

Oponentský posudek na doktorskou disertační práci

Předložená disertační práce MUDr Pavla Otáhala „Imunoterapie nádorů vyvolaných viry HPV16 a SV40“, je souborem tří prací; dvě vznikly během jeho zahraničního pobytu (na Pennsylvania State University) a jedna v pracovní skupině školitelky Šárky Němečkové. V současné době byly publikovány dvě z těchto prací v renomovaných odborných časopisech a jedna je v recenzním řízení. Všechny uvedené práce se zabývají tématem zcela zásadním a aktuálním – možností imunoterapie nádorů. Na experimentálních modelech myších nádorů indukovaných onkogenními viry SV a HPV řeší otázky spojené s analýzou imunogenicity nádorových antigenů a účinností indukované imunitní odpovědi na růst nádoru.

První z prací analyzuje význam zkřížené presentace nádorových imunorecesivních antigenních epitopů pro indukci specifických CD8⁺ T lymfocytů. Imunizace syngenními nádorovými buňkami transformovanými SV 40 T antigenem (TAg) vede ke vzniku specifických CD8⁺ T lymfocytů, které eliminují injikované buňky (nedojde k tvorbě nádorů). Odpověď je především namířena proti dominantním epitopům (I, II/III a IV), epitop V je recesivní (subdominantní). Myši kmene C57Bl/6, které nemají Tap1 protein, netvoří komplexy MHC I-peptid a nejsou schopné přímé aktivace CD8⁺ T lymfocytů, zjištěná aktivace je výsledkem zkřížené presentace. Těmto myším byly přeneseny T lymfocyty s TCR specifickými proti dominantnímu epitopu I a recesivnímu epitopu V. Autoři ukázali, že účinnost zkřížené presentace a zmnožení specifických CD8⁺ T lymfocytů je v případě subdominantního epitopu V velmi nízká ve srovnání s dominantním epitopem I. Odpověď na epitop V byla zvýšená po imunizaci T Ag, ze kterého byly odstraněny dominantní epitopy. Nižší odpověď na recesivní epitopy ukazují jako výsledek neúčinné zkřížené presentace a kompetice CD8⁺ T lymfocytů specifických pro dominantní a recesivní epitopy o T Ag. Autoři diskutují možnost využití odpovědi na subdominantní epitopy jako cíle při imunoterapii nádorů, zejména za podmínky, kdy mechanismus tolerance limituje odpověď na imunodominantní epitopy.

V druhé práci byl použit myší kmen Rip1-Tag4 (RT4), který exprimuje SV40 T Ag pod kontrolou insulinového promotoru, směřuje produkci T Ag do beta buněk a indukuje tvorbu nádoru pankreatu. U těchto myší není TAg přítomný v thymu a nedochází ke vzniku centrální tolerance. Po imunizaci T Ag vznikají specifické CD8⁺ T lymfocyty proti dominantním epitopům IV (H-2K^b restrikce) a I (H-2D^b). Nalezli, že existuje určitá hierarchie (preference) u antigenních epitopů a nástup odpovědi na epitop IV tlumí vznik CD8⁺ buněk specifických pro epitop I. Významné bylo zjištění, že imunizací v časně fázi proti epitopu IV, vznikly specifické cytotoxické T lymfocyty, které dlouhodobě přetrvávaly a potlačovaly růst nádorů. Pozdější imunizace (po nástupu exprese T Ag v periférii) však neovlivnila růst nádoru, i když vznikalo dostatečné množství specifických CD8⁺ T buněk i v nádorové tkáni. Autoři vysvětlují tuto skutečnost jako vznik resistance nádorových buněk vůči působení cytotoxických buněk a probírají možnosti úniku nádorových buněk imunitnímu dozoru.

Získané výsledky diskutují i v kontextu možného využití cytotoxických buněk v imunoterapii lidských nádorů, kdy přistupují faktory jako individuální variabilita odpovědi na různé nádorové antigeny a rozdílná účinnost vznikajících specifických CD8+ buněk při potlačení nádoru.

Třetí práce vznikla na pracovišti školitelky a představuje první sdělení v časovém sledu předložených prací. Je zaměřena na testování imunitní odpovědi na E7 protein lidského papilomaviru (HPV) typu 16, který je jedním z časných virových proteinů, jehož exprese na buňkách má za následek maligní transformaci infikovaných buněk (keratinocytů). Vakcinace HPV indukuje specifickou odpověď CD8+T buněk proti časným E5-E7 antigenům. Současně dochází k tvorbě protilátek proti pozdním antigenům L1 a L2 (tvoří kapsidu viru a asociují do neinfekčního virionu), které mohou mít schopnost neutralizovat virus a tak nepřímo potlačovat růst nádorů. Hlavním cílem práce bylo zjistit, zda buněčná lokalizace E7 proteinu ovlivňuje charakter imunitní odpovědi. Pro směřování na povrch buněk byl E7 protein vložen do genu A56R viru vakcinie, který koduje virový hemagglutinin a vnesení do viru VV-SigE7Lamp směřovalo tento protein do lysozomů. Povrchová přítomnost E7 indukovala především Th2 imunitní odpověď, která nevedla k inhibici růstu E7-transformovaných nádorových buněk. Přítomnost v lysozomech nebo v cytoplasmě vyvolala naopak převahu Th1 odpovědi spojené s rozvojem protinádorové imunity. Nalezená polarizace imunitní odpovědi je diskutována jako kritický parametr pro nástup obrany proti virům a vytvoření obrany proti nádorům, vznik a přetrvání protinádorové imunity.

Uvedené práce prošly většinou velmi přísným recenzním řízením, proto mám jen několik obecných dotazů :

Byl vztah lokalizace virového proteinu a Th1/ Th2 polarizace imunitní odpovědi prokázán i u jiných antigenů asociovaných s nádory (od r. 2002)?

Jaký vidíte klinický význam pozorování hierarchie epitopů nádorových antigenů vzhledem k heterogenitě populace a různé individuální odpovědi?

Lze opravdu s jistotou tvrdit, že vakcinací pacientů lze indukovat nádorově specifické T lymfocyty, nebo to lze předpokládat u nádorů indukovaných viry (autoreferát závěr publikace v recenzním řízení)?

Uvažujete o možném využití ve vašem modelovém systému, případně obecněji, přístupů zvyšujících tvorbu CD8 + buněk do protinádorové terapie (v optimálním období účinku)?

A jeden dotaz ne zcela odborný. Vzhledem k tomu, že obě poslední publikace vznikly za pobytu ve Spojených státech, nabízí se otázka týkající se budoucnosti autora. Zda budete pokračovat ve své vědecké práci v zahraničí, nebo přenesete své působiště zpět na své původní domácí pracoviště?

Disertační práce je sepsána jasně a přehledně s minimem překlepů. Logicky členěný úvod práce je následován výsledky, kde každá z publikací je uvedena obecnějším seznámením s danou problematikou a přehledem dosažených výsledků. Souhrnná diskuse, vedle shrnutí výsledků, obsahuje pohled autora na budoucí směr vývoje nádorové terapie. Publikační aktivita zahrnuje ještě další práce, které by v případě zpožděného publikování třetí práce, mohly doplnit počet požadovaných publikací. Z uvedených prací je zřejmé, že autor zvládl v posledních letech řadu moderních metodických přístupů, které využil pro získání řady významných původních výsledků. Velmi oceňuji, že Pavel Otáhal je prvním autorem u dvou z publikací a tato skutečnost jistě odráží jeho podíl na volbě strategie, provedení pokusů, sepsání výsledků a jejich velmi zasvěcenou diskusi v kontextu se současnými znalostmi.

Pokud bych měla něco vytknout, je to používání výrazů jako je krosprezentace, self-antigen, priming a další, místo kterých česká odborná literatura i v základních učebnicích již užívá odpovídajících českých pojmů a s tím spojených i některých jazykových nepřesností CD4+ epitop apod. Rovněž bych ocenila podrobnější a přesnější informace o široké oblasti nových poznatků o

Treg buňkách a dendritických buňkách a jejich roli v periferní toleranci. Uvedené připomínky jsou více méně formální a neubírají práci na její vysoké odborné kvalitě.

Závěrem lze konstatovat, že předložená práce je velmi kvalitní a splňuje veškeré požadavky kladené na disertační práci. Představuje velmi kvalitní klinický výzkum, který na výtečně zvolených experimentálních modelech přináší řadu nových poznatků v oblasti základního výzkumu. Práci vysoce hodnotím a doporučuji k přijetí do oponentního řízení pro získání vědecké hodnosti PhD.

V Praze dne 2.5.2006

Doc. RNDr. Ludmila Tučková, DrSc.
Sektor imunologie a gnotobiologie
Mikrobiologický ústav AV ČR, Praha