroly. Na obrázcích 16A, 16C a 16E je jasně patrné, že se náhodné kontroly výrazně liší (i když v tomto případě autor o případných statistických variacích mlčí). Jak pak může autor srovnávat jednotlivé viry?

Některé obrázky jsou příliš malé a v podstatě nekomentované v textu (např. obr. 18). Proč autor mění formu zobrazení stejných výsledků v průběhu textu. Nejdříve autor používá box plot (obr. 17) pak přejde na jinou formu zobrazení (obr. 22) aby se opět vrátil k box plotu (obr. 28). Proč autor používá tak malé box ploty, kde není ani viditelný median. Jak si pak může čtenář udělat obrázek o výsledcích? Jaký smysl má relative distance to TSS? Relative distance autor definuje takto: Unlike the absolute distance to TSS, the relative distance indicates the distance to a particular TSS belonging to the targeted TU for intra-TU integrations and for inter-TU integrations is equal to the absolute distance to TSS. Podle této definice mi není jasné jak může vzdálenost nabývat negativních hodnot. Vždyť podle této definice by se hodnoty měly oproti absolutní vzdálenosti zvětšovat. A to z toho důvodu, že pokud provirus skončil v TU, pak se bere do úvahy jeho vzdálenost k začátku stejné TU. Bylo by dobré definici upřesnit, objasnit.

Jak autor vysvětlí velice malý počet analyzovaných klonů AG stable v obrázku 9B? Autor popisuje, že získal 74 klonů. Nicméně v obrázku je viditelně jen klonů 13. Kde je zbytek? Není počet příliš malý, ve srovnání s jinými viry?

Za jeden z nejzajímavějších výsledků považuji rozdílnou integrační specifitu ASLV-AG a ASLV-AG2IE (obr. 10, 11). Neselektované viry se integrovaly statisticky významně rozdílně. Proč to autor nekomentuje? Je CpG sekvence opravdu tak důležitá, že dokáže změnit integrační specifitu viru ASLV? Pozmění to nějakým způsobem interakci ASLV integrázy s buňčnými faktory určujícími specifitu? A nebo si autor nebyl jistý, že významnou odchylku detekoval kvůli použití rozdílné metodiky (restričnímu enzymu)?

Závěrem nutno konstatovat, že ve vědě, jakožto i v jiných lidských činnostech platí, že pouze a jedině precizní zpracování výsledků a jejich výborná prezentace umožní ocenit obrovské množství práce které je za tímto a jinými projekty. Bylo by velice přínosné pro Mgr. Miklíka, kdyby měl možnost připomínky oponentu zahrnout do finálního rukopisu. Bohužel, jak jsem byl informován, není v ČR možné připomínky oponentů začlenit to textu disertační práce. Tato praxe je výrazně odlišná od procesu praktikovanému např. v průběhu schvalovacího procesu diplomových a disertačních prací v Rakousku. Zde tento proces zahrnuje vypracování posudků, na základě kterých je práce vylepšena a teprve poté je doktorská práce ve své finální podobě odevzdána komisi. Možná by stálo za zvážení tento dvoustupňový proces vytvořit i v ČR. Přece jenom se svět se na ČR dívá i prostřednictvím výstupů vědeckých prací ve formě disertací. A jedině kvalitní výstupy mohou obraz ČR vylepšit. Pokud se má plán Inovační strategie ČR 2019 – 2030 stát skutečností, zavedení dvoustupňového procesu by bylo správnou cestou.

#### **Pár otázek jako základ pro diskusi během obhajoby doktorské práce.**

1. Doporučil by autor této práce začlenění CpG elementu do LTR sekvencí retrovirových vektorů pro genovou terapii? Proč ano či ne?
2. Doporučil by autor této práce používání interních, neretrovirových promotorů pro expresi transgenů jako např. výše zmíněný CAR-T? A případně který?
3. Autor ve své práci nezmiňuje používání insulatorů, které mohou odizolovat efekt buněčných elementů jako např. enhanceru na expresi genu začleněných v proviru. Mohl by autor problematiku insulatorů trochu osvětlit a případně doporučit jejich použití při genové terapii.
4. Vidí autor v budoucnosti možnost cíleně integrovat retroviry do bezpečných míst v genomu?
5. Který retrovirový vektor či jiný způsob dopravy genu do buněk by autor doporučil pro využití v genové terapii? A proč? (i s přihlédnutím na stabilitu, bezpečnost a dostatečnou produkční kapacitu)

Na úplný závěr si dovoluji shrnout hodnocení práce Mgr. Dalibora Miklíka. Z dodaného rukopisu je evidentní, že doktorand vynaložil obrovské až enormní úsilí v laboratoři a před monitorem při zpracovávání získaných dat. Dokázal nejenom navázat na práci svých předchůdců, ale vyvinul nové a lepší metodiky a posunul práci o kus dále. Je jen obrovskou škodou, že práci precizně nepopsal v dodaném rukopisu. Řádný a precizní popis vědeckých výstupů zůstává výzvou, kterou bude muset budoucí PhD překonat, pokud zůstane ve vědeckém prostředí.

I přes některé výhrady ohledně preciznosti psaného výstupu hodnotím disertační práci Mgr. Dalibora Miklíka jako zdařilou. **Doktorská práce splňuje požadavky na disertační práci v oboru Molekulární a buněčná biologie, genetiky a virologie.**

Vídeň 6. srpna 2019

Stanislav Indik