

Posudek oponenta disertační práce

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Doktorský studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Uchazeč: Mgr. Jan Musil

Pracoviště: Oddělení imunologie, Ústav hematologie a krevní transfúze

Téma disertační práce: Modulace nádorového mikroprostředí a její vliv na imunoterapii nádorů

Školitel: RNDr. Šárka Němečková, DrSc.

Oponent: MUDr. Romana Mikyšková, Ph.D.

Doktorand se ve své práci zabývá modulací mikroprostředí nádoru, práce je provedena na myším modelu. O aktuálnosti tématu není pochyb. Výzkum mikroprostředí nádoru a možností jeho ovlivnění stále nabývá na významu, a zejména vzhledem k faktu, že mikroprostředí nádoru, jeho imunoprotektivní a imunosupresivní složky, významně ovlivňují růst nádoru. Charakter mikroprostředí nádoru může významně ovlivnit také účinnost použité léčby. Bližší poznání specifík nádorového mikroprostředí tak bude stále více ovlivňovat vývoj nových léčebných prostředků pro nádorová onemocnění u člověka.

Disertační práce má rozsah 131 stran textu včetně 1 strany abstraktu a 8 stran seznamu použitých zkratk. Použitá literatura obsahuje 58 stran. Vlastní disertační práce je provedena ve formě textové výsledkové části s příloženými 2 publikacemi souvisejícími s disertací. Formální úprava a členění textu odpovídají požadavkům kladeným na tento typ disertace. Práce má dobrou grafickou úroveň, je psána odborně a působí téměř kompaktním dojmem. Obrázky dobře zapadají do textu a jsou jednotně značeny.

V kapitole Úvod o rozsahu 62 stran autor práce seznamuje čtenáře s problematikou mikroprostředí nádorů, věnuje se extracelulární matrix, její roli v regulaci kancerogeneze, dále podrobně probírá kapitolu po kapitole jednotlivé buněčné komponenty. Literární odkazy jsou vhodně vybrány. Jejich počet více než 1000 svědčí o tom, že disertant věnoval studiu problematiky hodně času. V některých kapitolách úvodu bylo zpracování literatury možná až příliš obsáhlé, např. v části Buňky imunitního systému je téměř 5 stran textu o Th17 lymfocytech, ve vlastní disertační práci pak už o nich není ale ani zmínka, a naopak některé důležité buněčné populace jako např. myeloidní supresorické buňky jsou zmíněny pouze okrajově.

Dále si autor v kapitole Cíle práce stanovuje několik cílů, které se dají tematicky rozdělit podle 2 příložených publikací. Prvním cílem bylo zkonstruovat rVACV nesoucí ve svém genomu tumor supresorový gen IGFBP-3 a imunogen SigE7LAMP, charakterizovat expresi IGFBP-3 a dále ověřit schopnost této vakcíny indukovat protinádorovou imunitní odpověď a objasnit mechanismus účinku. Druhým cílem bylo připravit DNA vakcínu proti legumainu, v níž byla pro zvýšení imunogenosti

modifikována jeho sekvence a zjistit, zda navržené genové modifikace zvyšují imunogenost vakcíny a její schopnost inhibovat růst nádorů. Jelikož je MK16 nádor metastazující, cílem bylo také ověřit případný antimetastatický účinek. Cíle disertace byly vytyčeny jasně a srozumitelně. Vycházejí ze dvou příložených publikací.

Další částí disertační práce je kapitola Materiál a Metodiky. Tato kapitola je zpracována vyčerpávajícím způsobem, považuji ji za velký klad disertační práce. Ukazuje metodickou rozsáhlost disertační práce.

Následuje výsledková část, která je zde ve formě výsledkového textu s vloženými obrázky, ke kterému jsou přiloženy publikace. Výsledkovou část doktorand podložil 2 publikacemi. Splnil tím minimální požadavky oborové rady. Obě byly publikovány v impaktovaných časopisech (souhrnný impakt faktor 5.907), u jedné je doktorand prvním autorem. Obě jsou z roku 2014. Kromě toho je Mgr. Musil spoluautorem 1 dalšího článku, který však do disertační práce zařazen není.

Výsledky jsou rozděleny do dvou tematických částí podle publikací.

První publikace se zabývala modulací nádorového mikroprostředí využitím konstrukce rekombinantních virů vakcinie nesoucích tumor supresorový gen IGFBP-3 a imunogen SigE7Lamp. Bylo zjištěno, že nejvyšší exprese IGFBP-3 je dosaženo, pokud se gen nachází pod kontrolou časného promotoru H5. Vysoká hladina exprese IGFBP-3 korelovala s inhibicí růstu nádorů u myši imunizovaných virem P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3. Samotná exprese IGFBP-3 neměla na růst nádorů vliv. Dalším cílem bylo objasnit mechanismus pozorovaného inhibičního efektu. Bylo zjištěno, že vysoká hladina IGFBP-3 vede ke zvýšení množství fosfatidylserinu a jeho inkorporaci do virionu. Tyto viriony mohou následně efektivněji infikovat buňky v důsledku efektivnější indukce makropinocytózy. Efektivnější infekce pak umožňuje rVACV déle perzistovat v hostiteli, což je spojeno s delší stimulací imunitní odpovědi.

V druhé části se disertant zabýval ovlivněním mikroprostředí nádoru terapií cílenou na eliminaci makrofágů infiltrujících nádor. Tato imunosupresivní složka mikroprostředí nádoru neustále nabývá na významu a v posledních letech se objevuje stále více odborných článků zaměřených na výzkum TAM. Doktorand se v první části zabýval optimalizací postupu pro izolaci makrofágů pro průtokovou cytometrii a detekci legumainu v makrofágách infiltrujících nádor. Byl sestaven panel protilátek pro detekci makrofágů pomocí průtokové cytometrie a bylo zjištěno, že přibližně 48% všech makrofágů v nádorech MK16 exprimuje legumain. Nádor MK16 byl tudíž zvolen jako vhodný model pro další experimenty zaměřené na přípravu DNA vakcíny proti legumainu a testování její účinnosti. Podařilo se zkonstruovat DNA vakcínu proti legumainu a pro zvýšení efektivity byly provedeny některé genové modifikace, jako byla změna jeho aminokyselinové sekvence a inserce pomocného epitopu p30 schopného aktivovat pomocné CD4+ T-lymfocyty. Obě modifikace významně posílily imunitní odpověď proti legumainu. Dále byl sledován efekt imunizace. Přestože došlo k významné inhibici růstu nádorů, nebyla ovlivněna tvorba plicních metastáz, ani procento makrofágů.

Metodický přístup k řešení problematiky byl adekvátní. Práce je metodicky velice bohatá, mimo jiné zahrnuje celou škálu *in vitro* a *in vivo* metodik (klonování DNA, sekvenování, PCR metody, analýzy proteinů, práce s tkáňovými kulturami, práce s viry, plakové purifikace virů a titrace, imunizace a infekce myši, testování imunitní odpovědi pomocí ELISPOT, průtoková cytometrie, imunohistochemické analýzy). Velký přínos práce vidím v tom, že doktorand zavedl metody pro izolaci TAM z nádorů a detekci exprese legumainu a prokázal možnost experimentálního využití.

Dotazy oponenta

1. V experimentech na myších testujících účinnost imunizace pomocí rekombinantních vakcín byl v případě preventivní imunizace zvolen nádor MK16 a v případě terapeutické imunizace nádor TC-1. Co bylo důvodem toho, že nebyl pro obě schemata použit stejný model?
2. Jaké máte vysvětlení pro to, že v případě použití dvojíých rekombinant je účinnější rekombinanta s časným promotorem, zatímco v případě imunizace pouze jednoduchými rekombinantami se nenašel žádný rozdíl?
3. Byla infiltrace makrofágy a exprese legumainu zjišťována i v metastázách nádoru MK16 či v jiných nádorech, např. v TC-1 nádoru využitém v experimentální části zabývající se IGFBP-3 a byla případně srovnána s infiltrací a expresí u primárního MK16 nádoru?
4. Jaké vidí doktorand možnosti klinického využití poznatků získaných v experimentech zaměřených na legumain?

Závěr

Závěrem mohu konstatovat, že autor ve své disertační práci prokázal schopnost samostatné tvůrčí práce v daném oboru. Práce splňuje požadavky kladené na disertační práce v daném oboru.

Disertační práci Mgr. Jana Musila „Modulace nádorového mikroprostředí a její vliv na imunoterapii nádorů“ doporučuji postoupit k obhajobě a udělení titulu Ph.D.

V Praze 3.6. 2015


MUDr. Romana Mikyšková, Ph.D.