

Oponentský posudek na dizertační práci Mgr. Michaely Krestové „Tau protein a jeho varianty v diagnostice Alzheimerovy nemoci“.

Dizertační práce Mgr. Michaely Krestové se zabývá vysoce relevantní, intenzivně studovanou avšak stále málo objasněnou problematikou metabolismu sekretovaného tau proteinu a tau autoprotilátek v patogenezi Alzheimerovy nemoci (AN). Práce si klade dva základní cíle: **1) charakterizovat reaktivitu autoprotilátek proti různým formám proteinu tau v závislosti na stádiu AN a 2) charakterizovat přítomnost a hladiny různých forem proteinu tau v séru a mozkomíšním moku jakožto možných biomarkerů AN.** Původní hypotéza předpokládala zvýšení hladiny tau oligomerů a autoprotilátek u pacientů s AN.

Práce vznikala v Národním ústavu duševního zdraví v oddělení Experimentální neurobiologie pod vedením RNDr. Jana Říčního a s odborným školitelem doc. MUDr. Alešem Bartošem, Ph.D. Toto oddělení se dlouhodobě v zaměřuje na výzkum nových biomarkerů AN v tělních tekutinách – především cerebrosinálním moku a séru. Kandidátka tak měla ideální prostředí pro dosažení svých vytčených cílů.

Během studia byla Mgr. Krestová úspěšná v publikační činnosti - publikovala **4 publikace v impaktovaných časopisech vztahující se k tématu dizertační práce z toho 3 jako první autor a 2 práce v neimpaktovaných časopisech.**

Co se týká formální stránky, dizertační práce je psaná v angličtině a je klasicky členěna na abstrakt (česky a anglicky), obsah, zkratky, úvod (11 stránek), cíle, materiál a metody (12 stránek), výsledky (29 stránek), diskuzi (10 stránek), reference (19 stránek) a seznam publikací. **Rozsah práce je přiměřený, odpovídající charakteru dizertační práce a významu jednotlivých částí.**

Práce je relativně dobře napsána, mám jen několik výhrad. Především si myslím, že úvodu, jinak dobře napsanému a logicky strukturovanému, by prospěla grafická část – přítomnost tau variant a jejich specifických modifikací, obzvláště těch, které jsou zmiňovány dále v textu, si přímo říká o grafické zpracování, které by jistě usnadnilo pochopení problematiky i širšímu spektru čtenářů. Zároveň některé aspekty tau metabolismu, které jsou následně rozváděny v sekci výsledků (např. problematika tau-Amyloid β komplexů), nejsou v úvodu představeny. Cíle práce jsou jasně formulovány a logicky na sebe navazují. Materiál a metody jsou detailně zpracovány, oceňuji správnou volbu parametrických a neparametrických testů

s ohledem na normalitu naměřených dat. Výsledky a diskuze jsou dobře zpracovány, ocenil bych však přítomnost dílčích závěrů a shrnutí v jednotlivých kapitolách výsledkové sekce. Ty jsou sice přítomny v diskusi, což je formálně správně, avšak absence dílčích shrnutí a závěrů snižuje čtivost výsledkové části. Závěry střízlivě zhodnocují získané výsledky a reflektují komplexnost problematiky tau metabolismu. **Přes drobné výhrady považuji práci po formální stránce za zdařilou a dobře napsanou.**

Po technické stránce Mgr. Krestová zvládla významné množství biochemických či molekulárně biologických metod jako přípravu polyklonálních protilátek, izolaci tau-reaktivních autoprotiátek, syntézu a purifikaci různých forem proteinu tau, ELISA assay, imunoblot a další. I když se jedná spíše o klasické metody, jejich úspěšné použití pro detekci velmi malých množství proteinu tau v CSF není rutinní záležitostí a je nutné jej dlouhodobě optimalizovat.

Po výsledkové stránce hodnotím práci též jako zdařilou, Mgr. Krestové se podařilo s nově připravenými reagensy charakterizovat specifitu tau autoprotiátek v plasmě u zdravých jedinců v přípravku imunoglobulinové terapie Flebogamma, dále v sérech pacientů s AN a u kontrolních starších jedinců. Dále Mgr. Krestová analyzovala hladiny tau oligomerů u různých skupin AN pacientů. Získaná data demonstrují zvýšení hladiny tau-reaktivních protilátek a snížení hladiny tau oligomerů v séru pacientů s mírnou kognitivní poruchou (MKP) což ukazuje na roli imunitního systému při obraně proti zvyšující se koncentraci toxických forem tau proteinu. Práci by bylo možné vytknout, že je v této fázi víceméně popisná a nezabývá se mechanismy, které indukují patologické změny hladin tau oligomerů a reaktivních autoprotiátek. Zajímavá by například mohla být komparativní analýza tělních tekutin AN pacientů a specifických, geneticky definovaných zvířecích modelů AN či jiných tauopatií. Výsledky práce, obzvláště při analýze tau oligomerů v CSF u skupiny AN pacientů nejsou zcela v souladu s již publikovanými daty, což by mohlo být též více diskutováno. Je však třeba říci, že konsensus co se týká metabolismu tau oligomerů a změn jejich hladin v průběhu AN zatím neexistuje. I z tohoto důvodu si myslím, že předkládaná práce má jakožto unikátní analýza lidských vzorků AN nesporný přínos pro výzkum tohoto onemocnění, přispívá k pochopení patologických mechanismů AN a lze předpokládat, že navazující výzkum bude její výsledky dále rozvíjet. **Celkově považuji jak metodickou a odbornou úroveň práce za zdařilou a splňující kritéria pro dizertační práci, již tak doporučuji přijmout k obhajobě a jako podklad k udělení doktorského titulu.**

Doplňující otázky:

- 1) Výsledky studie sice ukazují významné snížení tau oligomerů v séru u skupiny pacientů s MKP, avšak u skupiny pacientů s AN jsou výsledky významně zvýšené jen při analýze imunoblotem (při použití ELISA assaye nikoli). Jak vysvětlujete tento rozdíl? Proč nebyly do imunoblotové analýzy zahrnuty i vzorky s MKP?
- 2) Jaká je hladina tau oligomerů u pacientů s MKP v porovnání se séry mladých zdravých jedinců? Je oproti nim stále zvýšená, nebo pokles hladiny u MKP vyrovná zvýšení hladiny tau oligomerů spojené se stárnutím.
- 3) Rozložení podtříd IgG v testovaných sérech naznačuje, že snížení IgG3 u nTau-Ctrl a nTau-AD je spojené spíše s procesem stárnutí než s patogenezí AN. Jak vysvětlujete zvýšení IgG4 (normálně zvýšené po chronické stimulaci antigenem) jen u nTau-Ctrl a ne u nTau-AD, kde jste, minimálně pomocí imunoblotu, detekovali zvýšení tau oligomerů v séru.
- 4) V sérech pacientů s MKP bylo detekováno zvýšené množství tau-reaktivních autoantilátok. Byla analyzována jejich reaktivita s LMW či HMW tau?

V Praze dne

Martin Balašík, Ph.D.