

Oponentský posudek doktorské dizertační práce Mgr. Lenky Hromádkové

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.

Školitelé:

Školitelka: RNDr. Daniela Řípová, CSc. (vedoucí práce od roku 2012 do roku 2016)

Školitelka: Prof. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D. (vedoucí práce od roku 2016 do roku 2018)

Školitel-konzultant: doc. MUDr. Aleš Bartoš, Ph.D.

Mgr. Lenka Hromádková se ve své doktorské dizertační práci s názvem **Tau protein, biomarker Alzheimerovy choroby: *in vitro* fosforylace a charakterizace tau reaktivních protilátek** zabývá velice aktuálním a přínosným tématem zejména s ohledem na možnost imunoterapie Alzheimerovy choroby cílené na tau protein.

Dizertační práce Mgr. Lenky Hromádkové o celkovém rozsahu 112 stran je psána v anglickém jazyce. Kromě nezbytného abstraktu v anglickém a českém jazyce zahrnuje literární přehled současných znalostí vztahující se k tématu dizertační práce, výsledky vlastního výzkumu ve formě publikací *in extenso*, diskusi a závěr. Seznam literatury obsahuje nadstandardní počet 347 publikací.

Teoretický úvod dizertační práce je rozčleněn na pět kapitol rozpracovaných na 28 stránkách. V první kapitole jsou podány základní informace o Alzheimerově chorobě zaměřené na současné znalosti o patogenezi onemocnění. V dalších čtyřech kapitolách je podrobně podána problematika vztahující se k tau proteinu, který je intenzivně zkoumaný v různých souvislostech s Alzheimerovou chorobou. Autorka zmiňuje vlastnosti, strukturu a izoformy tau proteinu, jeho distribuci a funkci za fyziologických podmínek. Uvádí různé možnosti posttranslačních modifikací tau proteinu. Mimořádnou pozornost autorka věnovala fosforylaci tau proteinu. Její abnormální průběh je podkladem vzniku neurofibrilárních, intracelulárně uložených smotků, jejichž přítomnost představuje histopatologický nález typický pro Alzheimerovu chorobu. Detailně jsou popsány četné enzymy, které proces fosforylace podmiňují. Další významná kapitola teoretického úvodu je zaměřena na přirozeně se vyskytující protilátky proti tau-proteinu. Teoretický úvod je zpracován pečlivě, srozumitelně, má logickou strukturu a podává komplexní informaci k problematice řešené ve výzkumné části.

Cílem dizertační práce Mgr. Lenky Hromádkové bylo charakterizovat protilátky proti-tau proteinu přítomné jednak ve vzorcích plazmy zdravých osob a pacientů s Alzheimerovou chorobou a dále v preparátech koncentrovaných lidských imunoglobulinů určených pro i. v. aplikaci. Další cíl byl zaměřen na přípravu tau proteinu fosforylovaného na specifických místech molekuly pro jeho použití v imunoanalytických metodách testujících vlastnosti a účinky přirozeně se vyskytujících protilátek proti tau-proteinu. Splnění vytýčených cílů autorka provedla v několika fázích, které zahrnovaly izolaci tau-reaktivních protilátek z výše uvedených zdrojů, nespecifickou sorpci fragmentu tau proteinu obsahující pro-agregační motiv a hydrofobní oblast a přípravu magnetických částic s navázanými kinázami umožňující postupnou fosforylaci tau proteinu *in vitro*.

Experimentální část je v dizertační práci prezentována ve formě čtyř publikací v impaktovaných časopisech s celkovou hodnotou impakt faktoru 11,71. Ve třech z těchto prací je autorka uvedena jako první autor, ve čtvrté publikace je druhou autorkou. Pro všechny prezentované studie autorka prováděla experimenty. Publikace, v nichž je uvedena jako první autorka, sepsala a navrhla uspořádání pokusů.

Práce přinesla celou řadu hodnotných výsledků. Při analýze profilu jednotlivých podtříd IgG anti-tau protilátek byly zjištěny rozdíly v testovaných biologických materiálech a rovněž reaktivita a avidita protilátek proti různým rekombinantním formám i nativnímu tau proteinu vykazovala odlišnosti. Autorka optimalizovala metodu epitopového mapování s tau proteinem, nezbytnou pro identifikaci významných antigenních struktur přítomných v tau proteinech. Vypracovala a otestovala systém využívající dvou kináz vázaných na magnetické částice pro opakovanou přípravu rekombinantního fosforylovaného tau proteinu využitelného pro další experimenty. Je třeba vyzdvihnout použití širokého spektra základních i pokročilých biochemických metod a schopnost autorky správně je vyhodnotit a interpretovat.

Výsledky experimentální části jsou adekvátním způsobem diskutovány jednak v jednotlivých publikacích a jednak v rozsáhlé diskusi zařazené na konci dizertace, kde autorka prokazuje hlubokou znalost řešené problematiky.

Závěr:

Doktorská dizertace Mgr. Lenky Hromádkové se zaměřila na aktuální téma s možnou klinickou aplikací. Dosažené výsledky rozšiřují naše poznatky o přirozeně se vyskytujících anti-tau protilátkách, které by mohly mít protektivní účinky a účastnit se na odstraňování potenciálně škodlivých forem tau proteinu. Pro další zkoumání antigenních struktur různých

forem tau proteinu je cenné zavedení metody epitopového mapování a vyvinutí systému pro přípravu fosforylovaného tau proteinu.

Doktorská dizertační práce Mgr. Lenky Hromádkové obsahuje nové originální poznatky, publikované v impaktovaných časopisech. Autorka prokázala schopnost samostatné vědecké práce. Předložená práce splňuje požadavky kladené na doktorskou dizertaci. Doporučuji, aby Mgr. Lence Hromádkové byl na základě úspěšné obhajoby doktorské dizertační práce udělen titul Ph.D.

Otázky k obhajobě:

1. Jaký je současný stav imunoterapie u Alzheimerovy choroby a terapie zaměřené na tau protein?
2. Který z výsledků Vaší dizertace by mohl mít přímé využití v souvislosti s imunoterapií Alzheimerovy choroby?
3. Které další autoprotilátky jsou popisovány u Alzheimerovy choroby?

V Praze dne 12. 7. 2018

MUDr. Lenka Fialová, CSc.

Ústav lékařské biochemie a
laboratorní diagnostiky 1. lékařské
fakulty a Všeobecné fakultní
nemocnice v Praze