



**Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany  
Ústav molekulární patologie**

Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové  
Tel.: 973 253 220, Fax: 495 513 018

---

**Oponentský posudek disertační práce Mgr. Marty Švédové  
(Kosové)**

Název práce:

**Mechanism of action of adenylate cyclase toxin on immune function of dendritic cells**

V předložené disertační práci se Mgr. Martina Švédová zaměřuje na modulaci funkce dendritických buněk po jejich interakci buď s adenylátcyklázovým toxinem mikroba *Bordetella pertussis* nebo z něj odvozeným enzymaticky inaktivním toxoidem. V prvním případě výsledky směřují k objasnění molekulárních mechanismů vedoucích k oslabení obranné imunitní reakce v průběhu infekce *Bordetellou*, v druhém případě pak byl sledován pozitivní účinek toxoidu na dendritické buňky související s jeho adjuvantními vlastnostmi. Další část disertační práce je věnována vztahu mezi strukturou adenylátcyklázového toxinu a jeho schopností ovlivnit imunomodulační potenciál dendritických buněk a celkově *in vivo* virulenci mikroba *Bordetella pertussis*.

Disertační práce má 232 stran je členěna na literární úvod, cíle dizertace, metodiku, výsledky, diskusi a závěrečné shrnutí nejdůležitějších výsledků. Dosažené výsledky jsou v disertační práci prezentovány ve formě krátkého přehledu, jenž je následován příslušnou publikací. Práce neobsahuje žádné přílohy. V literárním přehledu je nejprve obecně charakterizována přirozená a adaptivní imunitní odpověď v dýchacích cestách a také mechanismy vyžrávání a aktivace dendritických buněk. V další části úvodu je podán stručný seznam toxinů tvořících póry v membráně buněk, jenž je následován popisem signálních cest aktivovaných v napadených buňkách. Na závěr této části je podána informace o využití toxinů v imunoterapii, a to včetně konkrétních příkladů. V poslední části úvodu disertační práce je zmíněna patogeneze infekce *Bordetellou pertusis* a jsou vyjmenovány nejdůležitější faktory virulence tohoto mikroba. Nejrozsáhlejší pasáž úvodu je pochopitelně věnována struktuře a funkci adenylátcyklázového toxinu a z něj odvozeného toxoidu. Literární úvod je napsán srozumitelně, v odpovídajícím rozsahu a velmi dobře uvádí oblasti, na které je zaměřena vlastní experimentální část disertační práce.

Na úvodní kapitole pak navazuje část obsahující stanovené cíle, jejichž naplnění je vyjádřeno v pěti publikacích uvedených ve výsledkové části. Z hlediska zapojení studentky je nejvýznamnější první uvedená publikace, ve které byl studován molekulární mechanismus odpovědný za adjuvantní schopnosti enzymaticky neaktivního toxoidu. Studentka prokázala stimulaci maturace nezralých dendritických buněk po působení toxoidu, která byla spojena s expresí maturačních znaků na povrchu buněk a sekrecí některých cytokinů. Významným zjištěním bylo potvrzení indukce CD<sup>4+</sup> a CD<sup>8+</sup> T lymfocytární odpovědi takto vyváženými dendritickými buňkami, a to *in vitro* i *in vivo*. Maturace dendritických buněk a následná indukce T lymfocytů byla pak závislá na schopnosti toxoidu tvořit póry v buněčné membráně dendritických buněk. Vznik pórů v membráně vedl k vyplavení draselných iontů a následné aktivaci MAP kináz p38 a JNK. Celkově získané výsledky potvrzují předpoklad adjuvantních schopností toxoidu, které jsou spojeny s maturací a také migrací dendritických buněk, a zároveň podporují využití tohoto toxoidu pro transport různého typu vakcín.

Další výsledky uvedené v disertaci vyplývají z publikací, ve kterých studentka vystupuje jako spoluautorka. Tyto publikace jednak přinášejí další podstatné informace o využití AC toxoidu jako nosiče imunogenních peptidů, jednak prohlubují dosavadní znalosti o úloze adenylátcyklázového toxinu v patogenezi infekce *Bordetellou pertussis*.

Je tedy možné říci, že mgr. Martina Švédová jednoznačně prokázala jak praktické dovednosti, tak i intelektuální schopnosti v provádění a řešení obtížných úkolů souvisejících se studiem molekulárních mechanismů interakcí hostitel-patogen, jež patří mezi nejobtížnější aspekty biologického výzkumu.

### **K disertační práci mám následující dotazy:**

1. Jedním z podstatných výsledků této disertační práce je zjištění závislosti adjuvantních vlastností toxoidu na jeho hemolytické, pórotvorné aktivitě. V publikaci č. 5 je popsána příprava nového netoxického toxoidu bez hemolytické aktivity. V diskusi je zmíněno, že příprava tohoto toxoidu byla patentována a tento toxoid bude využit pro testování nové aP vakcíny. Neobává se autorka, že odstranění pórotvorné domény sníží adjuvantní účinek toxoidu?
2. V případě studia adjuvantních vlastností toxoidu byla zjištěna zvýšená produkce prostaglandinu E<sub>2</sub> dendritickými buňkami. Z literatury je známo, že PGE<sub>2</sub> může negativně ovlivňovat diferenciaci dendritických buněk, produkci prozánětlivých cytokinů dendritickými buňkami, povrchovou expresi MHCII antigenů a v konečném důsledku i aktivaci Th1 imunitní odpovědi. V publikaci č. 1 autorka ukazuje, že

přidání toxoidu k dendritickým buňkám nevedlo k signifikantnímu navýšení produkce prozánětlivých cytokinů TNF alfa, IL-12 a IL-1 beta dendritickými buňkami a podobně po intravenózní aplikaci toxoidu nebyla pozorována indukce exprese MHC II antigenů na povrchu dendritických buněk. Jaký je názor autorky na možnou roli PGE<sub>2</sub> v těchto dějích?

**Závěr:** Autorka prezentuje v předložené disertační práci originální výsledky z oblasti imunologie a infekční biologie, které jsou významné jak pro indukci obranné imunitní odpovědi hostitele, tak i pro virulenci patogenu *Bordetella pertussis*. Navíc získaná data mají i bezprostřední aplikační využití při konstrukci nového typu vakcín. Kvalita výsledků je doložena publikacemi autorky v renomovaných časopisech s impakt faktorem. Celkově lze tedy konstatovat, že Mgr. Martina Švédová splnila požadavky podle odstavce 4, paragrafu 47 Zákona o vysokých školách. Tudíž doporučuji přijetí její práce k obhajobě a po úspěšném obhájení souhlasím s udělením titulu PhD.

V Hradci Králové 9.5. 2017

Prof MUDr. Jiří Stulík, CSc.  
Fakulta vojenského zdravotnictví  
Univerzita obrany Hradec Králové