

Oponentský posudek doktorské dizertační práce Mgr. Michaly Krestové

**Tau protein and its variants in the diagnosis of Alzheimer's disease**

Tau protein a jeho varianty v diagnostice Alzheimerovy nemoci

**Vedoucí práce: RNDr. Jan Říčný, CSc.**

**Konzultant: doc. MUDr. Aleš Bartoš, Ph.D.**

Téma dizertační práce Mgr. Michaly Krestové Tau protein a jeho varianty v diagnostice Alzheimerovy nemoci (AN) je vysoce aktuální a potřebné.

Dizertační práce psaná v anglickém jazyce o celkovém rozsahu 92 stran je doplněna 6 tabulkami a 24 barevnými nebo černobílými obrázky. Rozsáhlý nečíslovaný seznam literatury uvedený na téměř 19 stránkách zahrnuje práce staršího data i zcela recentní publikace. Přiložen je seznam prací autorky vztahující se k tématu dizertační práce, které byly publikovány v impaktovaných i neimpaktovaných časopisech.

Dizertační práce je rozčleněna na pět hlavních kapitol. V úvodní teoreticky zaměřené kapitole zpracované na 11 stranách autorka podává přehled současných poznatků o struktuře a fyziologické funkci tau proteinu. Podrobně jsou zmiňovány post-translační modifikace tau proteinu, které mohou být spojené s jeho patologickým působením u AN. Upozorňuje na extracelulární tau protein a jeho souvislost s neurodegenerativními změnami. Samostatná podkapitola je věnována autoimunitním aspektům AN, včetně autoprotilátek proti tau proteinu. Poznátka v teoretickém přehledu jsou prezentovány srozumitelnou formou a jsou logicky uspořádány.

Jako cíl experimentální práce si Mgr. Michala Krestová vytýčila charakterizovat reaktivitu přirozeně se vyskytujících protilátek proti různým formám tau proteinu ve vztahu k rozvoji AN a vyhodnotit hladiny modifikovaných forem tau proteinu v různých biologických tekutinách jako potenciální biomarkery. Splnění uvedených cílů předpokládalo několik samostatných experimentálních kroků jako je příprava různých rekombinantních forem tau proteinu, příprava polyklonálních protilátek proti tau proteinu a vývoj metody ELISA pro stanovení anti-tau protilátek v biologických tekutinách a optimalizace metody ELISA pro stanovení oligomerů tau v séru.

Podrobný popis použitých metod je uveden na 12 stránkách v samostatné kapitole. Autorka použila celé spektrum biochemických, imunochemických i molekulárně-biologických metod (chromatografické metody, elektroforetické metody, Western a dot bloty, metody ELISA, příprava tkáňových a buněčných extraktů). Ve stejné kapitole je detailně podána i charakteristika souborů pacientů, u nichž byly stanovovány protilátky proti tau proteinu a tau oligomery. Protilátky proti tau proteinu byly analyzovány v séru i mozkomíšním moku u 134 pacientů, oligomery a konformery tau proteinu v séru většího souboru o počtu 186 osob a v mozkomíšním moku u 118 pacientů.

Nejrozsáhlejší část práce zahrnující 30 stran je věnována dosaženým výsledkům. Z bohaté výsledkové části bych upozornila na srovnání výskytu a charakteru přirozeně se vyskytujících anti-tau protilátek vyizolovaných jednak z produktů IgG určených pro i.v. aplikaci (IVIG, Flebogamma) a jednak z plazmy kognitivně zdravých starých osob a nemocných s AN, které přineslo zajímavé výsledky a byly prokázány rozdíly v reaktivitě protilátek proti různým formám tau proteinu. Analýza oligomerů pomocí vlastní metody ELISA ukázala na přítomnost oligomerů v krevním séru zdravých starších osob, jejichž hladiny byly vyšší ve srovnání se skupinou pacientů s mírnou kognitivní poruchou u AN. Autorka se neomezila na pouhé stanovení hladin oligomerů, ale při hodnocení jejich stability našla rozdíly mezi pacienty s AN a kognitivně zdravými osobami. Hladiny anti-tau protilátek byly u zdravých osob v séru nižší než u osob s mírnou kognitivní poruchou. Kapitola je zpracována pečlivě, výsledky jsou dokumentovány dostatečným počtem obrázků a kvalitně zpracovaných grafů.

V bohaté diskusi autorka srovnává vlastní výsledky s dosavadními poznatky a v závěru konzistentním způsobem shrnuje přínos dizertační práce.

Doktorská dizertace Mgr. Michaly Krestové je věnována aktuální problematice týkající se AN. Vyhodnocení výsledků velkého objemu časově náročných experimentů přineslo nové a zajímavé poznatky vztahující se k patologickým izoformám tau proteinu a autoprottilátkové aktivitě proti nim. Pod vedením zkušených školitelů RNDr. Jana Říčního, CSc. a doc. MUDr. Aleše Bartoše, Ph.D. se autorce podařilo vhodným způsobem propojit výsledky základního výzkumu s klinickou aplikací. Autorka prokázala, že ovládá široké spektrum biochemických a imunochemických metod, které dokáže správně aplikovat. Zdařilá diskuse svědčí o schopnosti autorky správně vyhodnocovat získaná experimentální data.

### **Otázky k obhajobě:**

1. V metodě ELISA pro stanovení tau oligomerů v biologických tekutinách jste používala specifické protilátky T22 a TTC-90. Mohla byste je stručně charakterizovat?
2. Domníváte se, že některé z výsledků Vaší dizertace by mohly být využity v souvislosti s imunoterapií AN?

### **Závěr**

**Doktorská dizertační práce Mgr. Michaly Krestové obsahuje nové originální poznatky, publikované v impaktovaných časopisech. Autorka prokázala schopnost samostatné vědecké práce a splňuje požadavky kladené na dizertační práci. Doporučuji, aby Mgr. Michale Krestové byl na základě úspěšné obhajoby doktorské dizertace udělen titul Ph.D.**

V Praze dne 28. 7. 2017



MUDr. Lenka Fialová, CSc.

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