

V Praze 21. května 2014

## **Oponentský posudek k diplomové práci Bc. Jitky Kašparové "Zavedení blotovacích technik pro detekci biomarkerů Alzheimerovy choroby".**

Diplomová práce byla vypracována na Katedře biologických a biochemických věd Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice (studijní odbor: Analýza biologických materiálů) pod vedením Mgr. Barbory Jankovičové, Ph.D. Konzultantka práce byla doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

Zadáním diplomové práce (DP) bylo vybrat vhodné protilátky a optimalizovat parametry imunodetekce biomarkerů Alzheimerovy nemoci (AN) metodikami dot-blot a western-blot.

DP má úvod (40 str.) členěný do řady podkapitol, začínající charakterizací neurodegenerativních onemocnění (s hlavní pozorností věnovanou AN) a popisem neuropatogeneze AN s důrazem na poruchy homeostázy (při syntéze i odbourávání) amyloidu  $\beta$  ( $A\beta$ ) a proteinu tau ( $\tau$ ). Následuje přehled biomarkerů, používaných pro diagnózu AN. V závěru úvodu jsou popsány techniky detekce a kvantifikace biomarkerů.

Konkretizace cílů DP je nastíněna na 1 a 1/2 str.; experimentální část (15 str.) obsahuje podrobný popis použitého laboratorního vybavení, chemikálií a reagentů, technik a postupů.

Výsledková část spolu s diskuzí tvoří nejobsáhlejší část DP (52 str.); závěry jsou shrnuty na 2 a 1/2 str.

DP je doplněna seznamem použitých zkratk a obsahuje 120 literárních nebo webových odkazů (adekvátní množství; řada odkazů recentních (r. 2013 i 2014); jsou dodrženy citační normy). Součástí práce je docela vysoké množství tabulek, obrázků a grafů (55). Pokud jde o převzaté ilustrace, jsou vždy uvedeny příslušné zdroje.

Struktura, rozsah i náplň DP dodržují zavedený úsus a odpovídají standardům a nárokům, kladeným na tento typ publikace.

Práce je dobře plánovaná, pečlivě provedená, jasně dokumentovaná a výsledky jsou adekvátně diskutovány. Teoretická část je podložena studiem recentní literatury, i když v pasážích, týkajících se především medicínské problematiky je znát, že toto není primárním zaměřením autorčina studia. Proti pravopisu DP nemám negativní připomínky – všiml jsem si snad jednoho nebo dvou překlepů; stylisticky se však autorka nevyhnula některým nesprávným formulacím nebo nejasnostem (příklad uvedený níže); nejedná se však o zásadní chyby. Stanovené cíle zadání byly prací splněny. Výsledky diplomantky umožní výběr nejvhodnějších protilátek pro citlivou a specifickou detekci biomarkerů, vhodných pro diagnostiku AD (jedná se především o  $A\beta_{1-42}$  a  $\tau$ ) a optimalizaci technik dot-blot a western-blot po 2D-elektroforéze. Na tyto poznatky bude možné navázat při další aplikaci takto zavedených metodik např. při podrobnějších analýzách reálných vzorků pacientů s neurodegenerativními onemocněními.

Moje připomínky a otázky:

Na str. 50, část 1.5.4, 3.odstavec, má oprava interpretace: nativní elektroforéza může probíhat i v přítomnosti detergentu (detergent ovšem musí být "non-ionic"). Z vyznění další věty vyplývá, že urea a DTT jsou detergenty (což samozřejmě nejsou). Mimochodem, pro výraz "urea" bych použil hezký český název "močovina". V dalším odstavci na str. 50 je diskutována atypická pohyblivost variant  $A\beta$  v SDS-PAGE s močovinou se závěrem diplomantky, že "příčinou může být rozdíl v kvartetní struktuře isoform  $A\beta$ ". O kvartetní struktuře bílkovin mluvíme u molekul, složených z několika podjednotek – což není případ  $A\beta$ . V uváděné citaci (Klafki et al., 1996) autoři spekulují o rozdílech v **terciální** struktuře. Vysvětlení atypické pohyblivosti variant je poměrně věrohodně uvedeno v citovaném odkazu Kawooya et

et al. (2003) poukazem na jejich rozdílnou hydrofobicitu a tím i nestejně množství navázaných molekul SDS.

Jak si vysvětlujete, že detekce  $\tau$  je citlivější při barvení DAB, kdežto detekce  $A\beta$  je citlivější při barvení 4CN (primární protilátky jsou všechny míší IgG: sekundární identické)?

Můj závěr:

Práce splňuje předpoklady potřebné pro předložení k obhajobě: doporučuji ji hodnotit známkou "výborně".

**RNDr Jan Říčný, CSc**

Laboratoř biochemie a patofyziologie mozku

Psychiatrické centrum Praha

Ústavní 91

181 03 Praha 8

