

Oponentský posudek na dizertační práci Veroniky Hruškové „ Construction of various types of vaccines based on the structural proteins of mouse polyomavirus and analysis of immune response after their administration to mice“.

V předložené práci autorka navazuje na projekt výzkumu možností využití rekombinantních kapsidových proteinů některých virů, které si zachovávají schopnost samovolně vytvářet virové pseudočástice, k prezentaci antigenů imunitnímu systému je jedním ze špičkových oborů genového inženýrství, přinášejícím nové možnosti pro konstrukci vakcín.

Dizertační práce Veroniky Hruškové studiem tohoto systému z hlediska jeho konstrukce a molekulárně biologických vlastností, a zejména z hlediska jeho působení na imunitní systém.

Schopnost rekombinantních kapsidových proteinů některých virů samovolně vytvářet virové pseudočástice nabízí řadu možností praktického využití, např. v genové terapii nebo při konstrukci rekombinantních vakcín. Předložená práce je součástí projektu, který se zabývá výzkumem pseudočástic vytvořených kapsidovými proteiny myšího polyomaviru zaměřeným na jejich využití pro konstrukci rekombinantních vakcín. V první části práce se autorka věnovala studiu molekulárně biologických a imunogenních vlastností modelového systému, založeného na pseudočásticích, složených z rekombinantních proteinů s připojeným fragmentem zeleného fluorescenčního proteinu EGFP. Metodiku, prověřenou na tomto modelovém systému, následně využila pro konstrukci a studium imunogenicity experimentální vakcíny, založené na rekombinantních pseudočásticích, nesoucích epitop, odvozený z onkoproteinu bcr-abl, majícího klíčový význam při vzniku chronické myeloidní leukémie.

Jedná se o vysoce aktuální problematiku, která odpovídá současným špičkovým trendům výzkumu v oblasti genového inženýrství a experimentální onkologie. Přestože se imunogenitu experimentální vakcíny, složené z chimérických pseudočástic s inzertem onkoproteinu bcr-abl, autorce nepodařilo prokázat, práce přinesla řadu hodnotných vědeckých výsledků, např. poznatků o interakci polyomavirových pseudočástic s imunitním systémem hostitelského organismu a způsobu prezentace vneseného antigenu dendritickými buňkami. Autorka potvrdila, že epitop, představovaný fúzní částí onkogenu bcr-abl není vhodný antigenem pro experimentální vakcínu proti chronické myeloidní leukemii, a ve své práci zavedla a prověřila řadu metod, které bude možno v budoucnosti využít pro konstrukci a testování účinnosti obdobných vakcín.

Práce je kvalitní a vyvážená i po formální stránce. Obsahuje dostatečně informativní literární přehled, který dokladuje dobrou obeznámenost autorky s řešenou problematikou, přehledně podaný pracovní záměr, velmi bohatou metodickou část, srozumitelně a správně interpretované výsledky, závěry i kvalitní diskusi. Přesto mám několik kritických připomínek:

1) V literárním úvodu (kap. 2.2.4) je jedna nepřesnost – inhibitory tyrosin-kinázové aktivity bcr-abl jsou nyní u pacientů s CML podávány jako léky první volby, nikoliv pouze jako alternativa pro pacienty, nevhodné k transplantaci.

2) V kapitole Materiál a metody jsou opomenuty některé metodiky, použité v první části práce, týkající se studia modelového systému chimérických pseudočástic, nesoucích EGFP: konkrétně metodika průkazu produkce cytokinů a cytotoxický test na bázi uvolnění radioaktivního Cr, přestože výsledky těchto testů jsou uvedeny v kapitole Výsledky. V případě značení specifických T-lymfocytů pomocí pentamerů se nejedná o test cytotoxicity (tj. o funkční test), vhodnější by bylo stanovení počtu specifických cytotoxických lymfocytů. Není mi jasný pojem „single-cell suspension“.

3) Některé výsledky, týkající se studia imunogenity chimérických pseudočástic nesoucích EGFP jsou pouze zmíněny v textu, a nejsou v práci dostatečně zdokumentovány grafem,

obrázkem nebo diagramem z fluorescenčního cytometru (produkce cytokínů po stimulaci splenocytů in vitro, Cr⁵¹-release test, porovnání odpovědi myši, imunizovaných chimérickými pseudočásticemi s odpovědí kontrol, imunizovaných „prázdnými“ pseudočásticemi.)

4) Podle autorčinných výsledků peptid bcr-abl použitý k pulzování dendritických buněk, tyto buňky neaktivoval. Jak bylo docíleno a kontrolováno, že dendritické buňky pulzované peptidem bcr-abl skutečně prezentovaly tento peptid T-lymfocytům při stimulaci in vitro v testech na buněčnou imunitu?

Otázky do diskuse:

- 1) Vysvětlete, jaký vliv mají na buněčnou imunitní odpověď Fox3+ Treg lymfocyty.
- 2) Existují kromě polyomavirů další druhy virů, které lze použít pro tvorbu chimérických pseudočástic a jaké mají proti stávající skupině výhody či nevýhody?

Závěr: V předložené práci autorka prokázala velmi dobré znalosti řešené problematiky, schopnost správně interpretovat získané výsledky v kontextu s dosavadními poznatky a údaji publikovanými v literatuře i schopnost samostatné systematické vědecké práce. Kvalitu získaných výsledků dokumentují dvě publikace v recenzovaných zahraničních časopisech, z nichž v jedné je Veronika Hrušková prvním autorem. Proto doporučuji její přijetí jako práce disertační.

Posudek vypracovala: RNDr K.Roubalová CSc.

10. září 2010