
V Praze dne 2. 6. 2014

Oponentský posudek na disertační práci MUDr. Pavla Gabriela „Studie vlivu imunologických adjuvans na experimentální léčbu nádorů indukovaných HPV pomocí rekombinantních VACV a DNA vakcín“

Práce je věnována problematice experimentální imunoterapie modelových myších nádorů asociovaných s infekcí virem HPV16 pomocí rekombinantních virů vakcinie (VACV) a navazuje na předešlé práce laboratoře. Je rozdělena na dvě navzájem související části. V první jsou přinášeny nové poznatky o roli virového CC-chemokinového inhibitoru (vCCI) v patogenicitě a imunogenicitě rekombinantních virových vakcín, ve druhé jsou popisovány adjuvantní účinky rekombinantního viru VACV exprimující GM-CSF (kmen MVA-GM-CSF) v imunoterapii MHC-deficientních nádorů TC-1/A9, v kombinaci s DNA imunizací. Tyto dvě části jsou doplněny metodickou prací popisující přípravu linie modelových nádorových buněk exprimující nádorový antigen WT-1. Zařazení této části, která přináší spíše předběžné výsledky, kvalitu práce příliš nezvyšuje a podle mého názoru mohla být vynechána.

Cíle práce jsou formulovány v úvodu. Relevantní a velmi kvalitní literární přehled je obsáhlý a přináší velmi podrobný přehled o biologii viru VACV, mechanismů atenuace virových kmenů, užití různých kmenů VACV pro protinádorovou imunoterapii, chemokinech a na závěr informace o nádorovém antigenu WT1. Nutno říci, že MUDr. Gabriel prostudoval, zpracoval a citoval neobyčejně velké množství literatury (580 citací) a teoretická část má vynikající informační hodnotu.

Výsledky jsou uváděny v třech blocích podle tří cílů práce, diskuse je rozdělena na dvě části (diskuse třetí části výsledků chybí). V první části byly v rámci této studie připraveny varianty pražského kmene VACV, u nichž byl deletován nebo naopak rekonstituován gen vCCI. V následných experimentech bylo zjištěno, že exprese vCCV sice snížila hladiny CC chemokinů, ale příliš neovlivnila imunogenost kmenů a na druhou stranu snížila protinádorový efekt. O vCCI zatím není mnoho literatury, prezentované výsledky jsou prioritní a mohou přispět k lepšímu pochopení problematiky atenuace a imunogenicity různých kmenů VACV a k optimalizaci vakcín na bázi rVACV. Určitě však bude nutno provést ještě více studií zaměřených mj. i na přímý účinek vCCI na mikroprostředí nádoru, aby bylo možno udělat jednoznačný závěr, jak exprese vCCI v rekombinantní VACV vakcíně ovlivní její terapeutické účinky.

Ve druhé části práce byl prokázán adjuvantní efekt GM-CSF (podání rekombinantního viru MVA-GM-CSF) při imunoterapii MHC-I-deficientních nádorů DNA vakcinací. Většina

protinádorových vakcín je založena na indukci cytotoxické T buněčné odpovědi, která však může být neúčinná vlivem snížené exprese MHC I na nádorových buňkách. Proto jsou experimenty tohoto typu pro vývoj optimální protinádorové terapie velmi důležité. Zde mám připomínku k monitorování imunitní odpovědi analýzou zastoupení jednotlivých populací lymfocytů ve slezině. Pro analýzu imunizačního účinku by tato analýza mohla být hlubší (např. procento zastoupení aktivovaných, efektorových a paměťových buněk u jednotlivých populací T a NK buněk). Pro model MHC I-deficientních buněk by byla zajímavá i analýza aktivace a možné spolupráce CD4 a NK buněk po imunizacích.

Práce je pečlivě a logicky napsána s kvalitní obrazovou dokumentací. Je bez větších chyb a překlepů, opakovaně se objevuje formátování odstavců uprostřed věty. V abstraktu je hodně zkratk, které jsou vysvětleny až dále v seznamu zkratk. Citace jsou seřazeny podle abecedy a zároveň číslovány, přičemž k některým číslům nejsou citace přiřazeny. V textu jsou citace uváděny pod jménem autora, v tomto případě je standardem je seřadit podle abecedy a nečíslovat.

MUDr. Pavel Gabriel prokázal, že je schopen samostatně vědecky pracovat a v rámci práce získal nová data, která byla publikována v dvou článcích. Doporučuji, aby práce byla přijata jako podklad pro udělení titulu PhD.

Dotazy k diskusi

- Zkoušeli jste nebo budete testovat vliv samotného vCCI na růst nádorů a jak by se teoreticky mělo ovlivnění mikroprostředí nádoru inhibicí CC chemokinové aktivity v různých fázích vývoje nádoru projevit na jeho růstu?
- Byla úroveň produkce GM-CSF po podání MVA-GM-CSF kvantifikována *in vitro* nebo *in vivo*?
- Je možné, že u použitých kmenů viru jsou exprimovány i další virem kódované chemokin-vazebné proteiny, které váží stejné CC-cytokiny jako vCCI a bude pro další výzkum důležité připravit kmeny s delecí více těchto genů, nejenom vCCI, aby byly získány více jednoznačné výsledky?
- Infekce virem kmene P13 nikoliv jinými testovanými kmeny vede k dočasnému snížení zastoupení CD4-pozitivních buněk ve slezině (Obr. 24), je známo, čím je to způsobeno?
- Probíhají další experimenty s linií produkující WT antigen?

RNDr. Milan Reiniš, CSc.

Laboratoř nádorové imunologie
Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i.
Václavská 1083, 142 20 Praha 4