

V Praze, 27. 9. 2013

Oponentský posudek doktorandské dizertační práce**Ing. Mgr. Ivana Štěpánka****Imunoterapie nádorů asociovaných s virem HPV16****a regulace protinádorové imunitní odpovědi****Zaměření disertace**

Epigenetická modulace MHC I může zviditelnit buňky nádorů pro imunitní systém, a proto by mohla mít významný terapeutický potenciál.

Autor se ve své práci zabýval účinností vakcinace pomocí dendritických buněk proti nádorům asociovaných s virem HPV16 a analýzou působení 5-azacytidinu a trichostatinu A na imunitní systém s důrazem na zrání dendritických buněk. Dále sledoval vliv podávání anti-CD25, která je používána k odstranění T regulačních buněk nesoucích CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Treg), na iNKT buňky.

Rozbor dosažených výsledků

Výsledky disertace byly publikovány ve čtyřech publikacích, u jedné z nich je Ivan Štěpánek prvním autorem, u jedné autorem druhým avšak se stejným podílem na práci jako autor první. Podíl doktoranda na všech uvedených pracích je významný.

Hlavní výsledky prací:

- 1) Růst MHC I-deficientních nádorů asociovaných s virem HPV16 u myší kmene C57BL/6 nejvíce inhibovaly dendritické buňky pulsované virovým peptidem E7₄₄₋₆₂, který nese jak epitopy prezentované CTL buňkám, tak epitopy prezentované Th buňkám.
- 2) Inhibici růstu MHC I-deficientních nádorů u samců kmene C57BL/6 zvyšuje chemoterapie inhibítorem metyltransferáz 5-azacytidinem v kombinaci s buňkami produkujícími IL-12, anebo s CpG oligodeoxynukleotidem 1826 (CpG 1826), agonistou TLR9 .
- 3) Inhibitor metyltransferáz 5-azacytidin a inhibitor histondeacetyláz trichostatin A významně ovlivňovaly zrání jak myších (samci kmene C57BL/6), tak lidských dendritických buněk indukované CpG 1826 nebo LPS tím, že tlumily produkci cytokinů a jejich receptorů.
- 4) Podání protilátky proti CD25 samcům myší C57BL/6 nejenže odstranilo Treg, ale také vedlo ke snížení produkce IFN γ iNKT buňkami po indukci glykosfingolipidem α -galaktosylceramidem.

Všechny tyto výsledky mají potenciální význam pro imunoterapie nádorů.

Autor pro představení práce předložil tzv. krátkou formu skládající se z publikací získaných během práce na projektu, krátkého literárního úvodu a diskuse.

Připomínky: Kandidát uvádí, že člověk má 12 TLR. TLR11 a TLR12 však nejsou u člověka funkční. Obrázek 3, publikace Šimová et al. British Journal of Cancer, 2011. Domnívám se, že použití „5AC + vaccine IL-2“ není uvedeno správně a že se má jednat o „5AC + vaccine IL-12“.

Formální stránka dizertace

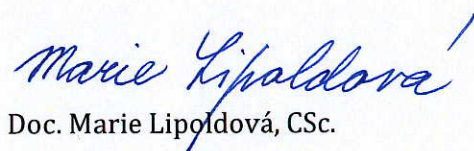
Práce je hezky a přehledně zpracovaná. Je předložena v požadované formě, doplněna autoreferátem a seznamem publikací. Jsou v ní jen drobné nedostatky. V seznamu zkratk chybí například vysvětlení ICOS, ICAM, RAG, STAT1, LMP2, LMP7, FoxP3, TAP1, TAP2, TPN, IRF, PD1 a jiných. V práci jsou uváděny názvy myších genů velkými písmeny: RAG, STAT, IFN γ , IFNR γ (str. 26). Podle standardní genetické nomenklatury je třeba uvádět názvy myších genů malými písmeny a kurzívou: *Rag*, *Stat1*, *Ifng*, *Ifngr1* (nebo *Ifngr2*). Velká písmena jsou vyhrazena pro geny lidské. U „recombination activating gene“ by navíc mělo být uvedeno, zda se jedná o *Rag1* nebo o *Rag2*; podobně by měl být odlišen *Ifngr1* a *Ifngr2*.

Otázky ke kandidátovi:

- 1) Je známo, že metylace u mladých a starých živočichů se liší (viz např. Heyn et al. PNAS, 109: 10522, 2012). Myši používané v experimentech byly staré 2-7 měsíců (Štěpánek et al. J Biol Regul Homeost Agents 2011). Pozorovali jste rozdíly v reakcích myší starých 2 a 7 měsíců? Plánujete srovnání účinku 5-azacytidinu u myší různého stáří?
- 2) Mohl byste detailněji popsat předpokládané mechanismy účinku protilátky anti CD25 na iNKT buňky?
- 3) Ve své práci popisujete ovlivnění produkce různých cytokinů a jejich receptorů látkou CpG 1826. Je však známo, schopnost produkovat cytokiny po různých stimulech je geneticky ovlivněna. Plánujete testování CpG 1826 i na jiných myších kmenech než C57BL/6, aby vámi použitá procedura mohla být v budoucnosti využitelná pro geneticky heterogenní lidskou populaci?
- 4) Vysvětlíte, co znamenají zkratky ICOS, ICAM, RAG, STAT1, LMP2, LMP7, FoxP3, TAP1, TAP2, TPN, IRF a PD1.

Závěr

Předložená dizertační splňuje požadavky PhD studia.


Doc. Marie Lipořdová, CSc.