

Oponentský posudek na disertační práci

Autor práce: **Mgr. Petr Nickl**

Školitel: Doc. RNDr. Radislav Sedláček, Ph.D.

Instituce: Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy

Obor: **Vývojová a buněčná biologie**

Akademický rok zahájení studia: 2019/2020

Jazyk práce: **angličtina**

Název práce anglicky: **Genome Engineering and Diseases Modelling Enhanced by Recombinant AAV Technology**

Název práce česky: Editace genomu *in vivo* pro modelování lidských onemocnění pomocí technologie AAV

Čestné prohlášení oponenta: Prohlašuji, že s Mgr. Petrem Nicklem mám vztah toliko pracovní a není v mém zájmu ho svým posudkem jakkoli zvýhodnit nebo naopak poškodit.

Celkové zhodnocení

Disertační práce Mgr. Petra Nickla se zabývá využitím technologie rekombinantních adeno-asociovaných virů (rAAV) pro modelování lidských onemocnění a editaci genů. Téma je vysoce aktuální, reflektuje současné trendy ve vědeckém výzkumu i klinických aplikacích a přispívá k rozvoji metodologie v oblasti transgenního výzkumu. Významné jsou zejména návrhy na zlepšení škálovatelné produkce rAAV a vytvoření myšího modelu pro studium SARS-CoV-2, které ilustrují přímou aplikovatelnost výsledků této práce.

Autor přináší inovativní řešení několika zásadních výzev, včetně optimalizace přímé konverze alel v zygotách, čímž zkracuje čas i počet zvířat potřebných k dosažení cílového genotypu, což je plně v souladu s principy 3R, které se prolínají celou prací. Nová metoda využívající extracelulární vezikuly (EV) jako matrix pro produkci rAAV představuje významný přínos ke zvýšení efektivity a udržitelnosti produkce rAAV.

Vědecký přínos a originalita

Práce přináší tři hlavní přínosy:

1. Rychlý vývoj myšího modelu onemocnění COVID-19 způsobeného virem SARS-CoV-2: Tento model umožnil testování bi-specifických protilátek, což mělo přímý dopad na klinický výzkum a vývoj terapeutik během pandemie.
2. Nová metoda přímé konverze alel: Zjednodušení genetických modifikací v zygotách pomocí rAAV poskytuje praktické řešení pro zefektivnění transgenního výzkumu.

3. Inovativní produkce rAAV: Využití EV jako matrix pro produkci nabízí vyšší výtěžnost a snížení pracovní náročnosti oproti tradičním metodám.

Autor prokázal důkladnou znalost problematiky a schopnost aplikovat moderní technologie, jako je CRISPR-READI, a přizpůsobit je potřebám experimentálního výzkumu.

Aktuálnost a pravdivost uvedených tvrzení

Autor čerpá z relevantní literatury a uvádí dostatečný počet aktuálních citací. Například úvod do molekulárních principů rAAV a jejich aplikací v modelování nemocí je pečlivě podložen citacemi studií z let 2018–2023. Pravdivost tvrzení je podpořena přímým odkazem na experimentální data a srovnání s tradičními přístupy.

Výsledky jsou prezentovány transparentně, ačkoliv v některých částech by bylo vhodné uvést detailnější porovnání s alternativními metodami, například u využití EV ve srovnání s bakulovirovým systémem (BEVS).

Zhodnocení citací a formální stránky práce

Práce obsahuje adekvátní a správně formátované citace v souladu s akademickými standardy. Citovaná literatura je relevantní a pokrývá široké spektrum klíčových témat.

Při hodnocení předložené disertační práce jsem vycházel z požadavků oborové rady pro obor Vývojová a buněčná biologie v akademickém roce 2019/2020, ve kterém Mgr. Petr Nickl zahájil postgraduální studium v prezenční formě.

Předkládaná práce je psána v angličtině jako komentovaný soubor prací a **obsahuje následující části:**

- Abstrakt – v anglickém a českém jazyce v rozsahu 234, resp. 232 slov (maximum 500)
- Úvod – rozsah 29 stran
- Cíle práce
- Materiály a metody – obsahuje komentář k metodám, které jsou součástí autových publikací, resp. rukopisu v přípravě
- Výsledky – obsahují kompletní přetisky autorových publikací a rukopisu v přípravě, všechny s krátkým úvodním komentářem
- Diskuse – rozsah 9 stran (minimum 10 stran)
- Shrnutí – rozsah 1 strana
- Doprovodné oddíly – seznam zkratk, prohlášení popisující roli žadatele v publikovaných pracích, včetně podrobného prohlášení o jeho úloze při přípravě textů publikací

Ačkoli diskuse nemá minimální požadovaný rozsah (90 %), ostatní části práce splňují požadavky zcela, a práce tedy celkově požadavky splňuje.

Publikační předpoklady: Doktorand ve své disertační práci předkládá dvě původní publikace, na jedné z nich je prvním autorem, jednu přehledovou publikaci, na níž je prvním autorem a jeden rukopis v přípravě, na němž je rovněž prvním autorem. Obě původní publikace jsou v časopisech s recenzním řízením, indexovaných ve WoS a s IF nad mediánem oboru, jak ještě upřesňuji dále.

Pro získání uceleného obrazu o publikační činnosti doktoranda považuji za důležité zmínit rovněž další publikace, které nejsou podkladem předložené disertační práce. Jedná se o čtyři původní a jednu

přehledovou publikaci v časopisech s IF 2,0 – 6,6, na kterých je pan magistr 2. – 7. spoluautorem a tematicky spadají do období před zahájením práce zaměřené na rAAV.

Vzhledem k tomu, že pan magistr ve své práci neuvádí bibliometrické údaje svých publikací, shromáždil jsem je pro účely tohoto oponentské posudku:

Periodikum	Rok publikace	Typ publikace	Impakt faktor (IF)	Kvartil (JIF)	Pořadí autora
Nature	2021	Původní	69,5	Q1	4.
Frontiers in Drug Discovery	2022	Přehledová	-	-	1.
Scientific Reports	2024	Původní	3,8	Q1	1.
Cells	2020	Přehledová	6,6	Q2	2.
Cells	2022	Původní	6,0	Q2	3.
Genes	2023	Původní	2,8	Q2	4.
Frontiers in Endocrinology	2024	Původní	3,9	Q2	7.
Developmental Dynamics	2024	Původní	2,0	Q2/Q3	2.

Z uvedeného vyplývá, že doktorand splňuje požadované publikační předpoklady.

Jazyková úprava a správnost

Práce je napsána angličtinou na vysoké úrovni. Text je srozumitelný a v kapitolách, podkapitolách a odstavcích přehledně členěný. Ilustrace jsou zpracovány pomocí moderních nástrojů a tomu odpovídá i jejich vzhled.

Zejména úvodní část práce však obsahuje i řadu chyb, z kterých zmiňuji následující:

- Seznam zkratk není úplný a obsahuje chyby
- Již zavedené zkratky jsou zaváděny opakovaně
- Věty, které mají tvořit v souvětí, jsou odděleny
- Někdy jsou fakta uvedena v nevhodném pořadí
- Chybí definice tropismu AAV
- Citace uvedená v legendě Obr. 1 chybí v seznamu literatury
- Legendy k obrázkům opakovaně na jiné stránce, než obrázků
- Faktické chyby zavedené zejména během adaptace originálních ilustrací
- Nedostatečné rozlišování genů a jimi kódovaných proteinů ve věcné i textové rovině

Ačkoli práce není bez chyb, což při jejím rozsahu 190 stran ani nelze očekávat, nemají tyto výrazný dopad na celkovou srozumitelnost a korektnost a v žádném případě nesnižují vědecký, odborný a praktický význam práce.

Kontrola plagiátorství

Míra shody s již publikovanými pracemi získaná pomocí nástrojů Theses.cz a Turnitin byla 39, resp. 33 %. V případě Theses.cz byla nalezena významnější shoda pouze s předchozími příspěvky autora, resp. závěrečnými pracemi jeho spoluautorek (Linn Amanda Syding,

Veronika Iatsiuk), které obsahovaly přetisky jejich společných publikací. Dále byla nalezena shoda s řadou dokumentů $\leq 1\%$. V případě Turnitin se jednalo o velké množství shod $\leq 1\%$.

Lze tedy konstatovat, že Mgr. Petr Nickl se při zpracování své disertační práce plagiátorství nedopustil.

Závěr

Mgr. Petr Nickl svými dosavadními výsledky bohatě prokázal schopnost samostatně vědecky pracovat na velmi vysoké, mezinárodní úrovni. Jeho disertační práce splňuje požadavky příslušné oborové rady a vedení Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy a přináší excelentní, originální vědecké výsledky s významným aplikačním přesahem. **Navrhuji proto práci k obhajobě a doporučuji udělení titulu Ph.D.**

Doplňující otázky oponenta k obhajobě disertační práce Mgr. Petra Nickla

1. Je dle Vašeho názoru integrace do genomu hostitele závažným problémem pro využití AAV v humánní genové terapii? Jsou dostatečně známy molekulární mechanismy integrace? Existuje způsob, jak integraci zcela eliminovat? Pokud ano, bylo by úsilí vynaložené na eliminaci integrace úměrné míře rizika s ní spojeného?
2. Bylo by dle Vašeho názoru možné použít rAAV jako vektor pro genovou terapii autosomálně dominantního tubulointersticiálního onemocnění ledvin (ADTKD), které postihuje zejména epitelové buňky ledvinných tubulů v důsledku aktivace odpovědi na špatně sbalené proteiny (UPR) a stresu endoplasmatického retikula? Pokud ano, jakou byste volil strategii (sérotyp, způsob aplikace...)?
3. Jaká další infekční virová onemocnění by mohla být modelována pomocí vámi vyvinutých přístupů?

V Praze dne 30. 12. 2024

Ing. Petr Vyleťal, Ph.D.