

Posudek oponenta dizertační práce

1. lékařská fakulta

Studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Uchazeč: RNDr. Katarína Babiarová

Pracoviště: Laboratoř rekombinantních vakcín, Oddělení experimentální virologie, ÚHKT

Téma dizertační práce: Rekombinantní vakcíny proti solidním a hematologickým nádorům: vývoj a stanovení jejich účinnosti

Školitel: RNDr. Šárka Němečková, DrSc.

Oponent: MUDr. Romana Mikyšková, Ph.D.

Doktorandka se ve své práci zabývá vývojem rekombinantních vakcín proti solidním a hematologickým nádorům a zejména testováním jejich účinnosti. Práce je provedena na myším modelu. O aktuálnosti tématu není pochyb. Vývoj rekombinantních vakcín představuje jeden z významných směrů současné onkologie. Snahy o vytvoření efektivní vakcíny však dosud zpravidla skončily neúspěchem. Výjimkou je prevence nádorů asociovaných s viry. V poslední době nicméně došlo v nádorové imunoterapii k významným pokrokům a rozvoj technik identifikace nádorových antigenů v kombinaci s novými náhledy na imunologické zákonitosti otevírá cestu pro zavedení efektivních terapeutických metod do praxe.

Dizertační práce má rozsah 112 stran textu včetně 1 strany obsahu, 1 strany poděkování, 5 stran seznamu použitých zkratk, 31 stran použité literatury zahrnující 377 záznamů. Součástí dizertační práce jsou 4 publikace související s dizertací, které nahrazují výsledkový test. Vždy jsou doprovázeny stručným popisem. Formální úprava a členění textu odpovídají požadavkům kladeným na tento typ dizertace. Kladně hodnotím, že dizertační práce je napsána dobrým vědeckým jazykem s minimálním počtem překlepů, velice srozumitelně a přehledně.

Autorka si stanovuje několik cílů své práce, které objasňuje v kapitole Úvod a Cíle práce. Prvním cílem byl vývoj a stanovení účinnosti genetických a peptidových vakcín proti WT1 pozitivním hematologickým a solidním nádorům. Dalším úkolem bylo studium proteinu BCR-ABL jako vhodného imunogenu pro navození protinádorové imunity. Posledním cílem bylo připravit a vakcíny namířené proti HPV16-E7 pozitivním nádorům a zvýšit jejich imunogenost ko-expressí různých imunomodulátorů.

Cíle dizertace mají potenciál praktického využití v onkologii a byly vytýčeny jasně a srozumitelně.

V úvodní kapitole o rozsahu 42 stran autorka práce seznamuje čtenáře s problematikou nádorové buňky, nádorových antigenů a jejich možnosti využití při imunoterapii pomocí protinádorových vakcín. Autorka se podrobně věnuje antigenu WT1, fúznímu onkoproteinu BCR-ABL charakterizujícímu chronickou myeloidní leukémií a virovým onkoproteinům E6 a E7 asociovaným s lidským papillomavirem HPV16. V závěrečné kapitole se věnuje hodnocení imunitní odpovědi po léčbě protinádorovými vakcínami, zmiňuje a popisuje vhodné metody. Jednotlivé kapitoly tvoří přehledné celky, které stručně a vyčerpávajícím způsobem informují o zvolené problematice. Literární odkazy jsou vhodně vybrány. Jejich počet 377 svědčí o tom, že dizertantka věnovala studiu problematiky hodně času.

Následuje výsledková část, která je zde ve formě vložených publikací, z nichž u každé je stručný komentář.

Všechny publikace jsou v impaktovaných časopisech a prošly tedy přísným recenzentním řízením.

Výsledky jsou rozděleny do tří částí podle jednotlivých publikací. V první části se dizertantka soustředila na vývoj a stanovení účinnosti genetických a peptidových vakcín proti WT1+ nádorům. Nejefektivnějším se ukázalo intradermální (i.d.) podávání peptidových vakcín tetováním, podávané společně s nemetylovanými CpG motivy a protilátkou neutralizující TGF β v nádoru. Jiné ovlivnění, jako odstranění Treg, deregulace exprese pomocí 5-azacytidinu nebo zvýšení molekul MHC I. třídy pomocí poly I:C protinádorový efekt imunizace proti WT1 nevyšlo. Zjištění, že neutralizace TGF β je pro účinnost vakcín stěžejní je důležité zejména proto, že ukazuje, jak důležitý pro osud imunoterapie nádoru může být cytokinový profil nádorů.

V druhé části dizertantka sledovala protinádorovou imunitní odpověď na vakcíny nesoucí sekvenci ze spojové oblasti fúzního proteinu BCR-ABL, charakteristického pro chronickou myeloidní leukemii. V rámci těchto experimentů bylo vytvořeno několik typů vakcín. Ukázalo se ale, že protein BCR-ABL není vhodný imunogen, jelikož žádné vakcíny nebyly účinné. Přestože jde o negativní výsledek, považuji ho za důležitý z hlediska studia chronické myeloidní leukémie a možnosti její terapie.

V poslední části byly zkonstruovány rVACV vakcíny s expresí SigE7LAMP, a jejich účinnost se podařilo zvýšit ko-expressí TGF β R11 či Flt3L.

Zajímavé bylo zjištění, že ko-exprese Flt3L snižovala expanzi MDSC, velmi významné imunosupresivní buněčné populace a dále, že zvyšovala množství DC a měla pozitivní vliv na indukci funkční HPV16-E7-specifické protinádorové imunity. Za velmi přínosné považují také zjištění, že opět, jako v experimentech s WT-1 antigenem, neutralizace imunosupresivního vlivu TGFβ v nádorovém mikroprostředí vedla ke zvýšení protinádorové imunity u TC-1 nádorů.

Uvedené výsledky a zejména metody zavedené v rámci této dizertační práce pro testování účinnosti vakcín mají význam nejen experimentální, ale mohou být základem pro klinické analýzy u pacientů v rámci studií využívajících imunoterapeutické přístupy. Stanovení buněčné imunitní odpovědi u pacientů pomocí testů ELISPOT, pomocí průtokové cytometrie s použitím multimerů a pomocí intracelulárního barvení cytokinů pro detekci odpovědi T lymfocytů se již nyní stává nedílnou součástí analýz a stále se pracuje na jejich zdokonalování.

Výsledkovou část doktorandka podložila 4 publikacemi. Všechny byly publikovány v impaktovaných časopisech, u jedné, té nejnovější z roku 2012, je doktorandka první autorkou.

Metodický přístup k řešení problematiky byl adekvátní. Použité metody zahrnovaly celou škálu *in vitro* a *in vivo* laboratorních metod. Jako hlavní přínos práce vidím v tom, že doktorandka zavedla testování buněčné imunitní odpovědi pomocí ELISPOT-IFNγ testu a prokázala možnosti jeho využití v hodnocení imunitní odpovědi protinádorových vakcín.


Dotazy oponenta:

1. Může doktorandka širěji objasnit, jaké důvody a výsledky vedly k tomu, že si vybrala fúzní protein BCR-ABL jako vhodný imunogen pro indukci protinádorové imunity?
2. V dizertační práci je uvedeno, že nádorová linie TRAMP-C2 produkuje v hojné míře TGFβ (str. 70). Může doktorandka uvést jaké množství TGFβ tato linie produkuje (zda to stanovovala a jakou metodou) a srovnat produkci s další nádorovou linií TC-1, u které je také uvedeno, že TGFβ taktéž produkuje?
3. Doktorandka v diskusi uvádí, že v některých experimentech při sledování imunologického účinku vakcín namířených proti HPV16-E7 sledovala také imunosupresivní faktory, které mohly negativně ovlivňovat efektivitu připravených protinádorových vakcín. Které další faktory kromě Treg buněk doktorandka sledovala, případně, které by navrhla jako vhodné pro sledování?

Závěr

Studentka ve své práci prokázala tvůrčí schopnosti a splnila požadavky standardně kladené na dizertační práci. Dizertační práce prokazuje předpoklady autora k samostatné tvořivé vědecké práci. Dizertační práci RNDr. Kataríny Babiarové „Rekombinantní vakcíny proti solidním a hematologickým nádorům: vývoj a stanovení účinnosti“ doporučuji postoupit k obhajobě a udělení titulu Ph.D.

V Praze 30. 8. 2013


MUDr. Romana Mikyšková, Ph.D