

**CHARLES UNIVERSITY**

**Faculty of Science**



Summary of dissertation thesis

Autoreferát disertační práce

**Tau protein, a biomarker of Alzheimer's disease: *in vitro* phosphorylation and tau-reactive antibodies characterization.**

**Tau protein, biomarker Alzheimerovy choroby: *in vitro* fosforylace a charakterizace tau reaktivních protilátek.**

**Mgr. Lenka Hromádková**

Praha, 2018

**Doctoral study programs in biomedicine  
Doktorské studijní programy v biomedicině**

*Charles University  
and Czech Academy of Sciences*

*Univerzita Karlova  
a Akademie věd České republiky*

Program: Animal Physiology  
Program: Fyziologie živočichů (P1521)

Chairman of the Board / Předseda oborové rady:  
doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Workplace: National Institute of Mental Health (Klečany, CZ)  
Školící pracoviště: Národní ústav duševního zdraví (Klečany, ČR)

Author/Autor: Mgr. Lenka Hromádková

Supervisor/Školitel: RNDr. Daniela Řípová, CSc. (from/od 5. 09. 2012 –  
to/do 06. 01. 2016), prof. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D. (from/od 06. 01.  
2016)

Supervisor-specialist/Školitel-konzultant: prof. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.  
(5. 09. 2012 - 06. 01. 2016), doc. MUDr. Aleš Bartoš, Ph.D.

The dissertation can be found in the relevant libraries of the Faculty of  
Science, Charles University.

S disertací je možno se seznámit v příslušných knihovnách Přírodovědecké  
fakulty Univerzity Karlovy.

## **Abstract**

Tau protein is a microtubule-associated protein. Under pathological conditions, abnormal posttranslational modifications (PTMs) and misfolding of tau occurs and leads to aggregation into tangles, the histopathological hallmark of Alzheimer's disease (AD).

The discovery of naturally occurring antibodies directed to tau protein (nTau-Abs) in body fluids of AD and healthy subjects and their presence in intravenous immunoglobulin (IVIG) products has begun the investigation of their therapeutic potential. The deep characterization of nTau-Abs is a crucial step in understanding their physiological role and possible involvement in AD pathogenesis.

The main goal of the thesis was determination of character and reactivity profile of nTau-Abs isolated from plasma of AD and healthy subjects as well as from IVIG product. We mainly focused on IgG subclass distribution, their avidity and reactivity with various tau forms. In relation to nTau-Abs project, epitope mapping method to determine the precise localization of binding site between tau and nTau-Abs also were optimized. Especially, tau fragment that forms during proteolytic cleavage and possesses pro-aggregation motif and the most hydrophobic region was investigated due to its abnormal unspecific adsorption.

Since phosphorylation is the main important PTM of tau tightly connected with AD pathology, the preparation of tau protein phosphorylated at specific residues in high purity was the next goal. Thus, kinase-loaded magnetic beads were prepared and characterized. This system was applied for sequential *in vitro* tau phosphorylation.

## Abstrakt

Tau protein se řadí mezi s mikrotubuly asociovanými proteiny. Za patologických podmínek je tau protein neobvykle post-translačně modifikován a nesprávně sbalován, což vede k jeho agregaci do tzv. neurofibrilárních smotků, hlavního histopatologického útvaru typického pro Alzheimerovu chorobu (AN).

Detekce přirozeně se vyskytujících protilátek reaktivních s tau proteinem (nTau-Abs) v tělních tekutinách pacientů s AN i zdravých jedinců a průkaz jejich přítomnosti také v intravenózních imunoglobulinových (IVIG) preparátech započaly výzkum jejich významu a možného využití v terapii AN. Samotná charakterizace těchto protilátek je klíčovým krokem k pochopení jejich fyziologické role a stejně jako jejich úlohy v rozvoji patogeneze AN.

Hlavním cílem předkládané práce byla charakterizace a studium reaktivního profilu nTau-Abs izolovaných z plazmy pacientů s AN, zdravých kontrol a z IVIG preparátu. Zaměřili jsme se na zastoupení jednotlivých IgG podtříd, jejich aviditu a reaktivitu s různými formami tau proteinu. Pro pokračující charakterizaci těchto protilátek jsme dále optimalizovaly metody epitopového mapování s tau proteinem, které nám budou sloužit k přesnější lokalizaci tau epitopů reagujících s nTau-Abs. V souvislosti s epitopovým mapováním, kdy je tau protein před vlastní analýzou fragmentován, jsme v elučních frakcích opakovaně nacházeli fragment, který obsahuje pro-agregační motiv a nejvíce hydrofobním úsekem a který vykazoval vysokou míru nespecifické sorpce. Proto jsme dále více prozkoumali jeho vlastnosti a navrhly řešení, jak jeho nespecifickou sorpci potlačit.

Dalším tématem této práce byla příprava tau proteinu s definovanými fosforylačními místy především proto, že fosforylace je jednou z nejvýznamnějších post-translačních modifikací úzce spojována s tau patologií u AN. K tomuto účelu jsme připravili magnetické částice s vázanou aktivní formou vybraných kináz. Následně jsme tento systém aplikovaly pro postupnou *in vitro* tau fosforylaci.

## **List of Contents / Obsah**

1. English part
  - a. Introduction
  - b. Hypotheses and aim of thesis
  - c. Materials and methods
  - d. Results and discussion
  - e. Conclusion
  
2. Česká část
  - a. Úvod
  - b. Hypotézy a cíle práce
  - c. Materiál a metodika
  - d. Výsledky a diskuze
  - e. Závěr
  
3. Abbreviations / Zkratky
4. References / Použitá literatura
5. Curriculum vitae
6. List of publications / Seznam publikací

# **1. ENGLISH PART**

## **1a. Introduction**

Tau protein is a microtubule-associated protein present in axonal projections in neurons where is involved in formation and stabilization of microtubules. Tau protein is also a representative of natively unfolded proteins, also termed as “intrinsically unstructured proteins”, characterized by a random structure in solution and minimal content of secondary structure (Schweers et al., 1994; Skrabana et al., 2006). Some of transient secondary conformation structures may participate in tau physiological functions as well as its pathological aggregation (Gamblin, 2005).

Under pathological conditions, tau protein is abnormally posttranslationally modified and misfolded. The human full-length form of tau contains 85 putative phosphorylation residues and is considered as an ideal substrate for multiple kinases and phosphatases. Thus, phosphorylation is the most studied PTM of tau linked to AD pathology (Gong et al., 2006; Martin et al., 2013). Abnormal phosphorylation of tau gradually leads to formation of oligomers and paired helical filaments, which are deposited into neurofibrillary tangles – one of the main histopathological hallmarks of AD (Wang et al., 2013).

Numerous studies have shown that AD belongs to protein conformational disorders. Thus, one of the leading therapeutic approaches is immunotherapy based on antibodies that are able to specifically eliminate altered, structurally modified, and aggregated forms of proteins. A relatively new encouraging strategy for AD therapy is an administration of IVIG products prepared from plasma of healthy donors representing a huge reservoir of natural antibodies. Numerous beneficial immunomodulatory and anti-inflammatory effects of IVIG and their application in the treatment of several immune-mediated neurological disorders has been described

(Durandy et al., 2009; Zivkovic, 2016). Unfortunately, the clinical trials phase III with IVIG in AD treatment has not supported the promising results obtained in the initial phases I and II (Relkin et al., 2014). Despite these disappointing results so far, several other IVIG clinical trials are ongoing (Cummings et al., 2017). Moreover, a considerable effort is devoted to the investigation of the potential mechanisms of action of IVIG and better characterization of AD-specific antibodies occurring in various IVIG products. To the best knowledge, to date, five studies regarding the presence of nTau-Abs in IVIG products have been published (Smith et al., 2013; Smith et al., 2014; Loeffler et al., 2015; Hromadkova et al., 2015; Krestova et al., 2017a). To evaluate the significance of nTau-Abs under physiological conditions as well as pathological circumstances is a difficult task. In general, their presence in body fluids of healthy individuals as well as AD patients suggests that they are unlikely to be harmful (Smith et al., 2013).

The isolation and subsequent characterization of nTau-Abs present in body fluids or in commercially IVIG products, which is crucial to better understand their occurrence, had not been published elsewhere. Thus, we focus on nTau-Abs that were successfully isolated from IVIG product Flebogamma and pooled plasma samples from AD patients and age-matched healthy controls (Hromadkova et al., 2015; Krestova et al., 2017a,b). We assume that their characterization and reactive profile mapping with any possible differences, which are the main goal of this work, could help us better understand their function in both physiological and AD-associated pathological conditions. Due to this main task, epitope mapping method with tau protein was introduced and system with immobilized active kinase forms was developed for sequential *in vitro* tau phosphorylation.

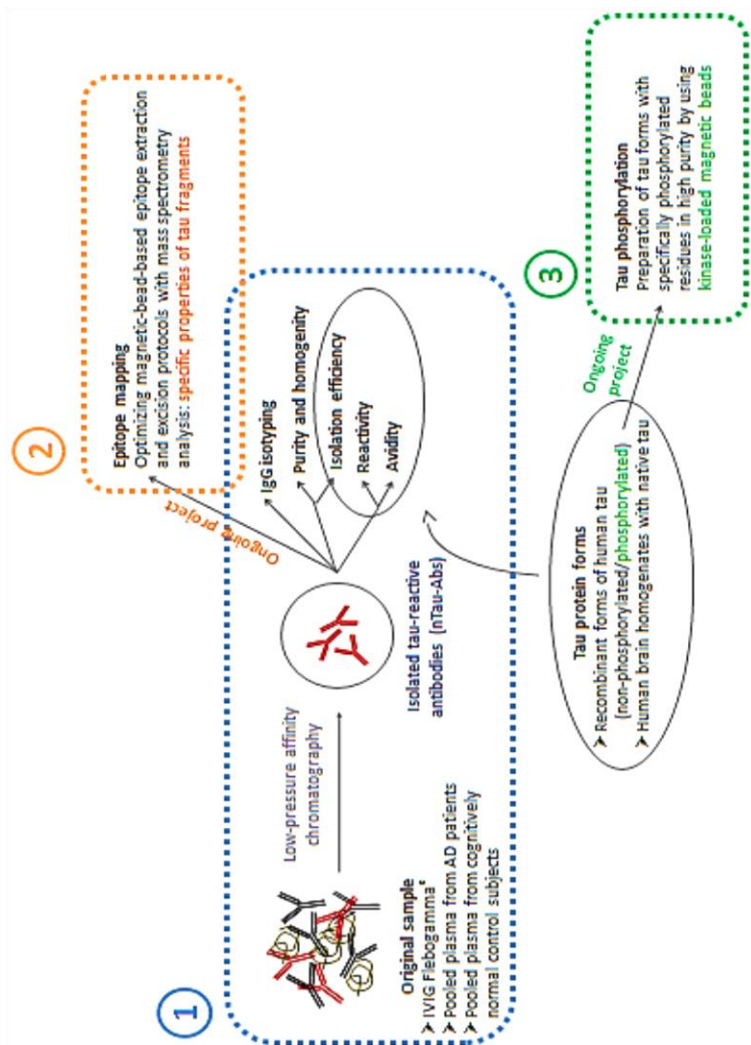


## **1b. Hypothesis and aim of the thesis**

The main histopathological hallmarks of AD brain are senile plaques containing amyloid beta peptides and neurofibrillary tangles forming by conformational modified forms of tau protein. Thus, AD also belongs to the group of so-called protein conformational disorders. The clearance of modified and misfolded molecules, blocking their polymerization, degrading aggregates, and/or inhibiting oligomer neurotoxicity could be the crucial players in beneficial mechanisms of action in therapeutic approaches. Especially, immunotherapy directed to pathological forms of amyloid beta or toxic tau species have been at the forefront of scientific interest in recent years. Tau pathology of AD is likely to be independent on amyloid beta metabolism and tau abnormalities occurring in specific brain regions better correlates with AD progression. Thus, characterization of naturally occurring tau-reactive antibodies, which are also present in IVIG products applied in clinical trials, is a very important task.

### **To fulfill these tasks, specific sub-goals were set:**

- 1) To evaluate the basic characteristics and reactivity of tau-reactive antibodies isolated from different pooled plasma samples utilizing various tau protein forms.
- 2) To optimize methods of epitope mapping considering specific aggregation-prone properties of tau protein enhanced after *in vitro* fragmentation.
- 3) To prepare kinase-loaded magnetic beads as a reusable system for sequential *in vitro* tau phosphorylation to produce highly pure defined product for further applications.



Scheme of the main aims of the thesis

## 1c. Materials and methods

### I. The basic characteristics and reactivity of isolated natural tau-directed antibodies (nTau-Abs)

- n-Tau-Abs isolation from IVIG Flebogamma® (5% DIF, 5g/ml, Grifols Biologicals Inc., Los Angeles, USA) and pooled plasma from seven health controls and from four AD patients by low-pressure affinity chromatography.
- His-tagged recombinant tau proteins (tau 1-4441 and two truncated forms 155-421 and 13-391 aa) as well as their *in vitro* phosphorylation are described in (Hromadkova et al., 2015). Sections of left hemisphere hippocampi were homogenized according to (Krestova et al., 2017a).
- Isolation efficiency and purity: SDS-PAGE electrophoresis, ELISA protocol (Hromadkova et al., 2015; Krestova et al., 2017a,b)
- IgG isotyping: IgG Subclass ELISA kit (Invitrogen, Camarillo, USA).
- Reactivity and avidity of nTau-Abs: Western blot, ELISA protocol (Krestova et al., 2017a), and dot-blot immunoassay (Hromadkova et al., 2015).

### II. Non-specific sorption of tau fragment with specific aggregation-prone properties and hydrophobic region occurring in methods of epitope mapping with MS analysis

- Recombinant full-length tau (Enzo Life Sciences, Farmingdale, USA), synthetic peptide correspond to 299H-317K of tau sequence (Apronex, Prague, CZ) monoclonal anti-tau antibody clone 7E5 (AJ Roboscreen, Leipzig, Germany).
- Epitope extraction: covalently immobilized 7E5 anti-tau Abs to Sera-Mag carboxylate-modified magnetic SpeedBeads (referred to MPs, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) using carbodiimide one-step method. Procedure of epitope extraction described in (Jankovicova et al. 2014; Hromadkova et al. 2016)
- Proteolytic digestion of tau protein: TPCK-treated trypsin and/or  $\alpha$ -chymotrypsin covalently immobilized to MPs according to (Hromadkova et al., 2016) in molar ratio to tau 1:20 (w:w).

- Approaches to avoid non-specific sorption of tau fragments: (1) coating of MPs by BSA, modification of MPs surface by (2) ethanolamine/Tris or (3) PEG, (4) additional incubation step with 8M urea
- MS analysis and RP-LC separation described in (Hromadkova et al., 2016)
- ThS fluorescence measurement in the absence or presence of heparin sodium salt as an inducer

### III. Kinase-loaded magnetic beads as a reusable system for sequential *in vitro* tau phosphorylation

- Oriented immobilization of His-tagged rabbit GSK-3 $\beta$  (Sigma-Aldrich) by affinity to SiMAG-IDA MPs (Chemicell GmbH, Berlin, Germany) decorated by Ni<sup>2+</sup> and Co<sup>3+</sup> (Hromadkova et al., 2018)
- Non-oriented immobilization of active rabbit muscle GSK-3 $\beta$  (New England Biolabs, Ipswich, USA) and active human ERK2 (Biaffin GmbH & Co KG, Kassel, Germany) to aldehyde-modified BcMag MPs (BioClone Inc., San Diego, USA) or carboxylated SeraMag MPs (Hromadkova et al., 2018)
- Phosphorylation of LMW substrates: LMW phosphopeptides CREB (New England Biolabs) and  $\epsilon$ -eIF2B (Enzo Life Sciences) for GSK-3 $\beta$  activity evaluation and TH24-33 (Enzo Life Sciences) for ERK2 activity evaluation
- Operational and storage stability of kinase loaded onto SeraMag MPs
- Semi-quantitative evaluation of phosphorylation rate: the relative intensities of unphosphorylated and phosphorylated LMW substrate forms were extracted from MS spectra, summed and set as 100%, to which the proportion of unphosphorylated/phosphorylated forms was normalized (Hromadkova et al., 2018)
- *In vitro* sequential tau phosphorylation using GSK-3 $\beta$ -loaded and ERK2-loaded MPs
- Tau phosphorylation analysis by western blot and MS (tau fragmentation, enrichment by using TiO<sub>2</sub> and MS data analysis) are described in (Hromadkova et al., 2018)

For more detailed information, all materials and methods are described in published papers related to the topic of the thesis.

## **1d. Results and discussion**

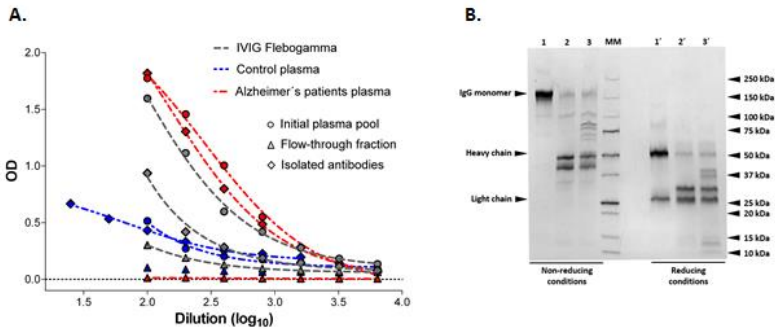
### **I. The basic characteristics and reactivity of isolated natural tau-reactive antibodies (nTau-Abs)**

The latest therapeutic approaches to AD are using intravenous immunoglobulin (IVIG) products. Therefore, the characterization of target-specific antibodies naturally occurring in IVIG products is beneficial. We focused on characterization of antibodies isolated against tau protein (nTau-IVIG abs) from Flebogamma IVIG product (Hromadkova et al., 2015; Krestova et al., 2017a). Moreover, the presence of tau-reactive Abs was reported in human body fluids as well (Rosenmann et al., 2006; Fialova et al., 2011; Bartos et al., 2012; Klaver et al., 2017; Krestova et al., 2017a; Kuhn et al., 2018). Thus, we isolated and characterized tau-directed antibodies also from pooled plasma samples of patients with AD (nTau-AD Abs) and age-matched control subjects (nTau-Ctrl Abs) (Krestova et al., 2017a).

The isolation process was assessed by ELISA in all fractions of isolation (Fig 1A) and purity of isolated antibodies by SDS-PAGE electrophoresis (Fig 1B). The elution fractions of nTau-AD Abs and nTau-Ctrl Abs contained contaminant proteins, but we did not applied additional purification steps before their basic characterization due to IgG subclass distribution maintenance.

The IgG subclass distribution was also investigated. The values of individual IgG subclasses in human plasma and IVIG products are approximately: ~ 60% of IgG1, ~ 30% of IgG2, ~ 6% of IgG3, and < 4% of IgG4 (Skvaril et al., 1977; French and Harrison, 1984). In initial pooled AD plasma, we could observe less content of IgG2 compared to IgG2 levels in human plasma and IVIG Flebogamma. The isolated n-Tau Ctrl Abs were enriched with IgG4 subclass and, interestingly, the IgG3 subclass was present in the nTau-AD and nTau-Ctrl Abs only in trace amount. In nTau-IVIG Abs fraction, the IgG3 levels were elevated (Fig 2).

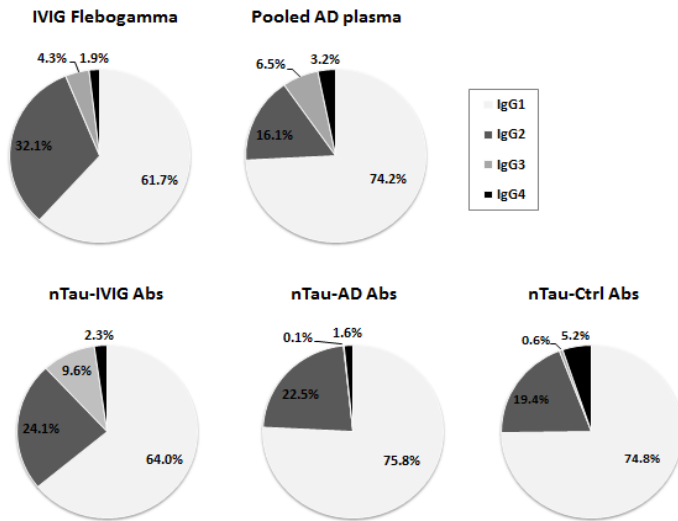
The IgG3 subclass belongs to potent pro-inflammatory antibodies in early response to protein and viral antigens with a shorter half-life (Vidarsson et al., 2014). It is also suggested that natural IgG Abs are predominantly IgG3 subclass-specific (Panda and Ding, 2015). Thus, differences in IgG subclass distribution among isolated nTau-Abs may indicate altered response to pathological forms of tau, but this hypothesis has to be investigated in more details.



**Fig 1:** (A) Isolation efficiency of natural anti-tau antibodies from IVIG Flebogamma, plasma pools of AD patients and control subjects estimated by ELISA. Serial dilution of each fraction was probed against His-tagged tau 1-441 aa antigen. The detected signal is expressed as absorbance at 450nm depending on the logarithm of sample dilution. (B) Verification of purity of isolated antibodies by SDS-PAGE electrophoresis (4-15% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gel, Bio-Rad). Elution fractions containing nTau-IVIG Abs (1: non-reducing, 1' reducing conditions), nTau-AD Abs (2, 2'), and nTau-Ctrl Abs (3, 3').

The reactivity of isolated nTau-Abs was evaluated against various recombinant tau forms by Western blot (Fig 3). We also assessed the specificity of isolated nTau-Abs for selected tau forms by ELISA and the results confirmed the findings from Western blot where the preference of nTau-AD Abs toward the tau 1-441 aa was observed confirmed as compared to nTau-Ctrl and nTau-IVIG (Table 2).

We also evaluated the strength of binding of nTau-Abs expressed as avidity index by dot-blot immunoassay (Svobodova et al., 2013). Surprisingly, the avidity of nTau-AD Abs against tau 1-441 aa was found to be low in contrast to tau fragment 155-421 aa, whereas nTau-Ctrl and nTau-IVIG showed comparable high avidity against both forms of tau protein (Table 2).



**Fig 2:** The distribution of IgG subclasses in initial samples of IVIG Flebogamma and pooled plasma from AD patients, and eluted fractions, nTau-IVIG, nTau-AD, and nTau-Ctrl antibodies, respectively.

Reactivity of all the isolated plasma nTau Abs was also verified against native proteins present in the homogenates of human hippocampi obtained from two AD and one control subject (Krestova et al., 2017a) by Western blot. All isolated nTau Abs reacted similarly with brain-derived proteins from tissue homogenates with a preference toward higher molecular weight (HMW) proteins (Fig 3A, C, and E). Biotinylated isolated nTau Abs showed an attenuation of the signal against HMW proteins in brain homogenates (Fig 3B, D, and F). Especially, biotinylated

nTau-AD Abs showed similar staining pattern as rabbit polyclonal anti-tau antibody, which was raised against the recombinant His-tagged tau 1-441 aa (Fig 3D, G). The detection of HMW proteins with nTau-Ctrl Abs was comparable to monoclonal Ab AT180 which has specificity to phospho-T231 of tau molecule (Fig 3F, H).

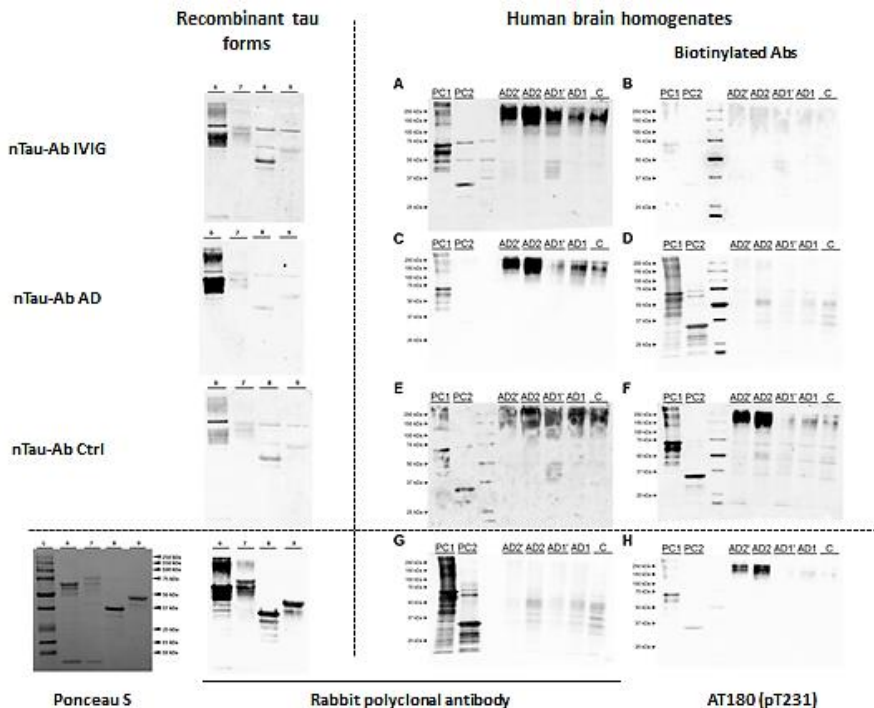
**Table 1:** The quantitative data of isolated antibodies reactivity with different tau antigens established by ELISA nad Dot-blot immunoassay

		Isolated nTau-Abs against	
		Tau 1-441 His-tag	Tau 155-421 His-tag
Reactivity:	nTau-IVIG Abs	1:195	1:173
ELISA dilution at	nTau-AD Abs	1:756	1:595
OD 0.5 <sup>a</sup>	nTau-Ctrl Abs	1:67	N/A
Avidity index:	nTau-IVIG Abs	1.54	1.78
Dot-blot <sup>b</sup>	nTau-AD Abs	0.29	1.50
	nTau-Ctrl Abs	1.27	1.56

<sup>a</sup> The results are expressed as a dilution of antibodies reacting with antigen (0.1µg/well) to reach OD 0.5 at 450nm; <sup>b</sup> Avidity index is expressed as molarity of ammonium thiocyanate (M) that causes the decrease of initial sample signal (in the absence of thiocyanate) on the value of 50%. N/A = not applicable

The findings of different reactivity profile, IgG subclass alterations, and avidity of natural tau-reactive antibodies isolated from IVIG Flebogamma and pooled plasma samples from AD patients and control subjects may indicate the participation of humoral immune system in clearance of altered tau molecules. But more experiments are needed to prove our data and suggested hypothesis.





**Fig 3:** Reactivity of isolated nTau antibodies against recombinant full-length tau 1-441 aa and tau fragment 155-421 in non-phosphorylated/phosphorylated forms (left panel) and against brain-derived proteins in human brain homogenates (right panel). Adapted from (Krestova et al., 2017a).

## II. Non-specific sorption of tau fragment with specific aggregation-prone properties and hydrophobic region occurring in methods of epitope mapping with MS analysis

Mass spectrometry (MS) coupled with bioaffinity separation techniques is considered a powerful tool for studying protein interactions. We focused on epitope analysis of tau protein, which contains two VQIXXX pro-aggregation motifs regarded as crucial elements in the

formation of PHFs, the main pathological characteristics of AD. To identify major immunogenic structures, the epitope extraction technique utilizing protein fragmentation, magnetic microparticles functionalized with specific antibodies and final MS analysis was applied (Jankovicova et al., 2008).

The human full-length recombinant tau protein (1-441 aa) was cleaved by immobilized TPCK-trypsin and the generated mixture of tryptic fragments represent the starting material for epitope extraction procedure. To implement the epitope extraction procedure for tau, the immunosorbent with anti-tau mAb clone 7E5 (epitope 155R-A166) was prepared (Jankovicova et al., 2014; Hromadkova et al., 2016). Regardless of the applied immunosorbent specificity, we repeatedly found in MS spectra of elution fractions a tryptic fragment correspond to tau amino acid sequence 299-HVPGGGSVQIVYKPVDSLK-317, whose natural adhesiveness devaluated the experimental results (Fig 5A).

Therefore, we introduced several conventional alternations to avoid this nonspecific adsorption. An additional coating of MPs surface by inert protein BSA was applied. We also blocked the remaining reactive groups on MPs surface by ethanolamine/Tris or we reduced the hydrophobicity of beads by polymers m-PEG-NH<sub>2</sub> (Hermanson 2013; Kucerova et al., 2014). But none of these approaches prevent the non-specific sorption of the tryptic fragment (Fig 4). Also, the additional incubation step with 8M urea during the washing steps has no effect (Fig 5B).

Moreover, the tryptic fragment pro-aggregation and hydrophobic properties that might contribute to adsorption phenomenon were confirmed by Thioflavin S assay (Friedhoff et al., 1998) and reversed-phase chromatography (Hromadkova et al., 2016) (data not shown).

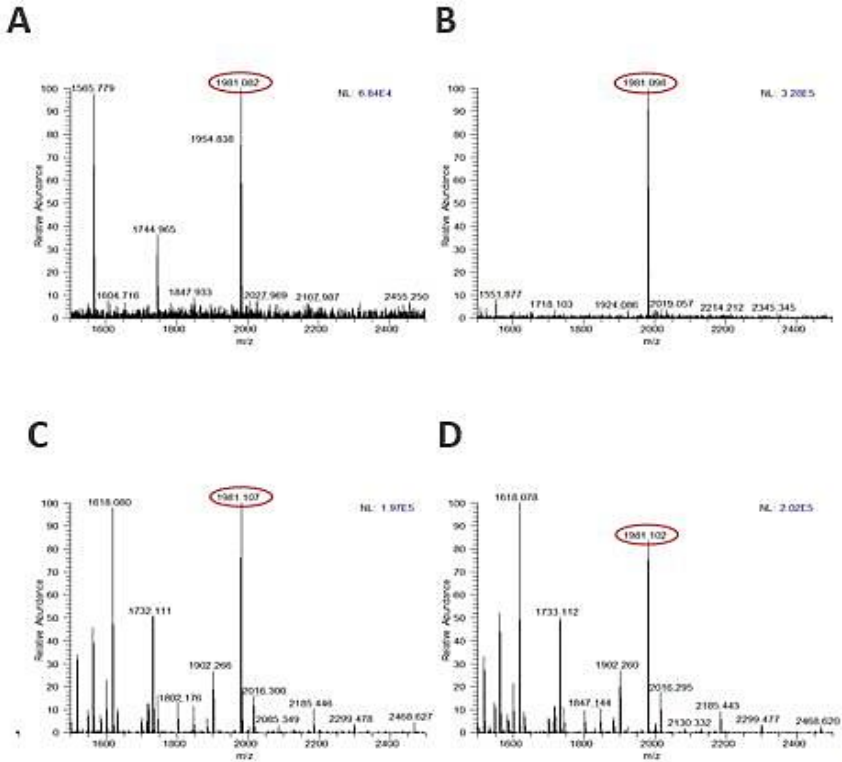


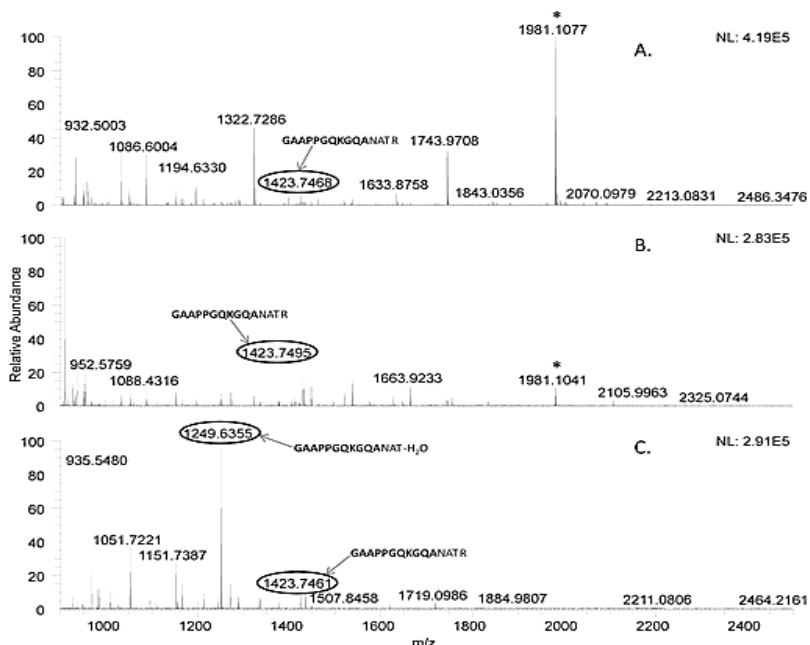
Fig 4: Representative MS spectra show that conventional approaches of modification of magnetic particles surface are not able to prevent the nonspecific adsorption of tryptic fragment 299-HVPGGGSVQIVYKPVDSLK-317 (m/z 1980.0912, in red circle). Additional coating of beads surface by BSA (A), blocking of the remaining reactive groups on beads surface by ethanolamine (B) or Tris (C), and reduction of beads hydrophobicity by polymers m-PEG-NH<sub>2</sub> (D) were insufficient to avoid non-specific sorption.

As an alternative step, we tested the effect of tau fragmentation simultaneously by two immobilized proteases, TPCK-trypsin and  $\alpha$ -chymotrypsin (Hromadkova et al., 2016). Tryptic digestion was maintained to obtain fragments of a length appropriated for MS analysis and chymotrypsin was selected based on its cleavage preferences that enable to cleave peptide bond 310-YK-311 solely in the PHF6 minimal interaction motif (Table 2). This multi-enzymatic approach appeared to be efficient for the elimination of the non-specifically interacting tau fragment in eluted fractions, whereby fragments encompassing the epitope specific for anti-tau antibody 7E5 (m/z 1423.7461 and 1449.6355) remained detectable in spectra (Fig 5C).

**Table 2:** Basic characteristics of adhesive tau fragment generated after tryptic digestion and newly-formed fragments after tryptic/chymotryptic digestion

Immobilized enzymes	Generated peptide sequence	[M+H] <sup>+</sup>	Missed cleavage	pI
TPCK-trypsin	299-HVPGGG <b>VQIVYK</b> PVDLSK-317	1980.0912	0	8.5
	299-HVPGGG <b>VQIVYK</b> PVDL-315	1764.9643	1	6.7
	299-HVPGGG <b>VQIVY</b> -310	1212.6371	0	6.7
TPCK-trypsin + $\alpha$ -chymotrypsin	301-PGGGS <b>VQIVY</b> -310	976.5098	0	6.0
	311- <b>K</b> PVDLSK-317	786.4720	1	8.6
	311- <b>K</b> PVDL-315	571.3450	0	5.8

Theoretically estimated peptide fragments of tau protein (human tau-F isoform) including aggregation PHF6 motif and generated by in-silico enzymatic digestion. The amino acid sequence of the PHF6 motif is highlighted in bold.



**Figure 5:** (MALDI)-Orbitrap spectra of elution fractions obtained by epitope extraction using 7E5 monoclonal anti-tau Ab in combination with: (A) tau digested by immobilized TPCK-trypsin, (B) tau digested by immobilized TPCK-trypsin and an additional 8M urea washing, and (C) tau digested by immobilized TPCK-trypsin and  $\alpha$ -chymotrypsin. Peptides belonging to adhesive fragment 299H-317K are marked with asterisk. Amino acid sequence 156-GAAPPGQKGGQANATR-170 with theoretical m/z 1423.75 (circled) contains the epitope 155R-A166 specific to mAb, clone 7E5.

This study shows pitfalls of epitope extraction technique with tau protein. We provided information about the adhesive character of the tryptic tau fragment 299-HVPGGGSCQIVYKPVDSLK-317 containing PHF6 minimal aggregation protein and the most hydrophobic tau region. Our findings show the significance of negative controls and offer the solution how to effectively overcome the difficulties associated with the adhesiveness of peptides linked with specific sequence motifs. This optimized protocol will be applied in determination of epitopes interacting with antibodies of unknown tau epitope specificity.

### III. Kinase-loaded magnetic particles as a reusable system for sequential *in vitro* tau phosphorylation

ERK2 and GSK-3 $\beta$  immobilization onto magnetic particles (MPs) either by affinity to beads decorated by Ni<sup>2+</sup>/Co<sup>3+</sup> or by covalently bonding of amine groups in proteins to beads functionalized with carboxylic or aldehyde groups was successfully achieved since the immobilized forms of kinases are still active (Table 3).

**Table 3:** Kinase activity after immobilization to magnetic particles, as measured against low-molecular-weight substrates

Recombinant kinase	Magnetic particles	Enzyme bound <sup>a</sup>	Phosphorylation conditions	Phosphorylation rate [%] <sup>b</sup>
GSK-3 $\beta$ His-tag	SiMAG-IDA/Ni <sup>2+</sup>	20U	5h, 30°C	~90.0
GSK-3 $\beta$ His-tag	SiMAG-IDA/Co <sup>3+</sup>	20U	5h, 30°C	~90.0
GSK-3 $\beta$ (NEB)	BcMag beads	1667U	5h, 30°C	~95.0
GSK-3 $\beta$ (NEB)	SeraMag SpeedBeads	1667U	6h, 30°C	96.6 $\pm$ 2.79
ERK2	SeraMag SpeedBeads	275U	6h, 30°C	91.9 $\pm$ 3.78

<sup>a</sup>Same as the amount of enzyme bound to beads, since no kinase activity was detected in the supernatant collected after immobilization

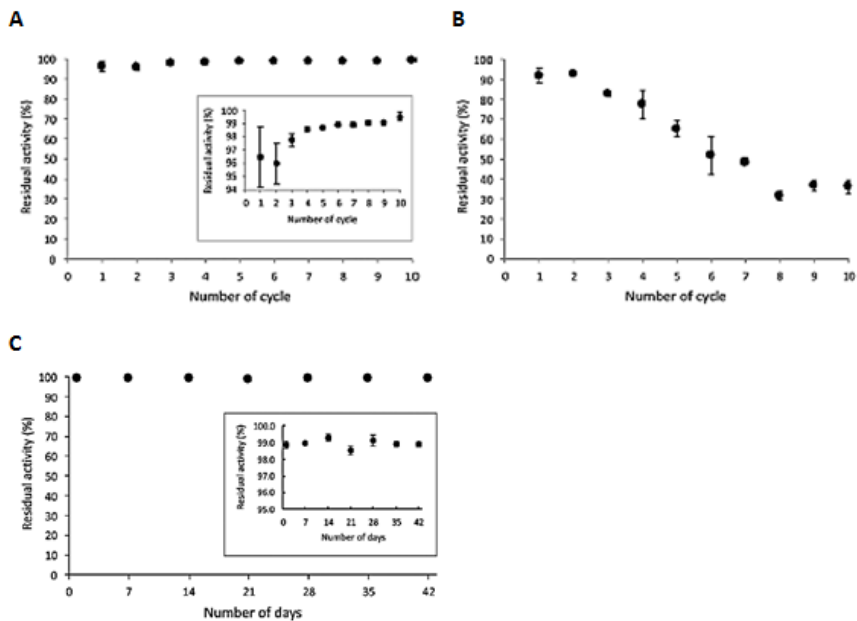
<sup>b</sup>Calculated according to (Hromadkova et al., 2018) as described in section 3a Materials and Methods

The six days storage stability was subsequently tested with all kinase-loaded MPs, but only systems with covalently attached kinases onto BcMag beads or SeraMag SpeedBeads were stable after these six days storage at 4°C (data not shown). Thus, we therefore selected ERK2/GSK-3 $\beta$  loaded SeraMag MPs (referred to ERK2-loaded/ GSK-3 $\beta$ -loaded MPs) as the immobilized kinase system to test their operational and storage stability. After 10 assays of operational stability test, the activity of immobilized GSK-3 $\beta$  was essentially intact at 95.5  $\pm$  0.34% in the tenth

cycle (Fig 6A). In contrast, ERK2-loaded MPs were less operationally stable, with activity decreasing to  $36.2 \pm 2.01\%$  in the tenth assay (Fig 6B). Due to great operational stability of GSK-3 $\beta$ -loaded MPs, we also investigated its storage stability that showed the activity remains fully active even after 42 days at 4°C (Fig 6C).

Finally, kinase-loaded SeraMag MPs were applied to phosphorylate full-length recombinant tau protein (1-441 aa). Altered GSK-3 $\beta$  activity is associated abnormal phosphorylation of tau, highlighting its suitability as a model substrate (Maqbool et al., 2016). In addition, GSK-3 $\beta$  has enhanced affinity for pre-phosphorylated substrates with motif SXXXpS (Dajani et al., 2001; Buch et al., 2010). Accordingly, pre-phosphorylation by ERK2, for instance, may influence GSK-3 $\beta$  activity against Ser/Thr residues in tau (Martin et al., 2013). Thus, tau was phosphorylated sequentially with SeraMag beads loaded with ERK2 and GSK-3 $\beta$ . Phosphorylation of specific positions T231, S356, and S396 in tau was confirmed by western blot (data not shown). In addition, tryptic digestion, TiO<sub>2</sub> enrichment, and microgradient separation of the final product generated 26 phosphopeptides on mass spectrometry, 20 of which contained two or more phosphorylations (data not shown). Mapping of phosphorylation is ongoing.

In the published article (Hromadkova et al., 2018), we reported for the first time that covalent immobilization of ERK2 and GSK-3 $\beta$  produces highly reusable, stable kinases. This system with active forms of kinases loaded to SeraMag MPs were tested with tau protein to obtain sequentially phosphorylated product of high purity.



**Figure 6:** Operational stability of SeraMag beads loaded with (A) GSK-3 $\beta$  and (B) ERK2, and the storage stability of GSK-3 $\beta$ -loaded SeraMag beads at 4°C (C). Activity was measured by phosphorylation of low-molecular-weight substrates and calculated according to (Hromadkova et al., 2018) as briefly described in section 3a Materials and Methods.



## 1e. Conclusion

The thesis is mainly focused on basic characterization of naturally occurring tau-reactive antibodies (nTau-Abs). We successfully isolated nTau-Abs from pooled plasma samples obtained from AD patients, control individuals, and from IVIG product Flebogamma. Among these three groups, the basic characterization showed differences in reactivity with applied tau forms varied in their most pathologically relevant post-translational modifications; truncation, phosphorylation, and aggregation, respectively. Our results support the concept that the repertoire of nTau-Abs is a natural part of the humoral immune system. This project is ongoing to confirm our hypothesis that the function of nTau-Abs is rather protective via their participation in clearance of putative toxic tau forms and this system is altered in AD as may indicate these results so far.

Thus, introduction and optimization of epitope mapping methods, which may unravel the main antigenic structure of modified and misfolded tau, are also included. We showed that pro-aggregation and hydrophobic properties of tau regions may be enhanced by tau fragmentation which is widely used in proteomic studies and may lead to non-specific sorption of such fragments and erroneous interpretation of results. Thus, we suggested disturbing the key pro-aggregation sequences by a combination of proteases to suppress non-specific sorption of such fragments to obtain more relevant results.

The last sub-project of this thesis was to develop a reusable system for sequential *in vitro* phosphorylation to produce highly pure defined phosphorylated forms of tau protein applicable in isolation procedures and sensitive immunoassays with nTau-Abs. We introduced the preparation of kinase-loaded magnetic beads with numerous advantages, such as their reusability with respect to economic aspect, the more controllable process of phosphorylation, and a high purity of final phosphoprotein. This system was shown to be successfully applied with tau protein. This part of the project is ongoing and is promisingly developed.

## **2. ČESKÁ ČÁST**

## 2a. Úvod

Tau protein je s mikrotubuly asociovaný protein nacházející se téměř výhradně v axonech nervových buněk, kde napomáhá při formování mikrotubulů a jejich stabilizaci. Tau protein se mimo jiné řadí do skupiny tzv. přirozeně nesbalených proteinů, které nemají terciální strukturu a pouze několik málo úseků v jejich molekule má tendenci utvářet uspořádání  $\alpha$ -helixu nebo  $\beta$ -skládaného listu (Schweers et al., 1994; Gamblin, 2005; Skrabana et al., 2006).

Za patologických podmínek je tau protein abnormálně post-translačně modifikován a nabývá nesprávné konformace. Nejdelší forma lidského tau proteinu obsahuje 85 aminokyselin, které mohou být fosforylovány. Proto je fosforylace nejvíce studovanou post-translační modifikací (PTM) ve vztahu ke tvorbě toxických forem tau proteinu u Alzheimerovy nemoci (AN) (Gong et al., 2006; Martin et al., 2013). Abnormální fosforylace až hyperfosforylace tau proteinu postupně vede k tvorbě oligomerů a párových helikálních filament (PHFs), které se ukládají ve formě nerozpustných intracelulárních neurofibrilárních smotků. Tyto agregáty jsou jedním z hlavních histopatologických nálezů u AN (Wang et al., 2013).

Mnoho studií dokazuje, že AN lze řadit mezi nemoci způsobené tzv. patologickou konformací proteinů. Z tohoto důvodu se stále více do popředí zájmu v terapeutických přístupech dostává imunoterapie založená na protilátkách, které by cíleně eliminovaly poškozené, strukturně pozměněné a agregované formy proteinů. Jedním z nových trendů je využití preparátů intravenózních imunoglobulinů (IVIG), dnes běžně používaných v léčbě některých neurologických onemocnění (Durandy et al., 2009; Zivkovic, 2016). Možné výhody léčby AN pomocí IVIG preparátů lze spatřovat v jejich imunomodulačních a protektivních účincích. Provedené klinické studie s IVIG prozatím však nepřinesly

očekávané výsledky a neměly žádný nebo pouze minimální efekt na zmírnění klinických příznaků AN (Relkin et al., 2014; Cummings et al., 2017). IVIG jsou koncentrované preparáty imunoglobulinů podtřídy G (IgG) získané z plazmy tisíců dárců. Převážná většina těchto IgG patří do skupiny tzv. přirozeně se vyskytujících protilátek, jejichž funkce jsou pouze částečně popsány. Přirozené protilátky reagující s tau proteinem byly popsány také v IVIG preparátech (Smith et al., 2013; Smith et al., 2014; Loeffler et al., 2015; Hromadkova et al., 2015; Krestova et al., 2017a). Mimo IVIG byly detekovány také v séru a mozkomíšním moku zdravých lidí a pacientů s AD (Rosenmann et al., 2006; Fialova et al., 2011; Bartos et al., 2012; Klaver et al., 2017; Krestova et al., 2017a; Kuhn et al., 2018). Jejich izolace a charakterizace, která by lépe podkryla jejich význam, však stále chybí. Z tohoto důvodu jsme se zaměřili na přirozené tau-reaktivní protilátky, které jsme úspěšně izolovali z IVIG preparátu Flebogamma, z plazmy pacientů s AD a stejně starých kontrol (Hromadkova et al., 2015; Krestova et al., 2017a,b). Domníváme se, že jejich charakterizace a zmapování jejich reaktivního profilu i s případnými rozdíly, které jsou předmětem této práce, pomohou lépe pochopit jejich funkci ve vztahu k patologii tau proteinu. V návaznosti na toto téma jsme také zavedli metodu epitopové extrakce s tau proteinem a navrhly systém imobilizovaných kináz pro postupnou *in vitro* fosforylaci tau proteinu.

## **2b. Hypotézy a cíle práce**

Uvážíme-li, že hlavními histopatologickými znaky v mozkové tkáni AN pacientů jsou senilní plaky tvořené peptidy amyloidu beta a neurofibrilární smotky obsahující konformačně pozměněné formy tau protein, lze AN pokládat za nemoc způsobenou patologickou konformací proteinů. Právě eliminace vzniku a ukládání toxických forem proteinů s pozměněnou konformací nebo jejich odklizení by mohly být klíčovými mechanismy v léčbě AN. V duchu této hypotézy se nyní zkoumají možnosti imunoterapie založené na podávání protilátek namířených proti patologickým formám amyloidu beta a/nebo tau proteinu. Tau patologie u AN je z velké části na poruchách metabolismu amyloidu beta nezávislá a jeho anomálie lépe korelují s progresí AN v mozkové tkáni. Charakterizace přirozeně se vyskytujících protilátek namířených proti tau proteinu, které byly detekovány také v IVIG preparátech objevujících se v klinických studiích, je velice důležitým tématem.

### **V práci byly stanoveny tyto dílčí cíle:**

- 1) Jedním z hlavních cílů této práce byla charakterizace tau-reaktivních přirozeně se vyskytujících protilátek izolovaných z plazmy pacientů s AN, kontrolních subjektů a z IVIG preparátu.
- 2) V souvislosti s předešlým cílem bylo také nutné pečlivě optimalizovat podmínky analýz vyžadujících fragmentaci tau proteinu (např. epitopové mapování), kdy se mohou vlastnosti některých jeho úseků negativně projevit na interpretaci dat z hmotnostní spektrometrie.
- 3) Dalším podprojektem byla příprava imobilizovaných kináz a jejich použití k fosforylaci rekombinantních tau forem pro aplikace v citlivých imunoanalytických metodách sloužících k charakterizaci přirozených tau-reaktivních protilátek.

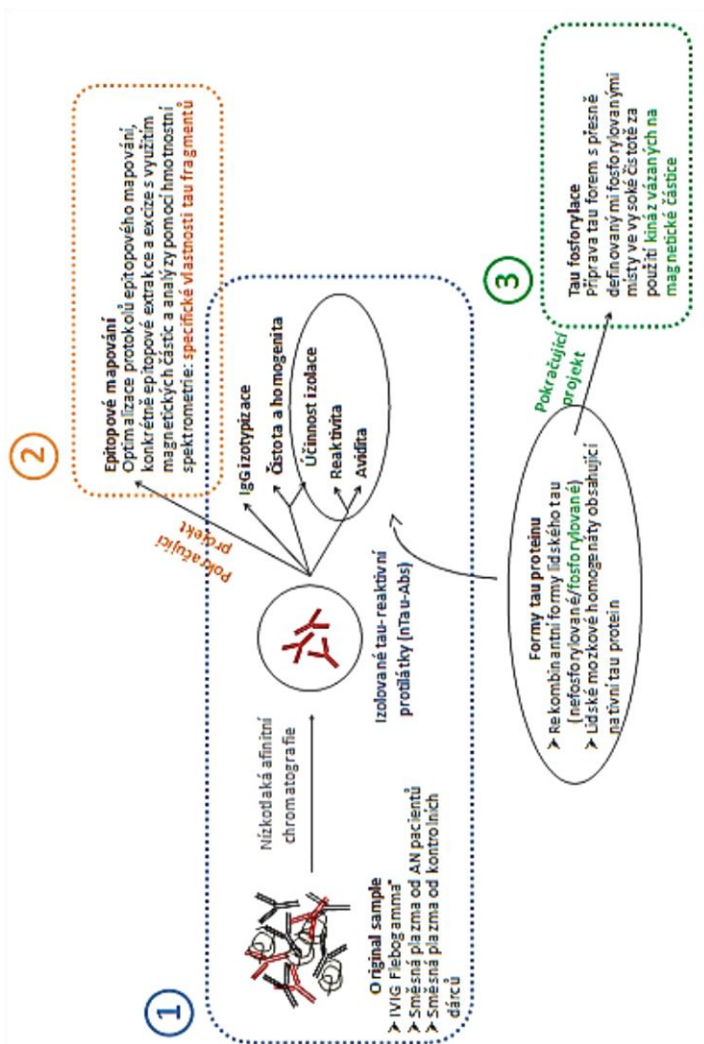


Schéma dílčích cílů dizertační práce

## 2c. Materiál a metodika

### I. Základní charakteristika a reaktivita izolovaných přirozeně se vyskytujících tau-reaktivních (nTau) protilátek

- n-Tau protilátky izolované z IVIG Flebogamma® (5% DIF, 5g/ml, Grifols Biologicals Inc., Los Angeles, USA) a směsných vzorků plazmy od sedmi zdravých kontrol a čtyř pacientů s AN nízkotlakou afinitní chromatografií
- Příprava rekombinantních tau proteinů s 6x histidinovou kotvou (tau 1-441 a zkrácená forma 155-421) a jejich *in vitro* fosforylace jsou popsány v práci (Hromadkova et al., 2015). Levé hemisféry hipokampů od dvou AN pacientů a jedné kontroly byly homogenizovány dle (Krestova et al., 2017a)
- Účinnost izolace a čistota elučních frakcí: SDS-PAGE elektroforéza a ELISA (Hromadkova et al., 2015; Krestova et al. 2017a,b)
- IgG izotypizace: IgG Subclass ELISA kit (Invitrogen, Camarillo, USA)
- Reaktivita a aviditní index nTau protilátek: Western blot, ELISA (Krestova et al., 2017a) a dot-blot imunoevej (Hromadkova et al., 2015)

### II. Nespecifická sorpce tau fragmentu, obsahujícího pro-agregační motiv a hydrofobní oblast, která ovlivňuje výsledky metod epitopového mapování spojené s MS analýzou

- Rekombinantní nejdelší forma lidského tau (Enzo Life Sciences, Farmingdale, USA), syntetizovaný peptid odpovídající 299H-317K tau sekvence (Apronex, Praha, CZ) monoklonální anti-tau protilátka, klon 7E5 (AJ Roboscreen, Leipzig, Německo)
- Epitopová extrakce: kovaletně navázané 7E5 anti-tau protilátky na magnetické partikule Sera-Mag carboxylate-modified magnetic SpeedBeads (dále zavedena zkratka MPs, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) pomocí karbodiimidové jedнокrokové metody. Metoda epitopové extrakce blíže popsána v (Jankovicova et al., 2014; Hromadkova et al., 2016)
- Proteolýza tau proteinu: TPCK-ošetřený trypsin a/nebo  $\alpha$ -chymotrypsin kovaletně vázané na MP dle (Hromadkova et al., 2016) v molárním poměru k tau 1:20

- Metody potlačení nespecifické sorpce tau fragmentu: (1) inkubace MPs s BSA, modifikace povrchu MP (2) ethanolaminem/Tris nebo (3) PEG, (4) přídavná inkubace s 8M močovinou
- MS analýza and RP-LC separace pospána v (Hromadkova et al., 2016)
- ThS měření fluorescence bez nebo v přítomnosti heparinu

### **III. Magnetické částice s vázanými kinázami jako opakovatelně použitelný systém pro postupnou *in vitro* fosforylaci tau proteinu**

- Orientovaná vazba králičí GSK-3 $\beta$  s histidinovou kotvou (Sigma-Aldrich) pomocí afinity na SiMAG-IDA MPs (Chemicell GmbH, Berlín, Německo), které nesly Ni<sup>2+</sup> nebo Co<sup>3+</sup> ionty (Hromadkova et al., 2018)
- Neorientovaná imobilizace aktivní formy králičí GSK-3 $\beta$  (New England Biolabs, Ipswich, USA) a aktivní lidské formy ERK2 (Biaffin GmbH & Co KG, Kassel, Německo) na BcMag MPs s aldehydovými skupinami (BioClone Inc., San Diego, USA) nebo SeraMag MPs s karboxylovými skupinami (Hromadkova et al., 2018)
- Fosforylace nízkomolekulárních substrátů: fosfopeptid CREB (New England Biolabs) a  $\epsilon$ -eIF2B (Enzo Life Sciences) pro stanovení aktivity GSK-3 $\beta$  a TH24-33 (Enzo Life Sciences) pro stanovení aktivity ERK2
- Operační a skladovací stabilita kináz vázaných na MPs
- Semi-kvantitativní stanovení míry fosforylace: relativní intenzity nefosforylované a fosforylované formy nízkomolekulárního substrátu získané z MS spekter byly sečteny jako 100% a procentuální zastoupení obou forem bylo poté vztaženo k této hodnotě (Hromadkova et al., 2018)
- *In vitro* postupná fosforylace tau protein s využitím GSK-3 $\beta$  a ERK2 imobilizovaných na MPs
- Analýza tau fosforylace pomocí Western blot a MS (tau fragmentace, obohacení na TiO<sub>2</sub> částicích a MS analýza dat) jsou detailněji popsány v (Hromadkova et al., 2018)

Pro detailnější informace týkajících se materiálu a metodiky odkazují na publikované články související s tématem disertační práce (citace).



## 2d. Výsledky a diskuze

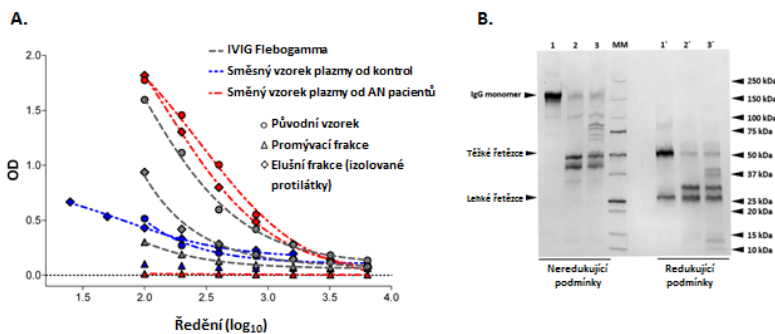
### I. Základní charakterizace a reaktivita izolovaných přirozeně se vyskytujících tau-reaktivních protilátek (nTau-Abs)

Mezi poslední trendy v terapii AN patří také aplikace IVIG preparátů. Charakterizace protilátek z IVIG namířených proti specifickým cílovým proteinům by dozajista pomohla lépe pochopit jejich funkce. V této práci jsme se zaměřili na charakterizaci přirozených protilátek izolovaných proti tau protein z IVIG preparátu Flebogamma (nTau-IVIG Abs) (Hromadkova et al., 2015; Krestova et al., 2017a,b). Byly publikovány práce vypovídající o přítomnosti těchto protilátek také v lidském biologickém materiálu u kontrol a pacientů s AN AD (Rosenmann et al., 2006; Fialova et al., 2011; Bartos et al., 2012; Klaver et al., 2017; Krestova et al., 2017a; Kuhn et al., 2018), proto jsme provedli izolaci a charakterizaci nTau protilátek ze směsných vzorků plazmy AN pacientů (nTau-AD Abs) a kontrolních dárců (nTau-Ctrl Abs) (Krestova et al., 2017a).

Samotný proces izolace byl sledován metodou ELISA, kterou bylo detekováno množství nTau-Abs ve všech izolačních frakcích (Obr 1A). Čistota elučních frakcí byla hodnocena pomocí SDS-PAGE elektroforézy (Obr 1B). Eluční frakce s nTau-AD a nTau-Ctrl Abs obsahují nečistoty, ale pro základní charakterizaci jsme se snažili vyhnout přídavným přečišťovacím krokům, aby nedošlo k ovlivnění například zastoupení jednotlivých IgG podtříd.

Následovalo hodnocení zastoupení jednotlivých IgG podtříd. Procentuální zastoupení individuálních IgG podtříd v lidské plazmě a IVIG preparátech je následující: ~ 60% IgG1, ~ 30% IgG2, ~ 6% IgG3 a < 4% IgG4 (Skvaril et al., 1977; French and Harrison, 1984). V původním směsném vzorku AN plazmy jsme naměřili nižší hodnoty pro IgG2 v porovnání s hodnotami IgG2 běžně udávanými pro lidskou plazmu a než v preparátu IVIG Flebogamma. Izolované nTau-Ctrl Abs obsahovaly vyšší procentuální podíl IgG4 molekul. Zajímavý výsledek jsme naměřili pro

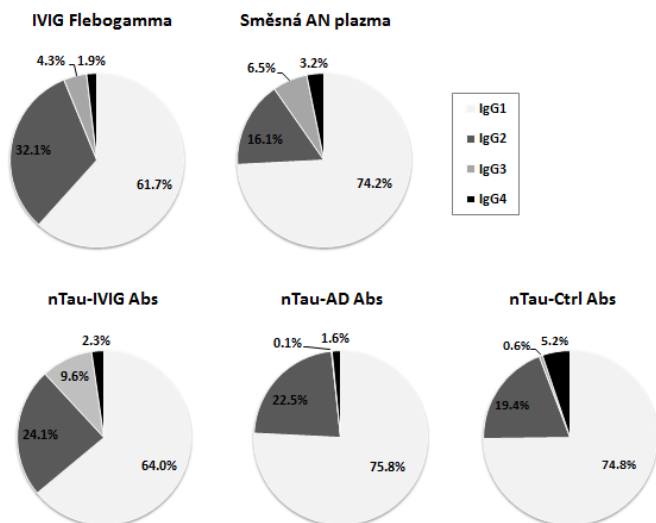
IgG3 zastoupení u izolovaných nTau-AD a nTau-Ctrl Abs, které zde byly detekovatelné pouze ve stopovém množství. U frakce nTau-IVIG Abs byl naopak podíl IgG3 frakce zvýšen (Obr 2). Podtřída IgG3 obsahuje potenciální prozánětlivé protilátky, které mají krátkou životnost a podílejí se na časně odpovědi proti proteinovým a virovým antigenům (Vidarsson et al., 2014). Je také diskutováno, že právě protilátky patřící do IgG3 podtřídy tvoří značnou část přirozeně se vyskytujících protilátek (Panda and Ding, 2015). Zjištěné rozdíly v zastoupení jednotlivých IgG podtříd mezi izolovanými frakcemi protilátek mohou poukazovat na probíhající změny v odpovědi na přítomnost patologických forem tau proteinu. Ale k potvrzení této hypotézy musí být v budoucnu provedeno více experimentálních měření.



**Obr 1:** (A) Efektivita izolace přirozených nTau protilátek z IVIG Flebogamma, směsných vzorků plazmy od AN pacientů a kontrol hodnocena metodou ELISA. Postupně ředění jednotlivých frakcí bylo zkoumáno proti tau 1-441 aa s histidinovou kotvou jako antigenu. Detekovaný signál je vyjádřen jako absorbance při 450nm v závislosti na logaritmu ředění vzorků. (B) Ověření čistoty izolovaných nTau protilátek pomocí SDS-PAGE elektroforézy (4-15% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gel, Bio-Rad). Eluční frakce obsahující nTau-IVIG protilátky (1: neredukující, 1' redukující podmínky), nTau-AD protilátky (2, 2'), a nTau-Ctrl protilátky (3, 3').

Reaktivity izolovaných nTau-Abs s různými rekombinantními formami tau proteinu byla vyšetřena metodou Western blot (Obr 3). K hodnocení reaktivity byla aplikována také ELISA, která výsledky z

Western blot potvrdila. Protilátky nTau-AD se preferenčně vážou s nejdelší formou lidského tau 1-441 v porovnání s nTau-Ctrl a nTau-IVIG Abs (Tabulka 1).



**Obr 2:** Zastoupení IgG podtříd v původním vzorku IVIG Flebogamma a směsném vzorku plazmy od AN pacientů a v elučných frakcích obsahujících nTau-AD, nTau-IVIG a nTau-Ctrl protilátky. (Abs = protilátky)

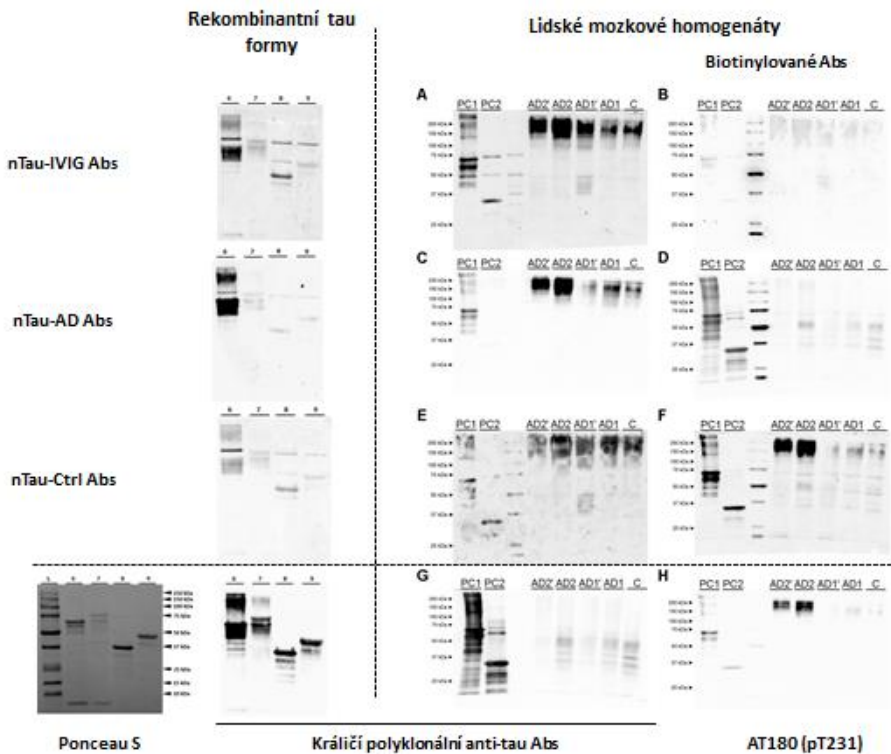
Sílu vazby mezi izolovanými nTau-Abs a tau proteinem jsme vyjádřili hodnotou aviditního indexu měřené metodou dot-blot imunoeseje (Svobodova et al., 2013). V případě nejdelší lidské formy tau proteinu (1-441 aa) byl aviditní index nTau-AD Abs v porovnání s aviditními indexy nTau-Ctrl a nTau-IVIG Abs nižší. Zatímco s tau fragmentem 155-421 měly všechny tři izolované vzorky protilátek aviditu srovnatelnou (Tabulka 1).

V neposlední řadě nás zajímala reaktivita izolovaných protilátek s nativními formami tau proteinu. K tomuto účelu jsme využili Western blot s homogenáty z lidských hipokampů získaných od dvou AN a jednoho kontrolního subjektu (vlastní příprava homogenátů je popsána v Krestova et al., 2017a). Všechny tři frakce izolovaných nTau-Abs vykazovaly podobnou reaktivitu s proteiny vyšších molekulárních hmotností (Obr 3A, C a E). Biotinylované formy izolovaných nTau-Abs dávaly obecně s vysokomolekulárními proteiny nižší odezvu signálu (Obr 3B, D a F). Hlavní rozdíl byl u biotinylovaných nTau-AD Abs, které měly reaktivitu s nízkomolekulárními formami tau podobnou jako polyklonální králíčí protilátky získané z králíka imunizovaného rekombinantní formou tau 1-441 aa (Obr 3D, G). Reaktivita biotinylovaných nTau-Ctrl Abs byla srovnatelná s reaktivitou AT180 protilátek, které jsou specifické pro tau fosforylovaný na pozici T231 (Obr 3F, H).

**Tabulka 1:** Kvantitativní data o reaktivitě izolovaných nTau protilátek s různými formami tau jako antigenu, které byly získány z ELISA a dot-blot imunoeseje

		Izolované nTau protilátky proti	
		Tau 1-441 His-tag	Tau 155-421 His-tag
Reaktivita:	nTau-IVIG	1:195	1:173
ELISA – ředění při	nTau-AD	1:756	1:595
OD 0.5 <sup>a</sup>	nTau-Ctrl	1:67	N/A
Aviditní index:	nTau-IVIG	1.54	1.78
Dot-blot <sup>b</sup>	nTau-AD	0.29	1.50
	nTau-Ctrl	1.27	1.56

<sup>a</sup> Výsledky vyjádřeny jako ředění protilátek reagujících s antigenem (0.1 µg/jamka), kdy dosáhnou OD 0.5 při absorbanci 450nm; <sup>b</sup> Aviditní index je vyjádřen jako molarita thiokyanatanu amonného (M), která způsobí pokles signálu v porovnání se signálem počátečního vzorku (absence thiokyanatanu amonného) na hodnotu 50%. N/A = nezměřeno.



**Obr 3:** Reaktivita izolovaných nTau protilátek s rekombinantní nejdelší lidskou formou tau 1-441 a tau fragmentem 155-421 (levý panel) a s proteiny přítomnými v homogenizované tkáni lidských hipokampů (pravý panel). Převzato z (Krestova et al., 2017a), kde je metoda detailněji popsána.

Nalezené rozdíly v reaktivním profilu, zastoupení jednotlivých IgG podtříd a aviditě přirozených tau-reaktivních protilátek izolovaných z IVIG preparátu Flebogamma a směsných vzorků plazmy z AN pacientů a kontrol mohou poukazovat na úlohu humorální složky imunitního systému v odstraňování patologických forem tau proteinu. Ale pro bližší odhalení přesných mechanismů, jak se přirozené tau-reaktivní protilátky podílejí na tau biologii, bude potřeba více experimentů.

## **II. Nespecifická sorpce tau fragmentu, obsahujícího specifický pro-agregační motiv a hydrofobní oblast, která ovlivňuje výsledky metod epitopového mapování spojené s MS analýzou**

Hmotnostní spektrometrie (MS) spojená s bioafinitními separačními technikami je považována za užitečný nástroj pro studium proteinových interakcí. Zaměřili jsme se na epitopovou analýzu tau proteinu, který má ve své molekule dva VQIXXK pro-agregační motivy považované za klíčové aminokyselinové sekvence při vzniku PHFs – hlavních patologických znaků charakterizujících AN (citace). Metoda epitopové extrakce využívající proteolytické fragmentace proteinu, magnetické mikročástice funkcionalizované specifickými protilátkami a MS analýzu byla zavedena pro identifikaci hlavních imunogenních struktur tau proteinu (Jankovicova et al., 2008).

Rekombinantní lidský tau protein 1-441 byl štěpen imobilizovaným TPCK-trypsinem a směs nově vzniklých tryptických tau fragmentů reprezentovala počáteční materiál pro epitopovou extrakci. Pro zavedení tohoto protokolu s tau jsme použili imunisorbent s anti-tau protilátkami, klon 7E5 proti epitopu 155R-A166 (Jankovicova et al., 2014; Hromadkova et al., 2016). I přes použití protilátky o známé epitopové specifitě, jsme v MS spektrech elučních frakcí opakovaně nacházeli tryptický fragment odpovídající aminokyselinové sekvenci 299-HVPGGGSVQIVYKPVDSLK-317 tau proteinu, jehož přirozená adhezivita znehodnocovala experimentální výsledky (Obr 5A).

Dalším krokem byla proto snaha potlačit jeho nespecifickou sorpci několika běžně zavedenými metodami. Byly aplikovány metody pokrytí povrchu MPs pomocí BSA, dále blokace zbylých reaktivních skupin na povrchu MPs pomocí etanolaminu/Tris nebo snížení hydrofobity částic jejich pegylací (Hermanson, 2013; Kucerova et al., 2014). Ale žádný z těchto přístupů nezabránil nespecifické sorpci tryptického fragment (Obr

4). Ani přídavná inkubace s 8M močovinou nepřinesla potlačení přítomnosti tohoto fragmentu v elučních frakcích (Obr 5B).

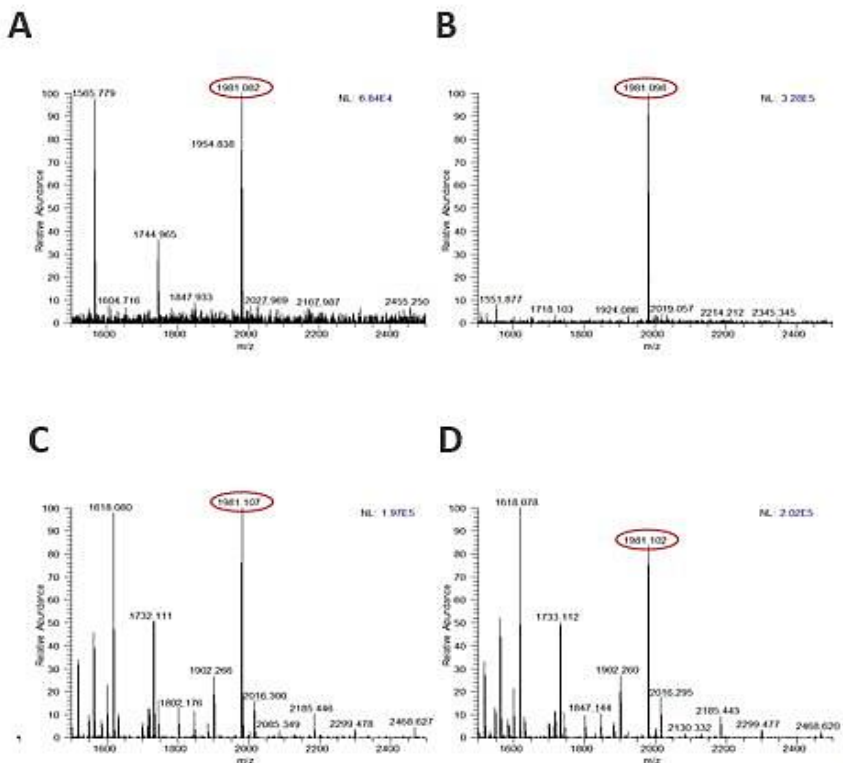


Fig 4: MS spektra ukazující neúčinnost běžně používaných přístupů na potlačení nespecifické sorpce tryptického tau fragment 299-HVPGGGSVQIVYKPVDSLK-317 ( $m/z$  1980.0912, červeně). Přídavné modifikace povrchu magnetických částic BSA (A), blokace zbylých reaktivních skupin na částicích etanolaminem (B) nebo Tris (C), snížení hydrofobity částic polymerem m-PEG-NH<sub>2</sub> (D).

Navíc pro-agregační a hydrofobní vlastnosti tohoto tryptického fragmentu, které se na adsorbčním fenoménu mohou podílet, byly nepřímou

potvrzeny Thioflavin S esejí (Friedhoff et al., 1998) a chromatografií na obrácené fázi (data neukázána) (Hromadkova et al., 2016).

Jako alternativní přístup zamezení sorpce fragmentu na povrch MPs byl testován vlastní efekt fragmentace tau proteinu dvěma imobilizovanými kinázami současně, TPCK-trypsinem a  $\alpha$ -chymotrypsinem (Hromadkova et al., 2016). Tento systém byl vybrán, protože proteolýza trypsinem zajišťuje vznik fragmentů optimální délky vhodných pro MS analýzu a chymotrypsin štěpí mezi aminokyselinami 310-YK-311 nacházejícími se výhradně v PHF6 minimálním interagujícím motivu (Table 2). Použití tohoto více enzymového systému pro fragmentaci tau proteinu se ukázal jako dostatečný pro vlastní eliminaci nespecifické sorpce tau fragmentu, který se již v elučních frakcích stejně jako nově vzniklé fragmenty neobjevovaly. Úseky tau proteinu obsahující epitope specifický pro protilátku 7E5 (m/z 1423.7461 and 1449.6355) byly v MS spektrech stále detekovatelné (Obr 5C).

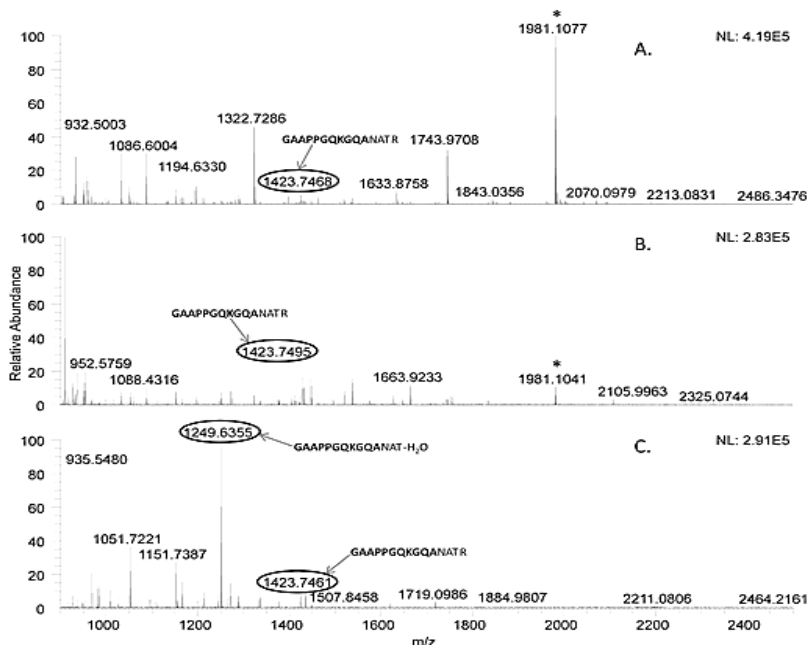
**Tabulka 2:** Základní vlastnosti adhezivního tau fragmentu generovaného po štěpení trypsinem a nově vzniklých peptidů po štěpení systémem trypsin/chymotrypsin

Imobilizované enzymy	Sekvence vzniklých fragmentů	[M+H] <sup>+</sup>	Chybějící štěpení	pI
TPCK-trypsin	299-HVPGGGVQIVYKPVDSLK-317	1980.0912	0	8.5
	299-HVPGGGVQIVYKPVDL-315	1764.9643	1	6.7
	299-HVPGGGVQIVY-310	1212.6371	0	6.7
TPCK-trypsin + $\alpha$ -chymotrypsin	301-PGGGSVQIVY-310	976.5098	0	6.0
	311-KPVDSLK-317	786.4720	1	8.6
	311-KPVDL-315	571.3450	0	5.8

Teoreticky odvozené peptidové fragmenty tau proteinu (izoforma F lidského tau) zahrnující proagregační motiv PHF6 a vzniklé in-silico enzymatickou fragmentací. Aminokyselinová sekvence PHF6 motivu je zvýrazněna.



Tato studie ukazuje na možná úskalí, se kterými se lze potýkat během epitopového mapování s tau proteinem, konkrétně u technik epitopové extrakce. Dále poskytuje informace o adhezivním charakteru tryptického tau fragmentu 299-HVPGGGSCQIVYKPVDLSK-317 obsahujícího PHF6 minimální interakční motiv a nejvíce hydrofobní úsek tau proteinu. Experimentální výsledky dále vyzdvihují význam negativních kontrol a tento článek nabízí alternativní řešení, jak efektivně předejít problémům spojených s adhezivitou peptidů nesoucích specifické aminokyselinové sekvence. Nově optimalizovaný protokol je postupně zaváděn pro účely nalezení tau epitopů reagujících s anti-tau protilátkami o neznámé epitopové specifitě, které je třeba charakterizovat.



**Obrázek 5:** (MALDI)-Orbitrap spektra elučních frakcí získaných epitopovou extrakcí s využitím imunosorbentu s monoklonální protilátkou 7E5 v kombinaci s: (A) tau fragmentací imobilizovaným TPCK-trypsinem, (B) tau fragmentací imobilizovaným TPCK-trypsinem a přidavnou inkubací s 8M močovinou, (C) tau fragmentací imobilizovaným TPCK-trypsinem a  $\alpha$ -chymotrypsinem. Peptid odpovídající adhezivnímu fragmentu 299H-317K je označen hvězdičkou. Aminokyselinová sekvence 156-GAAPPGQKGQANATR-170 s teoretickou m/z 1423.75 (v kroužku) obsahuje epitope 155R-A166 specifický pro monoklonální anti-tau protilátku 7E5.

### III. Kinázy vázané na magnetické částice jako opakovaně použitelný systém pro postupnou *in vitro* fosforylaci tau proteinu

V tomto podprojektu jsme úspěšně imobilizovaly dvě kinázy, ERK2 a GSK-3 $\beta$ , na magnetické částice (MPs). Byla použita vazba pomocí afinity histidinové kotvy rekombinantních forem kináz k Ni<sup>2+</sup>/Co<sup>3+</sup> iontům na povrchu částic nebo kovalentní imobilizace přes aminové skupiny protein s částicemi majícími karboxylové nebo aldehydové skupiny na svém povrchu (Tabulka 3).

**Tabulka 3:** Aktivita kináz bezprostředně po imobilizaci na magnetické částice měřená mírou fosforylace nízkomolekulárních substrátů

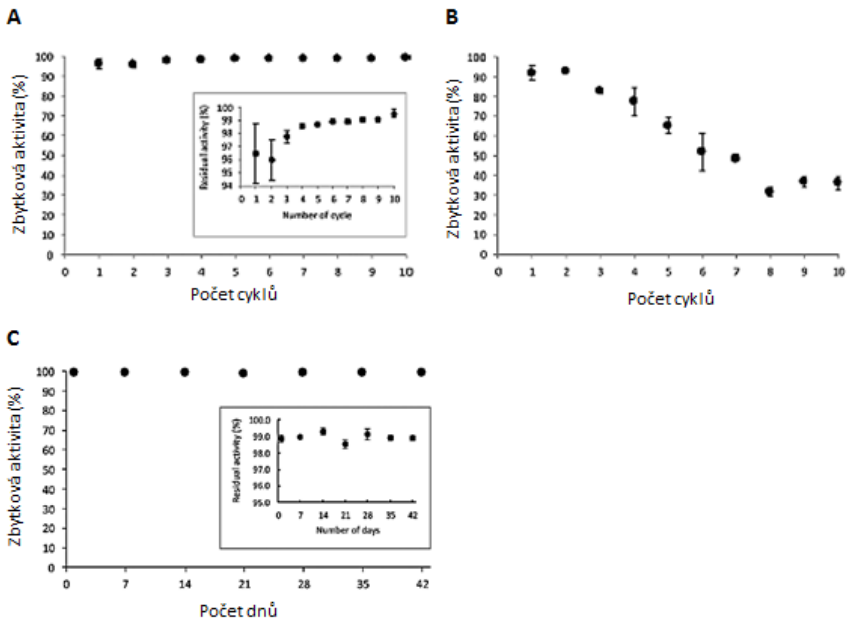
Rekombinantní kináza	Magnetické částice	Množství enzymu <sup>a</sup>	Podmínky fosforylace	Míra fosforylace [%] <sup>b</sup>
GSK-3 $\beta$ His-tag	SiMAG-IDA/Ni <sup>2+</sup>	20U	5h, 30°C	~90.0
GSK-3 $\beta$ His-tag	SiMAG-IDA/Co <sup>3+</sup>	20U	5h, 30°C	~90.0
GSK-3 $\beta$ (NEB)	BcMag beads	1667U	5h, 30°C	~95.0
GSK-3 $\beta$ (NEB)	SeraMag SpeedBeads	1667U	6h, 30°C	96.6 $\pm$ 2.79
ERK2	SeraMag SpeedBeads	275U	6h, 30°C	91.9 $\pm$ 3.78

<sup>a</sup> Vyjádřeno jako aktivita enzymu, kterého bylo použito k vazbě na magnetické částice, protože kinázová aktivita v supernatantu sbíraného po imobilizaci byla neměřitelná.

<sup>b</sup> Míra fosforylace vypočtena na základě výpočtů uvedených v článku (Hromadkova et al., 2018) a popsána v sekci 2c Materiál a metodika.

Následně byla testována u všech systémů v Tabulce 3 jejich skladovací stabilita při 4°C po dobu šesti dnů. Pouze kovalentně vázané formy enzymů na BcMag a SeraMag SpeedBeads byly stále aktivní (data neukázána). Pro následující aplikace byly proto vybrány ERK2 a GSK3β kinázy vázané na SeraMag MPs (dále pro zjednodušení uváděny jako ERK2 a GSK3β vázané na MPs). Operační stabilita měřena v deseti za sebou jdoucích cyklech ukázala, že aktivita GSK-3β vázané na MPs se s opakováním téměř nemění ( $95.5 \pm 0.34\%$  aktivita v 10. cyklu, Obr 6A). Kdežto u ERK2 vázané na MPs byl patrný pokles aktivity s postupným navyšováním opakovaných měření ( $36.2 \pm 2.01\%$  aktivita v 10. cyklu, Obr 6B). Na základě velmi dobrých výsledků operační stability GSK-3β vázané na MPs byla vyšetřena také skladovací stabilita této kinázy v imobilizované formě. GSK-3β vázaná na MPs zůstává plně aktivní i po 42 dnech skladování při 4°C (Obr 6C).

Po předchozí charakterizaci imobilizovaných kináz a vyšetření jejich stability byly kinázy vázané na SeraMag MPs použity k vlastní fosforylaci tau proteinu. Systém postupné fosforylace tau proteinu jako modelového proteinu kinázami ERK2 a GSK-3β byl vybrán hned z několika důvodů. Změna v aktivitě GSK-3β kinázy je spojována s abnormální fosforylací tau proteinu (Maqbool et al., 2016). Navíc má GSK-3β vyšší afinitu k předfosforylovaným substrátům obsahující motivy SXXXpS (Dajani et al., 2001; Buch et al., 2010) a předfosforylaci substrátu právě například ERK2 kinázou ovlivňuje GSK-3β specificitu pro některé Thr/Ser aminokyseliny v tau molekule (Martin et al., 2013). Na základě těchto informací byl tau protein fosforylován ERK2 vázanou na MPs a následně GSK-3β vázanou na MPs. Fosforylace na konkrétních pozicích T231, S356 a S396 byly potvrzeny Western blotem (data neukázána). Pomocí MS analýzy, které předcházela tau fragmentace, obohacení fosfoproteinů na TiO<sub>2</sub> matici a mikrogradientová separace fosfopeptidů, bylo nalezeno 26 fosfopeptidů, z nichž 20 obsahovalo dvě a více fosforylací (data neukázána). Přesné určení lokalizace fosforylovaných Thr/Ser míst na tau proteinu nyní pokračuje.



**Obrázek 6:** Operační stabilita SeraMag magnetických částic vázaných s (A) GSK-3β a (B) ERK2; skladovací stabilita GSK-3β vázané na SeraMag magnetické částice při 4°C (C). Aktivita kináz měřena na základě fosforylace pro kinázy specifických nízkomolekulárních substrátů a vypočítána dle (Hromadkova et al., 2018) a popsána v sekci 2c Materiál a metodika.

Článek (Hromadkova et al., 2018), jehož hlavní výstupy jsou zde shrnuty, pojednává o prvně popsané a publikované kovalentní imobilizaci ERK2 a GSK-3β kináz, které si zachovávají aktivitu a mohou sloužit jako systém pro opakované reakce. Fosforylace těmito imobilizovanými kinázami byla testována na tau proteinu, který bude sloužit jako rekombinantní fosforylovaný tau protein ve vysoké čistotě pro další metody vyžadující tau protein s přesně popsanými fosforylačními místy.

## 2e. Závěr

Předkládaná práce má jako hlavní cíl základní charakterizaci přirozeně se vyskytujících tau-reaktivních protilátek (nTau-Abs). Tyto protilátky byly úspěšně izolovány ze směsných vzorků plazmy od AD pacientů a zdravých kontrol a také z IVIG preparátu Flebogamma. Při porovnání základních charakteristik izolovaných nTau protilátek u těchto tří skupin byly zjištěny některé rozdíly. K těmto experimentům sloužily různé formy tau proteinu ve smyslu jeho nejvýznamnějších post-translačních modifikací: zkrácení, fosforylace a agregace. Získané výsledky podporují koncept, že nTau-Abs jsou přirozenou součástí humorálního imunitního systému. Práce na tomto projektu i nadále pokračují, abychom mohli potvrdit naši hypotézu, že funkce nTau-Abs je spíše protektivního charakteru, které se podílejí na odstraňování potenciálně škodlivých forem tau proteinu, a že tento systém může být poškozen v případě AN, jak naše výsledky zatím naznačují.

V návaznosti na výše zmíněné jsme také zaváděli a optimalizovali metodu epitopového mapování, která budou sloužit k identifikaci hlavních antigenních struktur jak fyziologických tak i patologicky modifikovaných forem tau proteinu. Prokázali jsme, že pro-agregační a hydrofobní vlastnosti některých peptidových úseků tau proteinu mohou být více patrné po jejich uvolnění během tau fragmentace, která je nezbytnou preanalytickou fází většiny proteomických studií. Především nespecifická sorpce těchto fragmentů úzce související s jejich vlastnostmi může vést k nesprávné interpretaci dat MS analýz. Po neúspěšných pokusech potlačení nespecifické sorpce běžně užívanými metodami jsme navrhli rozrušení klíčové pro-agregační sekvence využitím kombinace dvou imobilizovaných proteáz, která problém nespecifické sorpce vyřešila a pomohla nám získat více relevantní data.

Posledním podprojektem, který je také součástí předkládané práce, je vývoj opakovatelně použitelného systému imobilizovaných kináz pro postupnou *in vitro* tau fosforylací. Cílem je příprava rekombinantních

fosforylovaných tau forem ve vysoké čistotě s definovanými fosforylačními místy pro následné aplikace v senzitivních immunoesejích nejen v rámci projektu s izolovanými nTau-Abs. Je popsána příprava kináz vázaných na magnetické částice jakožto systému s mnoha výhodami. Systém lze opakovaně využívat a tak snížit ekonomické náklady spojené s dostupností rekombinantních kináz v aktivní formě. Dále je vlastní proces fosforylace lépe kontrolovatelný co do výměny k kináz a reaktivního prostředí. V neposlední řadě lze získat produkt o vysoké čistotě bez kontaminace vlastními kinázami. Tento systém imobilizovaných kináz byl následně použit k fosforylaci tau proteinu. I tento projekt nadále pokračuje s velice slibnými výsledky, které budou předmětem dalších publikací na toto téma.

### 3. Abbreviations / Zkratky

aa	amino acid / aminokyselina
AD / AN	Alzheimer's disease / Alzheimerova nemoc
BSA	bovine serum albumin / hovězí sérový albumin
CREB	cAMP response element-binding protein
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ERK2	extracellular signal-regulated kinase
GSK-3 $\beta$	glycogen synthase kinase-3beta
HMW	high-molecular-weight / vysokomolekulární
IgG	immunoglobulin G / imunoglobulin G
IVIG	intravenous immunoglobulins / intravenózní imunoglobuliny
LMW	low-molecular-weight / nízkomolekulární
MP	magnetic particle / magnetická částice
MS	mass spectrometry / hmotnostní spektrometrie
nTau-Abs	natural tau-reactive antibodies / přirozené protilátky reagující s tau proteinem
PEG	polyethylene glycol
PHF	paired helical filament / párový helikální filament
PTM	posttranslational modification / post-translační modifikace
RP-LC	reverse-phase liquid chromatography / kapalínová chromatografie na obrácených fázích
TH24-33	tyrosine hydroxylase 24-33 fragment
ThS	Thioflavine S / Thioflavin S
TPCK	N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone
$\epsilon$ -eIF2B	eukaryotic initiation factor 2B epsilon

#### 4. References / Použitá literatura

1. BARTOS, A., et al. Patients with Alzheimer disease have elevated intrathecal synthesis of antibodies against tau protein and heavy neurofilament. *Journal of Neuroimmunology*, 2012, 252.1: 100-105.
2. BUCH, Idit, et al. Allosteric regulation of glycogen synthase kinase 3 $\beta$ : a theoretical study. *Biochemistry*, 2010, 49.51: 10890-10901.
3. CUMMINGS, J., et al. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2017. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, 2017, 3.3: 367-384.
4. DAJANI, R., et al. Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 $\beta$ : structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition. *Cell*, 2001, 105.6: 721-732.
5. DURANDY, A., et al. Intravenous immunoglobulins—understanding properties and mechanisms. *Clinical & Experimental Immunology*, 2009, 158.s1: 2-13.
6. FIALOVA, L., et al. Increased intrathecal high-avidity anti-tau antibodies in patients with multiple sclerosis. *PLoS One*, 2011, 6.11: e27476.
7. FRENCH, M. A.; HARRISON, G. Serum IgG subclass concentrations in healthy adults: a study using monoclonal antisera. *Clinical & Experimental Immunology*, 1984, 56.2: 473.
8. FRIEDHOFF, P., et al. Rapid assembly of Alzheimer-like paired helical filaments from microtubule-associated protein tau monitored by fluorescence in solution. *Biochemistry*, 1998, 37.28: 10223-10230.
9. GAMBLIN, T. C. Potential structure/function relationships of predicted secondary structural elements of tau. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2005, 1739.2-3: 140-149.
10. GONG, C.-X., et al. Dysregulation of protein phosphorylation/dephosphorylation in Alzheimer's disease: a therapeutic target. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2006, 1-11.
11. HERMANSON, G. T. *Bioconjugate Techniques*. Academic press, 2013.
12. HROMADKOVA, L., et al. Identification and characterization of natural antibodies against tau protein in an intravenous immunoglobulin product. *Journal of Neuroimmunology*, 2015, 289: 121-129.
13. HROMADKOVA, L., et al. Difficulties associated with the structural analysis of proteins susceptible to form aggregates: The case of Tau protein as a biomarker of Alzheimer's disease. *Journal of Separation Science*, 2016, 39.4: 799-807.



14. HROMADKOVA, L., et al. Kinase-loaded magnetic beads for sequential in vitro phosphorylation of peptides and proteins. *Analyst*, 2018, 143.2: 466-474.
15. JANKOVICOVA, B., et al. Epitope mapping of allergen ovalbumin using biofunctionalized magnetic beads packed in microfluidic channels: The first step towards epitope-based vaccines. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1206.1: 64-71.
16. JANKOVICOVA, B.a, et al. Quality evaluation of monoclonal antibodies suitable for immunomagnetic purification of native tau protein. *Scientific Papers of the University of Pardubice Series A, Faculty of Chemical Technology*, 2014, 20: 147-163.
17. KLAVER, A. C., et al. Specific serum antibody binding to phosphorylated and non-phosphorylated tau in non-cognitively impaired, mildly cognitively impaired, and Alzheimer's disease subjects: an exploratory study. *Translational Neurodegeneration*, 2017, 6.1: 32.
18. KRESTOVA, M., et al. Characterization of isolated tau-reactive antibodies from the IVIG product, plasma of patients with Alzheimer's disease and cognitively normal individuals. *Journal of Neuroimmunology*, 2017, 313: 16-24. **a**
19. KRESTOVA, M.; HROMADKOVA, L.; RICNY, J. Purification of Natural Antibodies against Tau Protein by Affinity Chromatography. *Natural Antibodies: Methods and Protocols*, 2017, 33-44. **b**
20. KUCEROVA, J., et al. PEGylation of magnetic poly (glycidyl methacrylate) microparticles for microfluidic bioassays. *Materials Science and Engineering: C*, 2014, 40: 308-315.
21. KUHN, I., et al. Serum titers of autoantibodies against  $\alpha$ -synuclein and tau in child-and adulthood. *Journal of Neuroimmunology*, 2018, 315: 33-39.
22. LOEFFLER, D. A.; KLAVER, A. C.; COFFEY, M. P. ELISA measurement of specific antibodies to phosphorylated tau in intravenous immunoglobulin products. *International Immunopharmacology*, 2015, 28.2: 1108-1112.
23. MAQBOOL, M.; MOBASHIR, M.; HODA, N. Pivotal role of glycogen synthase kinase-3: A therapeutic target for Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2016, 107: 63-81.
24. MARTIN, L., et al. Tau protein kinases: involvement in Alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews*, 2013, 12.1: 289-309.
25. PANDA, S.; DING, J. L. Natural antibodies bridge innate and adaptive immunity. *The Journal of Immunology*, 2015, 194.1: 13-20.

26. RELKIN, N. Clinical trials of intravenous immunoglobulin for Alzheimer's disease. *Journal of Clinical Immunology*, 2014, 34.1: 74-79.
27. ROSENMANN, H., et al. Detection of circulating antibodies against tau protein in its unphosphorylated and in its neurofibrillary tangles-related phosphorylated state in Alzheimer's disease and healthy subjects. *Neuroscience Letters*, 2006, 410.2: 90-93.
28. SCHWEERS, O., et al. Structural studies of tau protein and Alzheimer paired helical filaments show no evidence for beta-structure. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269.39: 24290-24297.
29. SKRABANA, R.; SEVCIK, J.; NOVAK, M. Intrinsically disordered proteins in the neurodegenerative processes: formation of tau protein paired helical filaments and their analysis. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2006, 26.7-8: 1083-1095.
30. SKVARIL, F., et al. Distribution of IgG subclasses in commercial and some experimental  $\gamma$ -globulin preparations. *Vox Sanguinis*, 1977, 32: 335-338.
31. SMITH, L. M., et al. Intravenous immunoglobulin products contain specific antibodies to recombinant human tau protein. *International Immunopharmacology*, 2013, 16.4: 424-428.
32. SMITH, L. M.; COFFEY, M. P.; LOEFFLER, D. A. Specific binding of intravenous immunoglobulin products to tau peptide fragments. *International Immunopharmacology*, 2014, 21.2: 279-282.
33. SVOBODOVA, Z., et al. Dot-ELISA Affinity Test: An Easy, Low-Cost Method to Estimate Binding Activity of Monoclonal Antibodies. *J Anal Bioanal Tech*, 2013, 4.168: 2.
34. VIDARSSON, Gestur; DEKKERS, Gillian; RISPENS, Theo. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Frontiers in Immunology*, 2014, 5: 520.
35. WANG, J.-Z., et al. Abnormal hyperphosphorylation of tau: sites, regulation, and molecular mechanism of neurofibrillary degeneration. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2013, 33.s1: S123-S139.
36. ZIVKOVIC, S. Intravenous immunoglobulin in the treatment of neurologic disorders. *Acta Neurologica Scandinavica*, 2016, 133.2: 84-96.

## 5. Curriculum vitae

### Mgr. Lenka Hromadkova

Address: Bezrucova 97, 533 54 Rybitvi, Czech Republic

Telephone: +420 775 104 290

E-mail: lenka.hromadkova@nudz.cz

### Education

- **2012 - ...: PhD level:** Charles University in Prague, Albertov 6, 128 43 Praha 2, Faculty of Science, Program: Animal physiology  
Theme of Doctoral Thesis: Tau protein, a biomarker of Alzheimer's disease: *in vitro* phosphorylation and tau-reactive antibodies characterization.
- **2010 – 2012: Master Degree:** University of Pardubice, Studentska 573, 532 10 Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Program: Analysis of Biological Materials (*passed with honours*)  
Theme of Diploma Thesis: Effect of Separation Methods on the Functional Properties of Peripheral Blood Granulocytes (*received the Award of Dean of Faculty of Chemical Technology*)
- **2007 – 2010: Bachelor Degree:** University of Pardubice, Studentska 573, 532 10 Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Program: Clinical Biology and Chemistry (*passed with honours*)

### Work experience

- **2012 - ....:** Prague Psychiatric Center (Ustavni 91, 181 03 Praha 8 - Bohnice, CZ), National Institute of Mental Health (Topolová 748, 250 67 Klecany) - PhD student and junior researcher, humoral immunity within neurodegenerative diseases, especially Alzheimer's disease, tau pathology.
- **2010 – 2012:** University of Defence, Faculty of Military Health Sciences, Trebesska 1575, 500 01 Hradec Kralove  
Department of Radiobiology, supervisor: doc. MVDr. Zuzana Sinkorova, Ph.D., work on phagocytosis of neutrophils, flow cytometry and cell sorter.

### Courses and certificates

- **2017:** Processing and analysis of microscopic images in biomedicine, the five-day theoretical course with demonstrations and practical exercises (certificate of course completion)

- **2015:** Certificate of professional competence to design experiments and experimental projects under Section 15d (3) of Act No 246/1992 Coll., on the Protection of Animals against Cruelty, as amended (certificate)
- **2014:** First Certificate of English – B2 level (certificate)
- **2014:** School of Molecular Biotechnology – Medical Nanotechnologies: Regulated and Functional Peptides and Proteins for Tissue Engineering (certificate of course completion)
- **2013:** Course of Cell and Molecular Immunology (certificate of course completion)
- **2013:** Course of Statistical methods - software STATISTICA (certificate of course completion)
- **2010:** School of Molecular Biotechnology Profession, theoretical part (5 days) and Practical part (20 days) hold by CONTIPRO Holding (certificate of course completion)

## **Others**

### **Language Proficiency:**

- Czech language: native speaker
- English language: intermediate level (FCE certificate)
- German language: basic level
- Swedish language: basic level

### **Membership:**

- International Society of Neuroimmunology (ISNI)
- Czech Immunological Society (CIS)
- Czech Medical Association of J.E.P.: Czech Neurological Association

### **Fellowships:**

- **2014/1:** Karolinska Institutet (Stockholm, Sweden) - Project DataLab
- **2015/1-6:** Karolinska Institutet (Stockholm, Sweden) - EFIS Short term fellowship
- **2016/3-6:** Karolinska Institutet (Stockholm, Sweden) - Boehringer Ingelheim Fonds
- **2018/3 -...:** Karolinska Institutet (Stockholm, Sweden) - AVASTipendium for human brain from Alzheimer foundation fund

## 6. List of publications / Seznam publikací

### A. Publications in extenso included as a part of the thesis / Publikace in extenso, které jsou podkladem disertace

#### 1) with impact factor / s impakt faktorem

**Hromadkova, L.**, Kupcik, R., Jankovicova, B., Rousar, T., Ripova, D., Bilkova, Z. (2016). Difficulties associated with the structural analysis of proteins susceptible to form aggregates: The case of Tau protein as a biomarker of Alzheimer's disease. *Journal of Separation Science*, 39(4), 799-807.  
(IF in 2016: 2.557)

**Hromadkova, L.**, Kolarova, M., Jankovicova, B., Bartos, A., Ricny, J., Bilkova, Z., Ripova, D. (2015). Identification and characterization of natural antibodies against tau protein in an intravenous immunoglobulin product. *Journal of Neuroimmunology*, 289, 121-129.  
(IF in 2015: 2.536)

Krestova, M., **Hromadkova, L.**, Bilkova, Z., Bartos, A., Ricny, J. (2017). Characterization of isolated tau-reactive antibodies from the IVIG product, plasma of patients with Alzheimer's disease and cognitively normal individuals. *Journal of Neuroimmunology*, 313, 16-24.  
(IF in 2016: 2.720)

**Hromadkova, L.**, Kupcik, R., Vajrychova, M., Prikryl, P., Charvatova, A., Jankovicova, B., Ripova, D., Bilkova, Z., Slovakova, M. (2018). Kinase-loaded magnetic beads for sequential in vitro phosphorylation of peptides and proteins. *Analyst*, 143(2), 466-474.  
(IF in 2016: 3.885)

2) without impact factor (not included in the thesis) / bez impakt faktoru (v práci nejsou zahrnuty)

Jankovičová, B., **Hromádková, L.**, Kupčík, R., Kašparová, J., Řípková, D., Bilková, Z. (2014). Quality evaluation of monoclonal antibodies suitable for immunomagnetic purification of native tau protein. *Scientific Papers of the University of Pardubice S. A, Faculty of Chemical Technology*, 20, 147-163.

Jankovicova, B., Svobodova, Z., **Hromadkova, L.**, Kupcik, R., Ripova, D., Bilkova, Z. (2015). Benefits of Immunomagnetic Separation for Epitope Identification in Clinically Important Protein Antigens: A Case Study Using Ovalbumin, Carbonic Anhydrase I and Tau Protein. *Universal Journal of Biomedical Engineering*, 3, 1-8.

Krestova, M., **Hromadkova, L.**, Rícný, J. (2017). Purification of Natural Antibodies against Tau Protein by Affinity Chromatography. *Natural Antibodies: Methods and Protocols*, 33-44. (chapter in book)

**B. Publications not related to the thesis / Publikace bez vztahu k tématu disertační práce**

1) with impact factor / s impakt faktorem

Schedin-Weiss, S., Inoue, M., **Hromadkova, L.**, Teranishi, Y., Yamamoto, N. G., Wiehager, B., Bogdanovic, N., Winblad, B., Sandebring-Matton, A., Frykman, S., Tjernberg, L. O. (2017). Monoamine oxidase B is elevated in Alzheimer disease neurons, is associated with  $\gamma$ -secretase and regulates neuronal amyloid  $\beta$ -peptide levels. *Alzheimer's Research & Therapy*, 9(1), 57. (IF in 2016: **6.154**)

**Hromadkova, L.**, Zarybnicka, L., Vavrova, J., Bilkova, Z., & Sinkorova, Z. (2014). The impact of pre-analytical treatment and sorting on human neutrophil function. *Veterinární Medicína*, 59(11). (IF in 2014: **0.639**)