

POSUDEK ŠKOLITELE NA DISERTAČNÍ PRÁCI

Název disertační práce: Tau protein and its variants in diagnostic of Alzheimer disease

Školitel: RNDr. Jan Říčný, CSc., Oddělení experimentální neurobiologie, NUDZ, Klecany

Studentka: Mgr. Michala Krestová (Kolářová)

Bakalářský titul (Bc) získala na Přírodovědecké fakultě Univerzity Jana Evangelisty Purkyně v Ústí nad Labem, (obor: Toxikologie a analýza škodlivin, 2006-2009) V r. 2009 nastoupila do magisterského studia na Přírodovědeckou fakultu Univerzity Karlovy v Praze (obor: Klinická a toxikologická analýza). Diplomovou práci (Úloha tau proteinu a jeho variant v Alzheimerově chorobě) vypracovala v Psychiatrickém centru Praha a v r. 2011 obhájila titul Mgr. V postgraduálním studiu toto téma dále rozvíjela v Psychiatrickém centru Praha i po přestěhování pracoviště v Národním ústavu duševního zdraví.

Alzheimerova choroba (AD) je nejrozšířenější formou neurodemence (50-60%), která především v rozvinutých zemích představuje značný medicínský i socioekonomický problém. K rozvoji nemoci vede komplexní řetěz změn, jehož výsledkem je synaptická dysfunkce a ztráta neuronů a nervových spojení (především cholinergních), jež má za následek psychické projevy, počínající ztrátou epizodické paměti a ústící v závažnou ztrátu vyšších nervových funkcí.

Chorobu provázejí dva význačné morfologické nálezy v mozkové tkáni: extracelulární amyloidní plaky (složené především z nerozpustného amyloidu beta ($A\beta$) a intraneuronální neurofibrilární klubíčka, obsahující nerozpustný tau protein (τ). Tau je protein asociovaný s mikrotubuly, hrající patrně roli v jejich stabilizaci a vyskytující se normálně především v axonech. Během rozvoje AD se stává abnormálně vysoce fosforylovaným a agreguje za vzniku nerozpustných filamentů. Role, kterou hraje v patogenezi AD (stejně jako role dalšího důležitého symptomatického průvodce nemoci – $A\beta$) není zatím příliš jasná a je v současnosti předmětem intenzivního zkoumání a kontroverzních diskusí.

Disertační práce Mgr. Michaly Krestové s názvem “Tau protein and its variants in diagnostic of Alzheimer disease“ je zaměřena na dva hlavní problémy:

1) úloha proteinu τ , především jeho různých (m.j. potenciálně patologických forem) na vzniku a progresi AD. Pro tento úkol si Mgr. Krestová připravila pomocí genové manipulace, vnesení plasmidů do kompetentních kmenů E.coli a biochemických purifikačních metod několik forem τ proteinu (ve spolupráci s Prof. Francisco Garcia-Sierra, Natl Polytech Inst CINVESTAV, Ctr Res & Adv Studies, Dept Cell Biol, Mexico City, Mexico a RNDr. Kateřina Hofbauerová, PhD, Mikrobiologický ústav AVČR). Významné zkušenosti a řadu cenných kontaktů získal Mgr. Krestová během šesti měsíční stáže ve Spojených státech amerických na pracovišti profesora

Rakeze Kayeda, Ph.D. (Department of Neurology, Mitchell Center for Neurodegenerative diseases, University of Texas Medical Branch, USA). Hlavním projektem bylo stanovení rozpustných oligomerů τ proteinu v krevním séru jako případného biomarkeru Alzheimerovy nemoci a tento úkol rozvíjela i v NUDZu (především se vzorky krevního séra a mozkomíšních moků, poskytnutých doc. Bartošem).

2) úloha specifických protilátek proti proteinu τ u pacientů s AD. V nervovém systému dochází k výrazné interakci mezi neurony, gliovými buňkami, cerebrospinální tekutinou a proteinem τ , který v případě pacientů s AD vykazuje jak kvalitativní, tak kvantitativní změny. τ protein byl dlouho považován za intracelulární protein s více funkcemi uvnitř buněk. V poslední době se objevily důkazy sekrece τ do extracelulárního prostoru. Během AD patologie je τ a jeho patologické formy uvolňován do extracelulárního prostoru v mozku a v důsledku toho se může objevit v mozkomíšním moku a krvi. Takto extracelulárně vyloučený τ je pravděpodobně dále modifikován zkrácením a dalšími post-translačními modifikacemi a může být rozpoznán imunitním systémem jako toxický antigen. Byly publikovány zprávy o přítomnosti autoprotiátek proti neuronovým i non-neuronálním antigenům v séru pacientů s AD. Zůstává otázkou, zda funkce přirozených autoprotiátek u AD je ochranným mechanismem nebo přispívá k patologii. Přirozeně se vyskytující intravenózní imunoglobuliny proti řadě „self-proteinů“ se nacházejí také u zdravých subjektů. Tyto autoprotiátky by mohly být využity jako biomakery neuronálních degenerací, nebo jako terapeutický prostředek.

Všechny tyto aspekty jsou zpracovány v autorčině disertaci, navazující na její diplomovou práci. Práce je psána anglicky, srozumitelně, na vysoké gramatické úrovni. Je přehledně členěna do standardních sekcí (Summary, Introduction, Aim of the Thesis, Material and Methods, Results, Discussion, References). Je doplněna řadou grafů, ilustrací a tabulek. Rozsah bez literatury je 73 stran. Je podložena důkladnou a rozsáhlou literární rešerší; v experimentální části je použita řada moderních metodických přístupů; které byly zvládnuty na profesionální úrovni. Autorka pečlivě své metodiky optimalizovala a řadu z nich sama vyvinula. Doktorandka dosáhla výsledků samostatně, její nálezy mohou přispět jak k objasnění některých aspektů patologie proteinu τ , tak k použití nových terapeutických přístupů. Tyto výsledky byly publikovány časopisecky v recenzovaných časopisech, autorka napsala samostatnou knižní kapitolu (tyto publikace jsou přiloženy k disertaci jako pdf doplňky) a zúčastnila se aktivně řady českých i mezinárodních vědeckých konferencí. Další publikace jsou připravovány k zaslání do časopisů.

Během celého studia dosahuje výborných studijních výsledků, je aktivní, účastní se některých nadstandardních kurzů. Je velmi iniciativní a sama vyhledává možnosti získání různých stipendií a podpor pro účast na zahraničních konferencích. O vědeckou práci má nadobyčejný zájem, v laboratoři je precizní, výkonná, vyhledává moderní metody a postupy, své povinnosti plní vždy dobře a včas. Prokázala, že je kooperativní a velmi efektivně se začleňuje do spolupráce jak se svými studentskými kolegy, tak se staršími a zkušenějšími vědeckými pracovníky. K řešení úkolu přistupuje po důkladné přípravě, prostudování literatury a snaží se porozumět nastolenému problému. Podílí se na řešení několika grantových projektů (Projekt Excellence v oblasti neurověd (GBP304/12/G069); Tau v patologii centrálního nervového systému: neurotoxická a autoimunní komponenta (GA13-26601S)).

Aktivní účast studentky na konferencích:

FENS, 2012, Barcelona, Španělsko (Similar low levels of serum antibodies against human and bovine tau proteins in patients with Alzheimer disease)

AD-PD, 2013, Florencie, Itálie (Comparison levels of serum antibodies against different type of tau proteins at patients with Alzheimer disease and normal controls)

FENS, 2013, Praha, Česká Republika (Levels of serum antibodies against 5 types of human tau protein in patients with Alzheimer disease, Multiple sclerosis and in normal control)

18th Annual Forum on Aging, 2014, Galveston, USA (Naturally Occurring anti-Tau Antibodies isolated from IVIG and their basic characterization)

AAIC, 2014, Kodaň, Dánsko (Sex differences in antibody levels in Alzheimer's Disease)

AD-PD, 2015, Nice, Francie (Specific antibodies against tau protein).

FENS, 2016, Kodaň, Dánsko (Detection of tau oligomers in human serum)

AAIC, 2016, Toronto, Kanada (Occurrence of tau oligomers in serum of cognitively normal individuals)

AD-PD, 2017, Vídeň, Rakousko (Comparison of reactivity profile of anti-tau antibodies present in the blood of Alzheimer's patients and cognitively normal subjects)

Publikace v recenzovaných časopisech:

Kolarova M., Sengupta U., Bartos A., Ricny J., Kaye R., 2017. Tau oligomers in sera of patients with Alzheimer's disease and aged controls. *J Alzheimers Dis JAD*.

IF= 3.920

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. *J. Neuroimmunol.* 289, 121–129. **Both authors contributed equally.*

IF= 2.756

Kristofikova, Z., Ricny, J., **Kolarova, M.**, Vyhnalek, M., Hort, J., Laczo, J., Sirova, J., Ripova, D., 2014. Interactions between Amyloid- β and Tau in Cerebrospinal Fluid of People with Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 42, S91–S98.

IF= 4.151

Krestova, M., Hromadkova, L., Bilkova, Z., Bartos, A., Ricny, J., under review. Characterization of isolated tau-reactive antibodies from the IVIG product, plasma of patients with Alzheimer's disease and cognitively normal individuals. *J. Neuroimmunol.*

Krestova, M., Hromadkova, L., Ricny, J., 2017. Purification of natural antibodies against tau protein by affinity chromatography. In: *Natural Antibodies, Methods in Molecular Biology*. Humana Press, p. VIII, 324.

Kolarova, M., García-Sierra, F., Bartos, A., Ricny, J., Ripova, D., 2012. Structure and pathology of tau protein in Alzheimer disease. *Int. J. Alzheimers Dis.* 2012, 731526

Studentka pracovala na své disertaci iniciativně a samostatně a svojí disertací prokázala schopnost samostatně tvůrčí vědecké práce. Její původní výsledky rozšiřují a obohacují jak oblast teoretickou, tak i oblast praktickou. Disertační práci doporučuji k obhajobě.

Dizertační práce byla vypracována pod vedením školitele (RNDr. Jan Říčný, CSc., Oddělení experimentální neurobiologie, NUDZ) a školitele-konzultanta (doc. MUDr. Aleš Bartoš, PhD, AD centrum, NUDZ).

V Praze, 10.5.2017



RNDr. Jan Říčný, CSc.
Národní ústav duševního zdraví
Topolová 748
250 67 Klecany
e-mail: jan.ricny@nudz.cz
