

Posudek na bakalářskou práci

<input checked="" type="checkbox"/> školitelský posudek <input checked="" type="checkbox"/> oponentský posudek	Jméno posuzovatele: Petr Heneberg Datum: 5. 5. 2024
Autor: Saskia Sabolová	
Název práce: Using CRISPR-Cas9 gene editing to engineer the next generation of CAR T cells	
<input checked="" type="checkbox"/> Práce je literární rešerší ve smyslu zveřejněných požadavků (pravidel). <input type="checkbox"/> Práce obsahuje navíc i vlastní výsledky.	
Cíle práce (předmět rešerše, pracovní hypotéza...) Je deklarován cíl popsat CAR T buněčné terapie jako způsob léčby nádorových onemocnění, s vyzdvižením designu a limitací existujících terapií. Autorka dále upřesňuje, že se zaměří zejména na implementaci CRISPR-Cas9 technologie v CAR T buněčném inženýrství.	
Struktura (členění) práce: Práce obsahuje dvojjazyčný abstrakt, seznam zkratk a sedm kapitol, které jsou dále detailněji členěny. Jednotlivé kapitoly představuje Úvod, Základy CAR T buněčné terapie, Využití CRISPR-Cas9 jako nástroje editace genů, Využití CRISPR-Cas9 v CAR-T buněčném inženýrství, Klinické studie, Závěry a výhledy do budoucna a Seznam referencí.	
Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? Práce cituje 80 referencí, z toho 15 je z let 2022-2024. Reference z r. 2024 představují přehledové články a aktuální vydání epidemiologické nádorové statistiky; starší reference již ale odkazy na primární literaturu obsahují. Část referencí se odkazuje do časopisů typu Int J Mol Sci nebo Cancers, většina odkazů je ale na články v relevantních kvalitních časopisech. Formátování referencí je nejednotné, mnohé např. odkazují na časopis předložkou „In“, zatímco jiné ji nevyužívají, další uvozují ročník zkratkou „Vol.“ a číslo slovem „issue“, zatímco jiné této varianty opět nevyužívají. Všem referencím chybí paginace, která je nahrazena doi odkazy.	
Pokud práce obsahuje (nadstandardně) i vlastní výsledky, jsou tyto výsledky adekvátním způsobem získány, zhodnoceny a diskutovány? Práce neobsahuje vlastní výsledky.	
Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň): <ul style="list-style-type: none"> - Některé termíny jsou používány ve více podobách – např. v obsahu, v některých nadpisech a i porůznu v textu se objevuje spojení „CAR-T“ s pomlčkou, zatímco v cílech práce je užíván tento výraz bez pomlčky. - Obdobně „PD-1“ je užíván s pomlčkou i bez pomlčky. - Místo je užíván nejednotný font (např. na 5. řádce kapitoly 1 v textu „efficiency (Zhao & Cao, 2019) and“ - Formátování odkazů referencí v textu je velmi nejednotné – např. v kapitole 1 	

se vyskytuje formát „(Ren, Liu, et al., 2017)“, „(L. Tang et al., 2023)“ i klasický „(Marofi et al., 2021)“

- Reference na webové stránky jsou formálně nedotaženy, viz např. na str. 1 odkaz „(source: ClinicalTrials.gov).“
- Práce je psána srozumitelnou angličtinou, jen s minimem chyb, např. „except for one of the patients, that developed graft-versus-host disease“
- Práce obsahuje tři tabulky a dva obrázky. Obrázky jsou převzaty z jiných prací, tyto jsou citovány (oba z časopisů vydávaných nakladatelstvím MDPI). U obr. 1 je uvedeno, že byl „adapted and modified“, avšak reálně je bez jakýchkoliv úprav převzat pouze s vymazáním nadpisu obrázku. U obrázku 2 je uvedeno, že byl „adapted“, ale je překopírován beze změn ze zdrojového článku. Doporučuji věnovat pozornost popiskům obrázků, které v pracích, odkud obrázky pocházely, byly výrazně komplexnější a dobře je doplňovaly. U tabulky č. 1 je jako zdroj uveden Yang et al. 2024, jde o tabelární formou uvedené výpisky z tohoto článku bez uvedení nebo využití zdrojových citací, které předmětný článek poskytuje. Tabulka č. 2 je krátkým přehledem vlastností navozených mutacemi v Cas9, které se používají pro indukci její nikázové aktivity. Tabulka č. 3 obsahuje seznam klinických studií vybraných na základě nejasných (neuvedených) parametrů z databáze clinicaltrials.gov, bez jakékoliv snahy po dohledání aktuálních výsledků předmětných studií na základě např. prezentací na posledních kongresech, kde bývají recentní výsledky imunoterapeutických studií prezentovány.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Práce si vytkla za cíl popsat CAR T terapie, zejména design a limitace terapií existujících. V práci jsou zdařile popsány principy CAR T terapie a CRISPR/Cas9 techniky, krátce jsou popsány i některé molekulární cíle vedoucí k potlačení inhibičních signálů a toxicity. Chybí ale podrobnější vhled do jednotlivých klinicky testovaných CAR T buněčných terapií, které jsou jen zběžně zmíněny v tabulce č. 3 a v krátkém navazujícím textu. Chybí detailnější popis nastavení jednotlivých aktuálních klinických studií, popis jejich výsledků a jejich dalšího směřování. Zvolené téma je pro bakalářskou práci poměrně obtížné, protože s ohledem na rychlý rozvoj oboru se nelze spoléhat jen na tradiční čerpání z časopiseckých prací, ale je nutno monitorovat i aktuální konferenční abstrakta a šedou literaturu, kde jsou bohužel výsledky klinických studií zveřejňovány často i s několikaletým předstihem před jejich časopiseckou publikací, pokud k této vůbec (v případě neúspěšných studií) vůbec dojde. Formální úroveň práce vykazuje jen drobné nedostatky uvedené výše.

Otázky a připomínky oponenta:

- 1) Tabulka 1 uvádí stupeň infiltrace různých typů nádorů T buňkami. Například, první z uvedených nádorů, světlobuněčný karcinom ledvin, je uveden jako nádor asociovaný s vysokými počty CD8⁺ T buněk. Souhlasím, že zastoupení tohoto typu buněk je u světlobuněčného karcinomu ledvin vyšší než u okolní netransformované tkáně. Ale jiné typy T buněk, jako například resting paměťové CD4⁺ T buňky, bývají také početně zastoupeny (i když méně než v okolní netransformované tkáni). Jakou informaci můžeme extrahovat z tabulky 1 s ohledem na tematiku práce, tedy s ohledem na predikci úspěšnosti CAR-T buněčných terapií?
- 2) V kapitole 3 píšete, že „Since then, it has been restricted for use only *in vitro* and it was 8 years later, in 2020, when CRISPR-Cas9 was first used directly in a human body“. Je pravdou, že léčba daného typu amaurózy byla první terapií provedenou přímo v těle člověka, ale již předtím byly prováděny *ex vivo* terapie buněk a imunoonkologické aplikace, při kterých byly editované

buňky vraceny zpět do lidského organismu (2016 – PD1-editované T buňky, 2019 – NY-ESO-1-směřované T buňky NYCE, CD19 CAR T CTX110, a BCL11A-editované HSPCs CTX001). Úspěšné *in vivo* pokusy na zvířatech byly publikovány v srpnu 2014 (muskulární dystrofie), pokusy na neživotaschopných lidských embryích v dubnu 2015, studie na léčbu amaurózy byla zahájena r. 2017, a konečně v letech 2019-2022 zahájeno hned několik *in vivo* studií na léčbu srpkovité anémie a beta thalasemie (nezaměňujeme s též dostupnými *ex vivo* terapiemi týchž nemocí).

- 3) V kapitole 3.1 je zmiňována PAM sekvence následujícím tvrzením: „For the typically used Cas9 variant purified from *Streptococcus pyogenes*, the PAM is very specific“. V práci chybí rozpracování tematiky možností, jak obejít nutnost cílit editaci výhradně do blízkosti předmětné PAM sekvence. Pro účely obhajoby rozpracujte tematiku druhově specifické heterogenity PAM sekvencí.
- 4) Kapitola 5 – klinické studie – je oproti jiným částem této práce velmi nedotažená. Kromě tabulky s několika studii zmiňuje jedním odstavcem studii NCT04557436 a potom jednou větou studii NCT05812326 s tím, že k druhé ze studií nejsou dostupné žádné údaje. Bylo by vhodné tuto problematiku při obhajobě více rozpracovat, zaměřit se např. na výsledky studií zmíněných v tabulce 3 a publikované mezitím na konferencích (např. poster č. 4629 na ASH, který rozpracovával výsledky terapie pomocí CTX110).

Návrh hodnocení školitele nebo oponenta

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis školitele/opponenta:

Instrukce pro vyplnění:

- Prosíme oponenty i školitele o co nejstručnější a nejvýstižnější komentáře k jednotlivým bodům (dodržujte rozsah), tučně vyznačené rubriky jsou povinnou součástí posudku.
- Při posuzování je nutno zohlednit požadavky stanovené pro vypracování bakalářských prací – viz <https://www.natur.cuni.cz/biologie/studium/bakalarske-studium>
- Posudek je nutné zaslat elektronicky na e-mail masek@natur.cuni.cz pro zveřejnění ve studijním informačním systému UK, a dále doručit vytištěný a podepsaný v jedné kopii, která bude nezbytnou součástí protokolu o státní bakalářské zkoušce, na adresu:

Dr. Tomáš Mašek
Katedra genetiky a mikrobiologie
Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova
Viničná 5
128 43 Praha 2