

## OPONENTSKÝ POSUDOK

na dizertačnú prácu Mgr. Kateřiny Hoňkovej:

“ Využití „omics“ metod v molekulárně-epidemiologické studii novorozenců z různých lokalit České republiky”

Environmentálna záťaž je významným rizikovým faktorom pre vznik rôznych civilizačných ochorení, vrátane rakoviny. Vysoké koncentrácie polutantov v ovzduší môžu negatívne ovplyvniť aj prenatálny vývoj dieťaťa. Využitie „omics“ technológií v populačných štúdiách prispieva k prehĺbeniu našich poznatkov o etiológii chorôb a taktiež môže viesť k identifikácii nových biomarkerov expozície. Zvolená téma predkladanej dizertačnej práce je preto vysoko aktuálna. Dizertačná práca bola vypracovaná na Oddelení genetickej toxikológie a epigenetiky ÚEM AV ČR, v.v.i. Toto pracovisko patrí k renomovaným výskumným pracoviskám v oblasti monitorovania kvality ovzdušia a skúmania jeho vplyvu na ľudské zdravie.

Predkladaná dizertačná práca je spracovaná na 100 stranách a je delená obvyklým spôsobom na kapitoly: Literárny prehľad, Ciele, Metodika, Výsledky, Diskusia a Záver. V dizertačnej práci sa autorka zameriava na dva tematické okruhy, kvalita ovzdušia a jej dopad na ľudské zdravie a uplatnenie „omics“ technológií v molekulárnej epidemiológii. Doktorandka vyváženým spôsobom predstavuje hlavné zložky znečisteného ovzdušia a ich pôvod, taktiež predstavuje študované lokality a dôvod ich výberu do štúdie. Podkapitola venovaná „omics“ technológiám a ich využití v molekulárnej epidemiológii je miestami popisovaná veľmi podrobne, a skôr pripomínala kapitolu Metodika. Text úvodnej časti je doplnený relevantnými odkazmi na odbornú literatúru, čo svedčí o dobrej orientácii doktorandky v danej problematike, prehľadnými tabuľkami, názornými obrázkami a grafmi.

Ciele práce sú definované jasne a logicky nadväzujú na literárny úvod. Hoci doktorandka uvádza, že dizertačná práca je založená na 4 CC publikáciách, v skutočnosti prezentované výsledky sú publikované iba v jednej publikácii, kde je doktorandka prvou autorkou. Časť prezentovaných výsledkov je z pilotnej epidemiologickej štúdie, ktoré ešte neboli publikované. Spomínané ďalšie 3 CC publikácie súvisia s témou dizertačnej práce čiastočne, skôr slúžia na podporu interpretácie získaných výsledkov a potvrdenie správnosti zvolených metodických postupov ako aj sama autorka uvádza.

Veľmi dôležitou súčasťou dizertačnej práce je komplexná štatistická analýza získaných výsledkov, kde doktorandka preukázala svoje znalosti pracovať so získanými dátami, rôznymi databázami a správne interpretovať získané výsledky.

Výsledky z microarray analýzy ukázali rozdielne profily expresie génov u novorodencov medzi lokalitami Karviná a České Budějovic. Najviac deregulovaných génov sa zistilo vo vzorkách z Karvinej v zimnom období, kedy boli namerané vysoké hodnoty znečistenia ovzdušia. Deregulované gény patrili do dráh súvisiacich s imunitnou odpoveďou organizmu a bunkovou obranou voči oxidačnému stresu. Tieto výsledky indikujú aktiváciu obranných mechanizmov ako odpoveď na vysokú environmentálnu záťaž v danej oblasti. Výsledky z pilotnej epidemiologickej štúdie, ktorá sa zameriavala na dereguláciu epigenetických mechanizmov, ukázali odlišne metylované CpG miesta v génoch súvisiacich s reguláciou imunitnej odpovede jedinca. Pilotná štúdia ďalej odhalila rozdielne exprimované 3 miRNA (miR-190a, miR-193b a miR-548000), z ktorých miR-190a ovplyvňuje aktivitu génu TP53INP1, čo taktiež naznačuje obranný mechanizmus organizmu pred expozíciou.

Kapitola diskusia je rozdelená na podkapitoly podľa tém, ktorým sa doktorandka venovala vo svojej práci. Odporučila by som autorke, aby sa v budúcnosti vyhla opakovanému popisovaniu získaných výsledkov v diskusii, skôr sa zamerala na interpretáciu vlastných dát v porovnaní s výsledkami iných autorov. Vyhne sa tým duplicita a text bude koncízny, s dôrazom na najzávažnejšie zistenia.

K práci nemám zásadne výhrady alebo pripomienky, nakoľko veľká časť výsledkov už bola publikovaná, a teda prešla prísnyim oponentským konaním. Výsledky z pilotnej štúdie doktorandka interpretovala veľmi kriticky, majúc na pamäti rozsah analyzovaného súboru, čo oceňujem.

Mám niekoľko otázok/námetov do diskusie:

1. Všetky CpG metylácie, ktoré boli ďalej analyzované sa týkali iba promótorových oblastí génov? Aký podiel zistených CpG metylácií tvorili promótorové/regulačné oblasti génov? Do výsledkov by sa hodilo zaradiť takúto prehľadnú tabuľku.
2. V záveroch doktorandka uvádza: „Nejvýznamnejší je up-regulace miR-190a, která může být ovlivněna hypermetylací CpG místa cg01824466“. Ako to autorka myslela? V úvodnej kapitole autorka popisuje hypermetyláciu v regulačných oblastiach génu ako dôsledok utlmenie expresie génu. Ako si doktorandka vysvetľuje up-reguláciu tejto miRNA pri súčasnej hypermetylácii tohto génu, predpokladám v promótorovej oblasti?
3. Doktorandka uviedla, že v pilotnej štúdiu sa použila časť vzoriek z lokality ČB. Z toho vyplýva, že na malom súbore vzoriek cca 20 – 25 pupočníkovej krvi, existujú výsledky z celogenómnej génovej expresie ako aj analýzy metylácie DNA a expresia miRNA. I keď ide o pomerne malý súbor, neskúšala doktorandka korelovať výsledky metylačnej analýzy aj so zmenami v génovej expresii?

4. Doktorandka uvádza, že výsledky pilotnej štúdie boli základom pre ďalšie výskumné aktivity pracoviska. Plánuje sa v budúcnosti korelovať výsledky z DNA metylácie s génovou expresiou ako aj inými funkčnými testami? Napr. v prípade hypometylácie a súčasnej up-regulácie génu kódujúceho proteín overiť zvýšenú expresiu Western blotom? Budú to určite veľmi cenné výsledky. Počet takýchto funkčných analýz nie je veľa.

Záver: Dizertačná práca Mgr. Kateřiny Hoňkovej prináša cenné výsledky, ktoré prispievajú k pochopeniu etiológie niektorých ochorení, a verím, že nájdu uplatnenie v oblasti ochrany ľudského zdravia a kvality životného prostredia. Doktorandka splnila všetky vytýčené ciele dizertačnej práce, ukázala, že vie pracovať s odbornou literatúrou a ovláda rôzne „omics“ metódy, vrátane spracovania a interpretácie výsledkov. Doktorandka je autorkou, resp. spoluautor viacerých vedeckých publikácií v danej oblasti (priemerný IF = 3,63), čo svedčí o jej teoretickej a praktickej pripravenosti na samostatnú vedeckú dráhu. Na základe týchto skutočností navrhujem, aby dizertačná práca Mgr. Kateřiny Hoňkovej bola prijatá k obhajobe a po jej úspešnom obhájení jej bol udelený akademický titul „philosophiae doctor“ v študijnom odbore *molekulárna a buněčná biologie, genetika a virologie*.

Bratislava, 24. mája 2021

RNDr. Alena Gábelová, CSc.