

Oponentský posudek

Disertační práce Mgr. Daniela Benáka

Epitranscriptomics and cardioprotective interventions (Epitranskriptomika a kardioprotektivní intervence)

Disertační práce Mgr. Daniela Benáka shrnuje jeho dosavadní práci v oblasti molekulárních mechanismů kardioprotektivních intervencí, konkrétně se zaměřuje na epitranskriptomické regulace při adaptaci na chronickou hypoxii a hladovění. Výsledky nasvědčují, že při těchto kardioprotektivních zásazích dochází ke komplexní regulaci epitranskriptomických modifikací RNA (m6A a m6Am), které tak mohou být významnou součástí kardioprotektivních mechanismů s potenciálním klinickým dopadem. Silnou stránkou práce je rozsah a pokročilost nasazených metodických postupů, které zahrnují přípravu zvířecích modelů (potkaní modely chronické hypoxie a hladovění) a in vivo analýzu srdeční funkce (echokardiografie a katetrizace srdce s měřením levokomorového tlaku), izolaci a kultivaci dospělých potkaních kardiomyocytů, -omics postupy (lipidomická a metabolomická analýza plazmy, proteomická analýza) či řadu pokročilých molekulárně-biologických metod (izolace RNA, RT-qPCR, Western blot, kvantifikace metylace (m6A/m), imunoprecipitace m6A/m-modifikované RNA). Jednoznačnou předností práce je její sevřenost s jasnou centrální hypotézou úlohy epitranskriptomických regulací v kardioprotekci.

Vlastní dizertační práce o 96 stranách (plus přílohy 3 původních a 3 přehledových článků, ze kterých disertační práce vychází) je členěna obvyklým způsobem. Po seznamu relevantních autorských publikací (3 původní a 3 přehledové práce), abstraktech a obsahu následuje úvodní kapitola se stručným zdůvodněním podstaty projektu. Kapitola literárního přehledu (17 stran) podrobně seznamuje s aktuálním stavem poznání v oblasti kardioprotekce a epitranskriptomiky. Oddíl věnovaný kardioprotekci se po představení základních typů kardioprotektivních mechanismů zaměřuje na působení chronické hypoxie a hladovění. Oddíl epitranskriptomiky vysvětluje metylační modifikace mRNA na adenosinu, m6A a m6Am, včetně úlohy metyltransferáz (writer), demetyláz (eraser) a vazebných proteinů (reader). Rozebrána je rovněž úloha modifikací m6A a m6Am v srdeční fyziologii.

Po představení hypotézy (epitranskriptomické regulace hrají významnou úlohu v kardioprotekci navozené chronickou hypoxií a hladověním) a hlavních cílů (analýza změn epitranskriptomické regulace spojených s chronickou hypoxií a hladověním a stanovení vlivu specifických inhibitorů demetyláz ALKBH5 a FTO na hypoxickou toleranci kardiomyocytů) následuje kapitola s důkladným popisem použitých metodických postupů (15 stran). Šíře metodických postupů je úctyhodná, sahá od přípravy potkaních modelů včetně in vivo analýzy srdeční funkce přes pokročilé molekulárně-biologické techniky (např. RT-qPCR, kvantifikace metylace mRNA) po -omics postupy (proteomika, metabolomika, lipidomika).

Výsledková část (20 stran) je rozdělena na dvě hlavní části, první se věnuje modelu chronické hypoxie, druhá modelu hladovění. U obou modelů je systematicky popsán vliv příslušné adaptace na regulátory m6A a m6Am v levé komoře, na globální m6A/m metylační úroveň v levé komoře a na metylační status transkriptů spojených s cytoprotektivními účinky. U modelu hladovění, kde byly změny výraznější, byl navíc analyzován lipidomický a metabolomický profil plazmy spolu s proteomickou, geometrickou a funkční analýzou srdce. Výsledky uzavírá studie farmakologické inhibice demetyláz ALKBH5 and FTO, která vedla ke snížené hypoxické toleranci kardiomyocytů izolovaných z potkanů vystavených hladovění. Výsledková část je kvalitní, přináší řadu nových poznatků, které byly vesměs již publikovány v kvalitních odborných časopisech a svědčí pro centrální hypotézu.

Celá problematika je následně podrobně diskutována (kap. 6, Discussion, 9 stran) v kontextu aktuálního světového písemnictví se zdůrazněním prioritních výsledků studií, které jsou součástí disertační práce. Diskuse výsledků je dostatečně podrobná a svědčí o hlubokém porozumění studované problematice, schopnosti vlastní interpretace výsledků a

jejich zařazení do širšího kontextu současného vědeckého poznání. Literární rozhled autora potvrzuje 227 citací uvedených v seznamu citací použité literatury.

Výsledky byly úspěšně publikovány v renomovaných impaktovaných časopisech (1x Q1, 2x Q2, 3x Q3), což dostatečně dokládá jejich kvalitu a novost. Publikace již zaznamenaly citační ohlas (celkem 23 citací 6 uvedených publikací). Vedle těchto 6 publikací, na kterých je založena dizertační práce, se Mgr. Benák spoluautorsky podílel na dalších 2 původních impaktovaných publikacích (obě Q1), které rovněž souvisejí s centrálním tématem kardioprotekce.

Zvolené téma dizertační práce je dle mého názoru vysoce aktuální. Epigenetické a epitranskriptomické mechanismy přinášejí novou regulační úroveň patofyziologických procesů a v celosvětovém kontextu je na ně upřena velká pozornost. Výzkum jejich zapojení do kardioprotekce je unikátní a detailní poznání jejich interakcí může mít významný klinický dopad na terapeutické i preventivní úrovni. Zvolené experimentální metody byly adekvátní řešeným problémům, jedná se vesměs o náročné moderní postupy, které jsou zpravidla velmi pracné a náročné na provedení i interpretaci. Přínos výsledků pro další rozvoj oblasti je zřejmý, unikátní kombinace epitranskriptomiky a kardioprotekce otevírá nové možnosti poznání regulačního pozadí a potenciálního ovlivnění patofyziologie ischemicko-reperfuzního poškození myokardu. Stanovené cíle disertační práce byly bezesbýtku naplněny.

K formálnímu zpracování nemám výtek, práce je napsána kvalitní odbornou angličtinou (pokud dokážu posoudit) a je téměř bez chyb a překlepů (povšiml jsem si pouze přehozeného číselného popisu sloupců ve Fig. 27, v obou panelech mají nižší sloupce vyšší číselnou hodnotu, 81 vs. 78%; a označení posledního obrázku, kterým by měl být Fig. 28, nicméně v textu (l. 1077) a v legendě (l. 1098) je označený jako Fig. 29 či použití „by“ místo „to“: l. 926, „to 87%/89%“ místo „by 87/89%“). Je zřejmé, že jejímu pečlivému zpracování byla věnována značná pozornost.

Na závěr bych si dovolil položit několik doplňujících dotazů a komentářů k diskusi:

Nemůže být další proměnnou u hladovění a hypoxie také míra pohybu? Uměl bych si představit, že při hladovění se pohyb zvyšuje (hledání potravy), při hypoxii snižuje (únava)? Monitorovali jste pohyb zvířat?

U izolovaných kardiomyocytů byla jediným sledovaným parametrem jejich viabilita, nicméně mohlo dojít ke změně jejich funkčních parametrů (např. kontraktilita, vápníkové hospodářství, trvání a tvar akčního napětí). Studovali jste některé funkční parametry kardiomyocytů?

Epitranskriptomické regulace obecně představují další (jednu z mnoha) možnou úroveň regulačních mechanismů. Jaký význam jim přisuzujete z kvantitativního hlediska, představují nástroj jakéhosi jemného ladění nebo se kvantitativně vyrovnají jiným regulacím (např. mohla by epitranskriptomická regulace zcela potlačit účinky stimulace transkripce)?

Závěr:

Předložená disertační práce splňuje všechny zákonné požadavky a prokazuje předpoklady autora k samostatné vědecké práci. Doporučuji proto po úspěšné obhajobě udělit Mgr. Danielu Benákovi akademický titul Ph.D.

V Plzni, 6.června 2024

Prof. MUDr. Milan Štengl, Ph.D.

