

V Praze dne 12.9.2010

Oponentský posudek na disertační práci V. 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“

Tématem anglicky psané práce je aktuální problematika protinádorových vakcín založených na virům podobných částicích (VLP), odvozených z myšího polyomaviru. Jako modelový nádorový antigen byl zvolen fuzní protein Bcr-Abl. V rámci studie byly použity různé způsoby imunizace myši (imunizace přímo VLP nebo dendritickými buňkami s VLP navázanými na povrchu) a pro srovnání také připraveny DNA vakcíny produkující stejný epitop Bcr-Abl.

Hlavním výsledkem práce byla příprava virům podobných částic (VLP) odvozených z myšího polyomaviru s vloženými částmi proteinů a jejich důkladná charakterizace, jak z hlediska jejich morfologie, tak hlavně ve schopnosti indukovat specifickou imunitní odpověď proti virovým proteinům VP1 i proti vneseným proteinům, kterými byly zelený fluorescenční protein (EGFP) nebo 171 AA sekvence lidského fuzního proteinu Bcr-Abl.

Bylo prokázáno, že MPyV VLP jsou imunogenní, byla indukována silná odpověď proti virovým VP proteinům a také byl také prokázán vliv VLP na maturaci dendritických buněk. Bohužel ale VLP neindukovaly imunitní odpověď proti vloženým proteinům, modelovému EGFP nebo Bcr-Abl. V daném modelu tedy VLP nepůsobily jako adjuvans, které by byly účinné pro imunizaci proti slabším antigenům.

Pro výsledky presentované v této práci jsou také důležité závěry plynoucí z paralelně vypracované disertační práce V. Lučanského (v diskusi citované), který na modelu imunizace DNA vakcínami prokázal, že k indukci protektivní imunity dochází pouze za použití plazmidů kódujících celý protein nebo při použití kombinace DNA vakcín kódující různé fragmenty fuzního proteinu. V práci V. Hruškové bohužel nebyly použity konstrukty s vneseným celým fuzním proteinem. Proto není možno určit, jestli hlavní příčinou absence cytotoxické i protilátkové odpovědi byl problém presentace antigenu VLP nebo fakt, že pro imunizaci nebyl použit celý fuzní protein. Vzhledem k tomu, že však nebyla indukována ani imunita proti modelovému EGFP, je možno spekulovat o problému nedostatku účinného zpracování či presentace vnesených antigenů v daném systému. Tyto výsledky ilustrují složitost vývoje protinádorových vakcín proti méně imunogenním nádorovým antigenům a ukazují na náročnost přípravy účinných protinádorových vakcín a také na důležitost dalšího základního výzkumu v oboru. Výsledky byly publikovány ve dvou pracích, z nich u jedné je V. Hrušková prvním autorem.

Připomínky k jednotlivým částem práce

Teoretická část.

Teoretický úvod je velmi dobře napsán a úzce směřován k tématu práce, polyomaviru a VLP a dále chronické myeloidní leukémie, pro kterou je charakteristická translokace mezi chromozómy 9 a 22 a následná exprese fuzního proteinu Bcr-Abl. Vzhledem k využití VLP mohl být také podrobněji zmíněn mechanismus vstupu polyomaviru a od něj odvozených VLP do buňky (receptor, pH závislost atd.), i když informace jsou pak částečně v diskusi.

Experimentální část (metody a výsledky).

Metody i výsledky jsou dobře a podrobně popsány. V textu je opakovaně zmiňováno použití Bcr-Abl specifických pentamerů pro detekci procenta specifických CD8⁺ buněk jako cytotoxický test. Při tomto testu není testována narozdíl od dalších testů cytotoxicita, pouze procento buněk rozpoznávající daný epitop, proto je označení tohoto testu jako cytotoxického zavádějící. K větší přehlednosti textu o přípravě plazmidů by přispěla presentace jejich map.

Diskuse.

V diskusi jsou vyhodnoceny experimenty a srovnány s literárními údaji včetně výsledků práce V. Lučanského, se kterou se tato práce doplňuje. Důležité je srovnání výsledků získaných s VLP odvozených z MPyV s VLP odvozených z jiných virů. Diskutována nebyla otázka, jaké výhody či nevýhody by mělo přinést použití MPyV VLP oproti VLP odvozených z jiných virů.

Poznámky k formální stránce práce.

Práce je napsána jasně, přehledně, součástí jsou kvalitními obrázky a tabulky ilustrující teoretickou část a dokumentující výsledky. Práce je psaná anglicky, přičemž některé části (metody, výsledky; např. str.13-14, 19) by si ještě zasloužily jazykovou korekturu, zatímco např. diskuse je psána velmi dobrým jazykem. Rozdělení a délka jednotlivých kapitol jsou přiměřené. Na několika místech v práci jsou před obrázky prázdné části stránek, přičemž text plynule pokračuje. Vložení obrázků do textu měla být věnována větší pozornost při závěrečné úpravě textu.

Dotazy k diskusi

- Jaké jsou potenciální výhody a nevýhody vámi zvoleného modelu VLP odvozených z myšího polyomaviru pro přípravu vakcín?
- Většina lidí má protilátky proti polyomavirům, z vaší práce vyplývá, že po aplikaci MPyV VLP dochází ke vzniku specifické imunitní odpovědi, ale nikoliv ke vzniku neutralizačních protilátek. Je toto překážkou pro využití VLP u lidí a/ jako vakcín b/ pro transfer DNA a genovou léčbu?
- V diskusi je zmíněno, že pro imunogenicitu je Bcr-Abl může být důležité zachování aktivní kinázové domény proteinu. Pokud by se tento předpoklad prokázal, dá se předpokládat, že v této studii zvolená strategie přípravy vakcíny na bázi VLP by stále byla atraktivní, i když nebyla indukována imunitní odpověď ani proti EGFP?
- Mohla hrát roli v absenci cytotoxické odpovědi proti Bcr-Abl imunodominance virových epitopů z VP proteinů?

Závěr

Mgr. V. Hrušková potvrdila, že je schopna samostatně vědecky pracovat, zvládla množství náročných molekulárně-biologických i imunologických metod a získala nové vědecké poznatky, které byly publikovány v mezinárodních časopisech s IF. I když se bohužel nepodařilo splnit jeden z hlavních cílů práce, získat funkční experimentální protinádorovou vakcínu založenou na VLP odvozených z myšího polyomaviru, byly získány důležité metodické poznatky, které mají velký význam pro další studie. Proto doporučuji, aby práce byla přijata jako podklad pro udělení titulu PhD.

V Praze dne 12.9.2010



RNDr. Milan Reiniš, CSc.