

**Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Ingrid Polákové „Gene Immunotherapy of Cancer: DNA Vaccines against HPV 16“**

Tématem anglicky psané práce je problematika DNA protinádorových vakcín, studovaná na myším modelu pro HPV16 asociované nádory. Výsledky byly publikovány ve čtyřech pracích, z nichž u jedné je Ingrid Poláková prvním autorem. Proto byla zvolena „rychlá“ forma disertační práce, kdy byly čtyři publikace doplněny kvalitním úvodem a diskusí. Práce je do určité míry metodická, nicméně byly získány i některé obecné poznatky o mechanismech vzniku specifické protinádorové imunitní odpovědi.

V rámci disertační práce byly připraveny různé DNA vakcíny proti HPV16 E6 a E7 onkoproteinům, u nichž byla jejich imunogennost zvýšena konjugací s modifikovanými fragmenty  $\beta$ -glucuronidázy či signální sekvencí z E3 proteinu z adenoviru. Dále byly provedeny úpravy sekvencí tak, aby došlo ke zvýšení bezpečnosti vakcín a zůstala zachována jejich imunogennost. Velmi zajímavý je výsledek, že retence fuzního proteinu E7GGG se signální sekvencí z E3 proteinu z adenoviru v endoplazmatickém retikulu vede k zvýšené prezentaci antigenu a indukci imunitní odpovědi. Tento jev by si zasloužil hlubší analýzu mechanismů. Z metodického hlediska je zajímavé srovnání imunizace pomocí „Gene gun“ s tetováním. Zde byl získán prioritní výsledek, že tetování lze úspěšně použít k imunizaci peptidy. Práce byla doplněna analýzou nádorové sublinie, která unikla imunitní odpovědi pomocí mutace v imunodominantním epitopu. Při řešení práce Ingrid Poláková zvládla a uplatnila metodiky z oblasti molekulární biologie při přípravě DNA vakcín, tak metody imunizace a hlavně monitoringu imunitní odpovědi (ELISPOT, tetramerové eseje atd.).

**Připomínky k jednotlivým částem práce**

*Teoretická část.*

Úvod poskytuje základní literární přehled o biologii lidských papilomavirů, protinádorových vakcínách a dále se zaměřuje na problematiku genové imunoterapie a DNA vakcín. Zahrnuje poměrně široký okruh témat a mohl být více specificky zaměřen na vlastní téma disertace.

*Jednotlivé publikace*

Součástí práce jsou kopie publikací, jejichž souhrnné relevantní výsledky k disertační práci jsou dále diskutovány v sekci Diskuse. Jasně je uvedeno, jaký podíl měla Ingrid Poláková na jednotlivých studiích.

*Diskuse.*

V diskusi jsou vyhodnoceny experimenty a srovnány s literárními údaji. Důležité je, že jednotlivé publikace byly diskutovány jako jeden celek a kvalitní odkazy na relevantní výsledky v jednotlivých pracích přispěly k její logičnosti.

*Poznámky k formální stránce práce.*

Práce je napsána jasně, přehledně, bez formálních chyb a překlepů. Jedinou připomínku mám ke zkratce pro aminokyseliny „Aa“ místo „aa“ nebo „AA“ a místo zkratky „MSC“ je doporučeno používat „MDSC“ (myeloid-derived suppressor cells). V úvodu v kapitole molekulárních mechanismech úniku nádorové odpovědi by asi měly být citovány práce Garrida a spol.



## Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i.

### Dotazy k diskusi

- Práce je do značné míry metodická, proto je velmi důležitý aspekt možnosti translace výsledků preklinických experimentů na myším modelu na použití u lidí. Je pravděpodobné, že by metody DNA nebo peptidové imunizace tetováním mohly být s úspěchem využity v protinádorové imunoterapii?
- Jako jedna z hlavních metod monitoringu imunitní odpovědi byla metoda ELISPOT, kde může být problém určení specifity reakce. Byly dělány kontroly s restimulací kontrolními peptidy nesoucími jiné CTL epitopy než proti E6/E7 onkoproteinům?
- Velmi zajímavý je výsledek, že retence fuzního proteinu E7GGG se signální sekvencí z E3 proteinu z adenovíru v endoplazmatickém retikulu vede k účinné presentaci antigenu a indukcí imunitní odpovědi. Je možné, že dochází ke štěpení proteinu přímo v endoplazmatickém retikulu a jaké jsou současné představy o roli proteáz mimo proteazom v úpravě a presentaci antigenu?
- V práci je zmíněno, že přestože metodami počítačové analýzy nebyl rozdíl mezi E6<sub>48-57</sub> sekvencí EYDFAFRDL a její mutací V49L z hlediska jejich vazby na H-2K<sup>b</sup> molekuly, peptid nesoucí mutovanou sekvenci byl méně imunogenní. Jaká je v současnosti spolehlivost predikce vlastností CTL epitopů „*in silico*“?

### Závěr

Mgr. Ingrid Poláková potvrdila, že je schopna samostatně vědecky pracovat, zvládla množství náročných molekulárně-biologických i imunologických metod a získala nové vědecké poznatky, které byly publikovány ve člancích v mezinárodních časopisech s IF, z nichž u jednoho je Mgr. Poláková prvním autorem. Proto doporučuji, aby práce byla přijata jako podklad pro udělení titulu PhD.

V Praze dne 15.11.2010

RNDr. Milan Reiniš, CSc.