

Oponentský posudek na dizertační práci

Název: The role of human heat shock protein Hsp70, Hsp60 and Mycobacterium bovis Hsp65 in pathogenesis of graft versus host disease and rheumatoid/juvenile idiopathic arthritis

Autorka: Nguyen Thi Thu Hien, M.D.

Předložená práce obsahuje 110 stran textu s 206-ti odkazy na recentní literaturu. Je členěna do šesti úvodních kapitol, vymezení cílů práce a dále kapitol ve kterých jsou výsledky shrnuty a formulovány závěry.

Zvolené téma je aktuální, cíle jsou jasně definovány, po stránce formální je dizertační práce napsána přehledně a čtivě kvalitní angličtinou, bez překlepů, s kvalitní obrazovou dokumentací.

V úvodu jsou podány základní informace o heat shock proteinech (HSP) a jejich základních funkcích v ochraně jiných membránových proteinů, při prezentaci antigenu molekulami I. a II. třídy MHC a při regulaci dějů bránících indukci apoptózy. V další části jsou charakterizovány jednotlivé rodiny HSP. Malé HSP s alfa krystalinovou doménou mají chaperonovou funkci a inhibují apoptózu a jejich nejvíce studovaným zástupcem je Hsp27. Hsp60 protein ze stejnojmenné rodiny HSP představuje 15-20% všech buněčných proteinů a hraje zásadní roli v mitochondriálním transportu proteinů regulací konformačních a strukturálních změn a účastní se i replikace mitochondriální DNA. Představitele další rodiny, Hsp70 lze prokázat ve většině buněčných kompartmentů eukaryotických buněk či bakterií a využívají funkční domény pro ATP a peptidy. Hsp70 chrání částečně syntetizované peptidové sekvence před agregací a přispívá stabilizačním účinkem k transmembránovému transportu proteinů. Rodina HSP90 proteinů váže řadu signálních proteinů, účastní se konformační maturace receptorů a souvisejících kináz a několika mechanismy vykazuje antiapoptotický účinek přímo související i s onkogenezí. Rodina velkých stressových proteinů se nazývá HSP110 a někteří její zástupci jsou preferenčně zastoupeni v tkáni gonád. Dále jsou popsány extracelulární funkce stressových proteinů včetně procesu cross-prezentace a také receptorové struktury, na které se mohou HSP vázat při interakcích s antigen prezentující buňkou či makrofágem.

Další kapitoly jsou věnovány fyziologickým změnám v expresi stressových proteinů při stárnutí a jejich úloze za patologických podmínek. Vymezeny jsou jednotlivé HSP ve vztahu k původcům infekčních onemocnění a také úloha cross-reaktivity těchto proteinů u autoimunitních chorob, jako jsou revmatoidní artritida, juvenilní idiopatická artritida nebo diabetes. Zmíněna je však i ateroskleróza a význam HSP u maligních onemocnění či GvHD při transplantaci krvetvorných buněk.

Literární úvod je zakončen částí věnovanou terapeutickým možnostem s využitím stressových proteinů. Experimentální práce ukázaly účinnost vakcín obsahujících HSP u některých infekcí včetně tuberkulózy nebo opičího modelu HIV, v klinických

studiích jsou testovány vakcíny proti papilomavirům a herpetickým virům. V případě autoimunitních chorob byla testována vakcinace pomocí Hsp60 u diabetu I. typu a peptid z Hsp40 u revmatoidní artritidy. U nádorových onemocnění může být Hsp90 protein inhibován geldanamycinem a jeho analogy, v úvahu přicházejí také antisense oligonukleotidy. Další možností je využít autologní stressové proteiny jako nosiče k prezentaci nádorových antigenů, fáze III. klinických studií probíhá u metastazujícího melanomu, lymfomu a karcinomů pankreatu, žaludku, ledvin a také u metastazujícího kolorektálního karcinomu. Testována je také možnost ex-vivo stimulace pomocí Hsp70 s reinfúzí aktivovaných NK buněk.

Cílem vlastní práce bylo jednak analyzovat protilátkovou odpověď proti třem různým HSP u pediatrických pacientů po transplantaci krvevorných buněk a u nemocných s juvenilní idiopatickou fibrózou a dále sledovat membránovou expresi Hsp70 na synoviálních buňkách od pacientů s revmatoidní artritidou a juvenilní idiopatickou artritidou.

První publikovaná práce prokázala vyšší citlivost metody ELISA v detekci anti-rhHsp70 v séru oproti metodám Western blot a SDS-PAGE, kterými je možno detekovat pouze protilátky proti rhHsp60 a mykobakteriálnímu Hsp65.

Metoda ELISA byla poté využita k analýze protilátek proti těmto třem stressovým proteinům v séru pacientů v průběhu transplantace krvevorných buněk a neprokázala vztah mezi výskytem protilátek a klinickými parametry, což však mohlo být způsobeno poměrně malým souborem.

Další práce již prokázala zvýšené hladiny protilátek proti Hsp70 u nemocných s juvenilní idiopatickou artritidou oproti kontrolní skupině. Jednalo se převážně o isotyp IgG u systémového postižení a IgM u oligoartritidy, hladiny protilátek korelovaly se stupněm postižení a byly vyšší zejména při pozitivitě RF.

Studie zabývající se humorální odpovědí proti mykobakteriálnímu Hsp 65 z *M.bovis* zjistila seropozitivitu jednotlivých fragmentů tohoto proteinu u pacientů s juvenilní idiopatickou artritidou a osob před transplantací krvevorných buněk v porovnání s kontrolní skupinou.

Vysoká membránová exprese inducibilního Hsp70 byla detekována na fibroblastoidních synoviálních buňkách od pacientů s těžkým průběhem revmatoidní artritidy a u juvenilní idiopatické artritidy v porovnání s autologními kožními fibroblasty.

Při podrobnější imunofenotypizaci těchto buněk byla prokázána ko-lokalizace Hsp70 s receptorem pro HSP CD91 u buněk z artrotických kloubů oproti autologním fibroblastům, které vykazovaly pouze basální Hsp70 expresi.

Ke kvalitní práci nemám závažné připomínky, diskutabilní jsou pouze relativně málo četné soubory pacientů v některých publikacích, dovoluji si několik dotazů:

1. U pacientů indikovaných k transplantaci krvetvorných buněk byla zjištěna serologická reaktivita proti jednotlivým fragmentům mykobakteriálního Hsp65 z *M.bovis*. Jaká je dynamika hladin těchto protilátek po transplantaci?
2. Zvýšená exprese inducibilního Hsp70 na fibroblastům podobných buňkách ze synovie kloubů postižených artritidou je porovnávána s autologními kožními fibroblasty. Jaká je exprese tohoto proteinu na fibroblastech při zánětu postihujícím kůži, např. při infekci, ekzému nebo psoriáze.
3. Není nepřítomnost TLR2, TLR4, CD14, CD36 a CD40 na synoviálních buňkách dána pouze tím, že se jedná spíše o charakteristické znaky leukocytů než fibroblastů?

Závěr: Z výše uvedeného posudku vyplývá, že předložená dizertační práce je kvalitní po obsahové i formální stránce, splnila stanovené cíle a svými výsledky přinesla nové poznatky. Autorka osvědčila, že má hluboké znalosti v oboru, je schopna samostatně vědecky pracovat a ovládá metody k úspěšnému pokračování ve své vědecké činnosti. Dizertační práce splňuje požadavky stanovené dle § 47 zákona o vysokých školách č. 111/1998 Sb., a proto **doporučuji by byl Dr. Nguyen Thi Thu Hien udělen titul Ph.D.**

V Praze 20.12.2007

Doc. MUDr. Ilja Stříž, CSc.

přednosta Pracoviště klinické a transplantační imunologie

Institut Klinické a Experimentální Medicíny

Vídeňská 1958/9, 140 21 Praha 4