

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Imunologie



**Bc. Markéta Holečková**

Poruchy kmenových buněk v myším modelu Diamondovy-Blackfanovy anémie

Hematopoietic stem and progenitor cell defects in transgenic model of Diamond-  
Blackfan anemia

Diplomová práce

Vedoucí práce: Mgr. Juraj Kokavec, PhD.

Praha, 2022

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10.8.2022

Podpis:

**Poděkování:**

Chtěla bych poděkovat zejména svému školiteli Mgr. Jurajovi Kokavcovi, PhD. za veškeré rady, čas i trpělivost, které mi věnoval při psaní této diplomové práce. Také bych ráda poděkovala Prof. MUDr. Tomáši Stopkovi, PhD. za cenné rady, a kolegům z laboratoře za všechnu praktickou i morální pomoc. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat také své rodině za jejich nikdy nekončící podporu.

## Abstrakt

Diamondova-Blackfanova anémie (DBA) je vzácné vrozené onemocnění kostní dřeně, které je charakterizováno poruchami ve vývoji erytrocytů a bývá doprovázena širokou škálou jiných defektů. Je způsobena mutací v některém z genů ribozomálních proteinů, ve čtvrtině všech případů se jedná o gen *RPS19*. Mechanismus vzniku patologie této nemoci není dosud přesně znám. Pro lepší porozumění vztahu genotypu a fenotypu u DBA byl vytvořen myší model s homozygotní mutací vysoce konzervovaného argininu 67 ( $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$ ).

Myší model s touto mutací vykazuje mnoho fenotypových příznaků odpovídajících těm, kterými trpí pacienti s DBA. V této diplomové práci se zaměřujeme na charakterizaci hematopoetických a erythropoetických vlastností tohoto myšího modelu. Prokázali jsme, že myši trpí anémií a k poruchám erythropoézy dochází ve stádiu proerytoblastů. V hematopoéze jsme pozorovali změny již od stádia multipotentních progenitorů.

Role proteinu p53 v patogenezi DBA je již dlouho známá. Pracovali jsme proto i s modelem  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}Trp53^{-/-}$ , na kterém jsme pozorovali záchranu fenotypu. Erythropoéza ani hematopoéza nebyla u tohoto myšího modelu narušena. Pomocí transkriptomické analýzy jsme prokázali, že u  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$  myši dochází ke zvýšené expresi několika genů, které jsou všechny součástí p53 signální dráhy, zatímco u  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}Trp53^{-/-}$  myši nedochází ke zvýšené expresi těchto genů. Toto pozorování potvrzuje důležitost p53 signální dráhy v patogenezi DBA.

## Klíčová slova

Diamondova-Blackfanova anémie, *Rps19*, *Trp53*, myší model, erythropoéza, hematopoéza, RNA sekvenování

## Abstract

Diamond-Blackfan anemia (DBA) is a rare congenital bone marrow failure syndrome characterized by deficient development of erythroid progenitors and accompanied by a variable set of developmental defects. About 25 % of patients have mutations of the small ribosomal subunit protein *RPS19*, and the precise mechanism of single aminoacidic mutations of RPS19 protein in the pathology of Diamond-Blackfan anemia remains largely unknown. To understand the interaction between of genotype and phenotypic variability we have created a mouse model with homozygous mutation in a highly conserved arginine 67 ( $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$ ).

Mouse model with this mutation display many of the same phenotypical trades as patients with DBA. We decided to focus on hematopoiesis and erythropoiesis in this mouse model and tried to characterize those processes. We discovered that  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$  mice similarly to DBA patients suffer from anemia and that the erythropoiesis process is disrupted at the stage of proerythroblasts. We also observed changes in hematopoiesis in stages as early as multipotent progenitors.

The role of p53 protein as a modifier of DBA phenotype is well known. We created mouse model with p53 depletion to assess the role of p53 protein in relation with mutation in *Rps19*.  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}Trp53^{-/-}$  mice show no signs of DBA, thus the mutation in *Trp53* acts as rescue of the phenotype. Erythropoiesis and hematopoiesis of those mice remains unchanged compared to wild-type mice. Using transcriptomic analysis of adult bone marrow cells and E14.5 fetal livers from  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$  mice we identified a small set of genes – transcriptional targets of p53 signaling pathway, associated with DBA phenotype, whose expression was not upregulated in the  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}Trp53^{-/-}$  mice model, highlighting the significance of p53 signaling pathway in DBA pathogenesis.

## Keywords

Diamond-Blackfan anemia, *Rps19*, *Trp53*, mouse model, erythropoiesis, hematopoiesis, RNA sequencing

# Obsah

1	Seznam zkratk	1
2	Úvod	3
3	Literární přehled	4
3.1	Ribozomy	4
3.1.1	Struktura ribozomů	4
3.1.2	Syntéza ribozomů	6
3.1.3	Ribozomopatie	7
3.2	Hematopoéza	9
3.3	Erytropoéza	10
3.3.1	Regulace erytropoézy	11
3.4	Diamondova-Blackfanova anémie	12
3.4.1	Léčba Diamondovy-Blackfanovy anémie	13
3.4.2	Genetika Diamondovy-Blackfanovy anémie	14
3.4.3	Mechanismy ovlivnění erytropoézy	15
3.5	Myší modely DBA	19
3.5.1	Myší model Rps19 <sup>R67Δ/R67Δ</sup>	21
4	Cíle	24
5	Materiály	25
5.1	Zvířata	25
5.2	Přístroje	25
5.3	Chemikálie	26
5.3.1	Komerční kity	26
5.3.2	Další chemikálie	26
5.4	Roztoky a média	27
5.5	Software	27
5.6	Protílátky pro průtokovou cytometrii	28
5.7	Primery	29
6	Metody	30
6.1	Příprava buněčných suspenzí	30
6.1.1	Izolace buněk ze sleziny, kostní dřeně a jater	30
6.1.2	Izolace buněk z fetálních jater	30
6.2	Průtoková cytometrie	30
6.2.1	Barvení buněk ze sleziny, kostní dřeně a fetálních jater	30
6.2.2	Barvení buněk kostní dřeně panelem LSK	31
6.2.3	Barvení periferní krve	31
6.3	Barvení pro průtokovou cytometrii	32
6.4	Transplantace kostní dřeně	33
6.4.1	Příprava buněk k transplantaci	33
6.4.2	Aplikace buněk kostní dřeně	33
6.5	Izolace DNA pro genotypování	33
6.6	Analýza RNA	34
6.7	qPCR	35

6.8	RNA sekvenování .....	36
6.9	Statistika a vizualizace dat .....	37
7	Výsledky .....	38
7.1	Analýza složení ribozomální RNA u dospělých myší $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$ .....	38
7.2	Poruchy definitivní krvetvorby v myším modelu $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$ .....	40
7.2.1	Snížená buněčnost kostní dřeně a sleziny .....	40
7.2.2	Změny složení periferní krve u dospělých myší $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$ .....	41
7.2.3	Změny v průběhu erythropoézy u dospělých myší $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$ .....	42
7.2.4	Poruchy fetální erythropoézy u myší $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$ .....	44
7.2.5	Vývoj neerytroidních krevních buněk u myší $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$ .....	45
7.3	Narušený vývoj hematopoetických kmenových buněk u myší $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$ .....	47
7.4	Kompenzace fenotypových změn následkem deficience <i>Trp53</i> .....	50
7.4.1	Průběh erythropoézy v myším modelu $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}Trp53^{-/-}$ .....	52
7.4.2	Abnormality hematopoetických buněk v myším modelu $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}Trp53^{-/-}$ .....	53
7.5	Změny genové exprese u myší $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$ a $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}Trp53^{-/-}$ .....	55
7.5.1	Genová exprese ve fetálních játrech myší $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$ a $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}Trp53^{-/-}$ .....	56
7.6	Poruchy repopulační aktivity kmenových buněk z $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$ myší .....	58
8	Diskuse .....	63
8.1	Poruchy složení ribozomální podjednotky v myším modelu $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$ .....	63
8.2	Poruchy hematopoézy a erythropoézy .....	64
8.3	Změny v genové expresi v myším modelu $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$ .....	66
8.4	Role tumor supresorového genu <i>Trp53</i> v patogenezi DBA .....	67
9	Závěr .....	69
10	Literatura .....	70

# 1 Seznam zkratek

<b>ADA2</b>	<i>adenosine deaminase 2</i>	adenosindeamináza 2
<b>AF</b>	<i>assembly factor</i>	skládací faktor
<b>AML</b>	<i>acute myeloid leukemia</i>	akutní myeloidní leukémie
<b>ARE</b>	<i>AU-rich element</i>	AU-bohatá oblast
<b>BFU-E</b>	<i>burst-forming unit – erythroid</i>	časná fáze vývoje červené krevní řady
<b>CCP</b>	<i>Czech Center for phenogenomics</i>	České centrum pro fenogenomiku
<b>CD</b>	<i>cluster of differentiation</i>	diferenciační skupina
<b>CDKN1A</b>	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1</i>	cyklin dependentní kinázový inhibitor 1
<b>cDNA</b>	<i>complementary DNA</i>	komplementární DNA
<b>CFU-E</b>	<i>colony-forming unit – erythroid</i>	unipotentní kmenová buňka červené krevní řady
<b>CLP</b>	<i>common lymphoid progenitor</i>	lymfoidní progenitor
<b>CMP</b>	<i>common myeloid progenitor</i>	myeloidní progenitor
<b>DBA</b>	<i>Diamond-Blackfan anemia</i>	Diamondova-Blackfanova anémie
<b>DC</b>	<i>X-linked dyskeratosis congenita</i>	X-vázaná kongenitální dyskeratóza
<b>DNA</b>	<i>deoxyribonucleic acid</i>	deoxyribonukleová kyselina
<b>EDTA</b>	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>	kyselina ethylendiamintetraoctová
<b>EPO</b>	<i>erythropoietin</i>	erytropoetin
<b>EpoR</b>	<i>erythropoietin receptor</i>	erytropoetinový receptor
<b>ETS</b>	<i>external transcribed spacer</i>	vnější přepisovaný mezerník
<b>FasL</b>	<i>Fas ligand</i>	Fas ligand
<b>GMP</b>	<i>granulocyte-macrophage progenitor</i>	progenitor granulocytů a makrofágů
<b>HIF</b>	<i>hypoxia-inducible factor</i>	transkripční faktor indukovaný hypoxií
<b>HSC</b>	<i>hematopoietic stem cell</i>	hematopoetické kmenová buňka
<b>HSP</b>	<i>heat shock protein</i>	protein teplotního šoku
<b>CHH</b>	<i>Cartilage hair hypoplasia</i>	syndrom hypoplastických chrupavek a vlasů
<b>ITS</b>	<i>internal transcribed spacer</i>	vnitřní přepisovaný mezerník
<b>JAK2</b>	<i>janus kinase</i>	janus kináza
<b>LT-HSC</b>	<i>long-lived hematopoietic stem cell</i>	dlouhožijící hematopoetická kmenová buňka
<b>MDM2</b>	<i>mouse double minute 2 homolog</i>	ubiquitin ligáza E3
<b>MEP</b>	<i>megakaryocyte-erythroid progenitor</i>	progenitor pro megakaryocyty a erytrocyty
<b>MPP</b>	<i>multipotent progenitor</i>	multipotentní progenitor
<b>MPP1</b>	<i>short-term HSC</i>	krátkodobě obnovující se HSC
<b>MPP2</b>	<i>myeloid-biased MPP</i>	myeloidně zaměřené MPP
<b>MPP3</b>	<i>balanced MPP</i>	balancované MPP
<b>MPP4</b>	<i>lymphoid-biased MPP</i>	lymfoidně zaměřené MPP
<b>mRNA</b>	<i>messenger RNA</i>	mediátorová RNA



<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B</i>	nukleární faktor kappa B
<b>NLS</b>	<i>nucleolus localization signal</i>	jadéřkový lokalizační signál
<b>OS</b>	<i>overall survival</i>	celkové přežití
<b>PBS</b>	<i>phosphate-buffered saline</i>	fosfátový pufr
<b>PH</b>	<i>pleckstrin homology</i>	plekstrin homologický
<b>PI</b>	<i>propidium iodide</i>	propidium jodid
<b>PIP3</b>	<i>phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphate</i>	fosfatidylinositol-(3,4,5)-trifosfát
<b>Pol I</b>	<i>Polymerase I</i>	Polymeráza I
<b>Pol II</b>	<i>Polymerase II</i>	Polymeráza II
<b>Pol III</b>	<i>Polymerase III</i>	Polymeráza III
<b>PP2A</b>	<i>protein phosphatase 2</i>	protein fosfatáza 2
<b>PRMT</b>	<i>protein arginine methyltransferase</i>	protein arginin methyltransferáza
<b>PTC</b>	<i>peptidyl transferase center</i>	peptidyl transferázové katalytické centrum
<b>rDNA</b>	<i>recombinant DNA</i>	rekombinantní DNA
<b>RNA</b>	<i>ribonucleic acid</i>	ribonukleová kyselina
<b>ROS</b>	<i>reactive oxygen species</i>	reaktivní formy kyslíku
<b>RP</b>	<i>ribosomal protein</i>	ribosomální protein
<b>RPL</b>	<i>ribosomal protein of large ribosomal subunit</i>	ribosomální protein velké ribosomální podjednotky
<b>RPS</b>	<i>ribosomal protein of small ribosomal subunit</i>	ribosomální protein malé ribosomální podjednotky
<b>rRNA</b>	<i>ribosomal RNA</i>	ribosomální RNA
<b>rRNP</b>	<i>rRNA-protein complex</i>	komplex rRNA a proteinů
<b>SDS</b>	<i>Schwachman-Diamond syndrome</i>	Schwachmanův-Diamondův syndrom
<b>snRNA</b>	<i>small nucleolar RNA</i>	malá jaderná RNA
<b>STAT</b>	<i>signal transducer and activator of transcription</i>	fosforylovaný přenašeč signálu a aktivátor transkripce
<b>TCS</b>	<i>Treacher Collins syndrome</i>	Treacher Collinsův syndrom
<b>tRNA</b>	<i>transfer RNA</i>	transferová RNA
<b>UTR</b>	<i>untranslated region</i>	nepřekládaná oblast

## 2 Úvod

Diamondova-Blackfanova anémie (DBA) je vzácné genetické onemocnění charakterizované anémií a poruchami erythropoézy. Přibližně v polovině případů se u pacientů objevují další příznaky, nejčastěji různé malformace. DBA se řadí mezi ribozomopatie – nemoci způsobené poruchami v ribozomech. Ve většině případů je DBA způsobena mutací v některém z genů ribozomálních proteinů, přibližně ve čtvrtině z nich se jedná o mutaci v genu *RPS19*.

Ribozomální protein RPS19 je součástí malé ribozomální podjednotky. Narušení jeho syntézy či funkce může vést k zastavení maturace malé ribozomální podjednotky nebo k její menší funkčnosti. Chybné či nedostatečné skládání ribozomů spouští v buňce ribozomální stres, který vede k aktivaci p53. K té může docházet i vlivem proteinu GATA1, který hraje důležitou roli v erythropoéze, a jehož transkripce může být ovlivněna také poruchami ve skládání ribozomů.

Dosud bylo vyvinuto několik myších modelů Diamondovy-Blackfanovy anémie s mutacemi v různých ribozomálních genech, které více či méně přesně kopírují některé příznaky DBA. Mnoho těchto modelů potvrzuje klíčovou roli proteinu p53 v patogenezi DBA. Ve své diplomové práci pracuji s myším modelem  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$ , tedy s mutací v genu *Rps19*, který svým fenotypem v mnoha ohledech imituje příznaky DBA u lidí, a sleduji především vlastnosti jeho hematopoetických a erythropoetických buněk.

## 3 Literární přehled

### 3.1 Ribozomy

Ribozomy jsou důležitou součástí všech buněk i semiautonomních organel, které slouží k syntéze proteinů. Nacházejí se buď volně v cytoplazmě nebo navázané na endoplazmatické retikulum. Skládají se z velké a malé podjednotky, u eukaryotů jsou podjednotky označovány jako 40S a 60S. Celý ribozom bývá označován jako 80S. Velká a malá podjednotka jsou sestavovány zvlášť a k jejich spojení dochází až ve chvíli, kdy dochází k syntéze proteinů. V eukaryotických buňkách probíhá většina procesu syntézy ribozomálních podjednotek v jadérku. Ve složeném ribozomu slouží malá podjednotka jako rámec pro správné spárování tRNA ke kodonu mRNA, zatímco velká podjednotka katalyzuje vznik peptidových vazeb, které k sobě váží jednotlivé aminokyseliny.

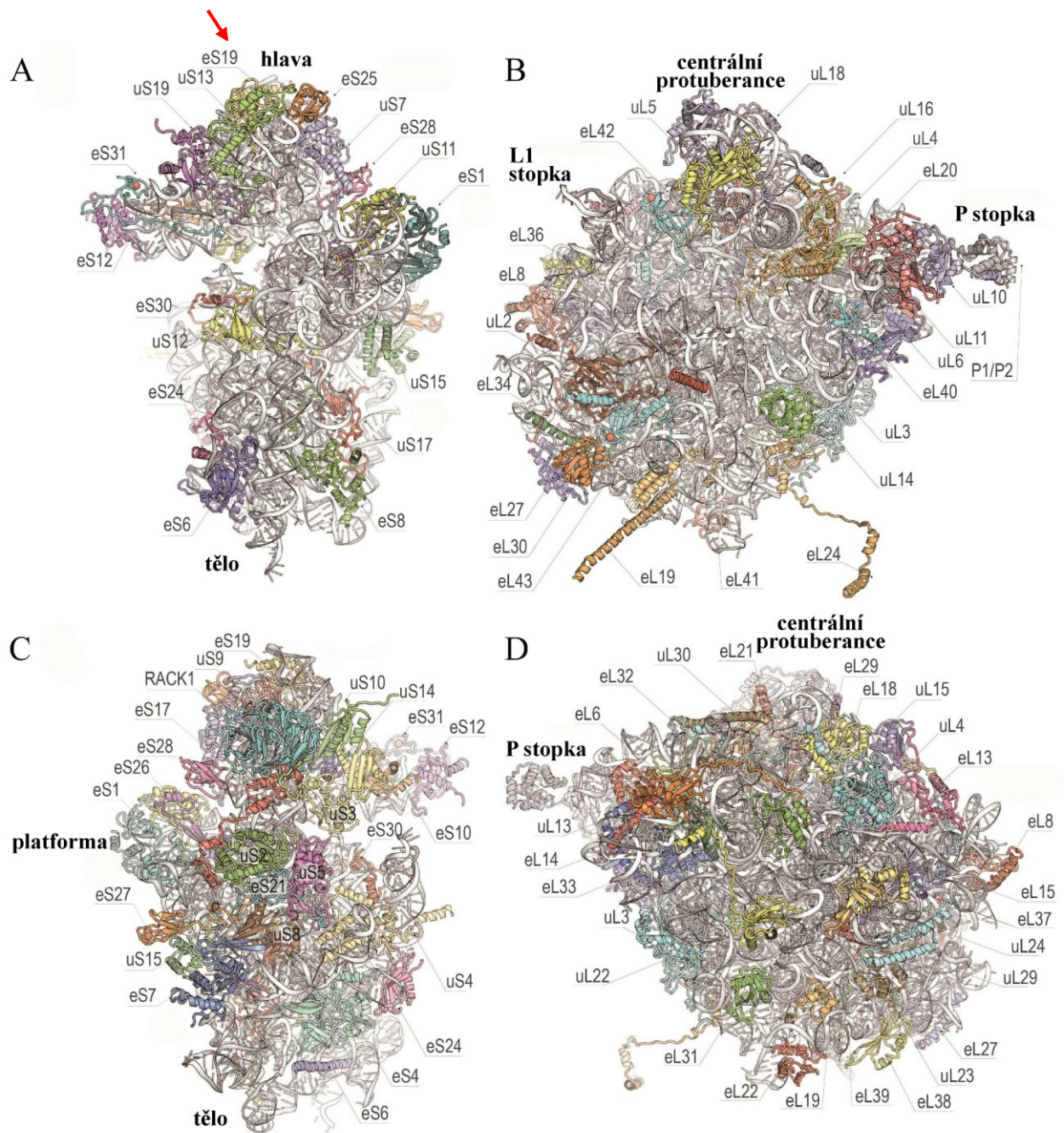
#### 3.1.1 Struktura ribozomů

V eukaryotických buňkách se malá podjednotka ribozomu skládá z jedné molekuly 18S rRNA a 33 ribozomálních proteinů, velká podjednotka se skládá ze tří molekul rRNA – 5S, 5.8S a 28S (25S u kvasinek) a 47 ribozomálních proteinů (46 u kvasinek) (de la Cruz et al., 2015).

Velká podjednotka nazývaná 60S má tvar podobný koruně a obsahuje oblasti tzv. centrální protuberance, L1 stopku a P stopku. Na vnitřní straně se nachází vazebná místa pro tRNA a peptidyl transferázové katalytické centrum (*peptidyl transferase center*, PTC), kde dochází ke vzniku peptidové vazby a uvolnění peptidu (Yusupova and Yusupov, 2017).

Malá podjednotka ribozomu nazývaná 40S se skládá z částí označovaných jako hlava, tělo, rameno, platforma a zobák. Na vnitřní straně podjednotky se nachází vazebná místa pro mRNA a tRNA. Při syntéze proteinů vstupuje mRNA tunelem, který se nachází mezi hlavou a ramenem, a otáčí se kolem krku malé podjednotky, z ribozomu mRNA vystupuje mezi hlavou a platformou. Místo, kde se páruje kodon s antikodonem, se nachází na povrchu vnitřní strany (Yusupova and Yusupov, 2017).

V průběhu syntézy proteinů jsou velká a malá ribozomální podjednotka spojeny pomocí interpodjednotkových můstků. Tyto můstky mají roli jednak strukturní, slouží také pro výměnu informací mezi podjednotkami a pomáhají koordinovat aktivitu obou podjednotek při syntéze proteinů (Ben-Shem et al., 2011).



**Obr. 1:** Struktura ribozomálních podjednotek: **A)** vnitřní strana malé podjednotky; **B)** vnitřní strana velké podjednotky; **C)** vnější strana malé podjednotky; **D)** vnitřní strana velké podjednotky. Šipka ukazuje na ribozomální protein eS19, také označovaný jako S19 nebo RPS19, který hraje důležitou roli v Diamondově-Blackfanově anémii. Převzato a upraveno z (Yusupova and Yusupov, 2021).

### 3.1.2 Syntéza ribozomů

Syntéza ribozomů je pečlivě regulovaný proces s mnoha kroky, který začíná v jadérku a pokračuje v nukleoplasmě a v cytoplasmě, k jehož koordinaci je potřeba více než 200 skládacích faktorů (*assembly factor*, AF).

Prvním krokem v syntéze ribozomů je transkripce mnohočetných kopií prekurzorů ribozomálních RNA kódovaných v tzv. rDNA lokusech v jadérku, a to pomocí Polymerázy I. Vznikající pre-rRNA (47S rRNA prekurzor) obsahuje budoucí rRNA 18S, 5.8S a 28S, jež jsou základními strukturálními komponenty ribozomů. 47S rRNA je po svém vzniku modifikována (metylována a izomerizována) pomocí malých jadérekových RNA (*small nucleolar RNA*, snRNA) (Watkins and Bohnsack, 2012). Již v průběhu transkripce se 47S rRNA začíná spojovat s ribozomálními proteiny (RP) a skládacími faktory a vzniká 90S komplex (Phipps et al., 2011).

90S komplex se posléze rozpadá a vznikají pre-40S podjednotka a pre-60S podjednotka. I když přesný proces přeměny 90S na pre-40S komplex není zcela objasněn, víme, že dochází k výrazným změnám struktury a z komplexu se oddělují některé skládací faktory a ETS (*5'-external transcribed spacer*) (Cheng et al., 2020). Brzy po svém vzniku je pre-40S podjednotka transportována do cytoplasmy. V této fázi obsahuje 20S rRNA (prekurzor 18S rRNA) a většinu ribozomálních proteinů (Ferreira-Cerca et al., 2005; Strunk et al., 2011).

V cytoplasmě dochází k posledním změnám v pre-40S komplexu a ke kontrolám správnosti jeho složení a funkce (Klinge and Woolford, 2019).

Oproti 40S prekurzoru, jehož skládání probíhá poměrně jednoduchým způsobem v jadérku, skládání 60S prekurzoru je mnohem složitější a obnáší několik kroků, které se odehrávají v jadérku, jádře i cytoplasmě. Po rozpadu 90S komplexu dochází k modifikaci pre-rRNA a jejímu spojování s komplexy různých AF. Dále se k pre-60S připojují některé z ribozomálních proteinů (Konikkat and Woolford, 2017). K pre-60S komplexu se v této fázi připojuje komplex 5S rRNP (*RNA-protein complex*), který se skládá z ribozomálních proteinů RPL5 a RPL11 a z 5S rRNA, jehož transkripce probíhá mimo jadérko pomocí Polymerázy III (Kressler et al., 2017; Zhang et al., 2007). Po přesunu pre-60S podjednotky z jadérka do jádra dochází k oddělení ITS2 (*internal transcribed spacer 2*) a mnoha dosud navázaných AF. V jádře poté dochází k dalším remodelacím podjednotky a následně k jejímu transportu do cytoplasmy, kde probíhají poslední kroky maturace, než je připravená ke spojení se s 40S podjednotkou (Konikkat and Woolford, 2017).

Souběžně s procesy v jádře a jadérku probíhá v cytoplasmě syntéza ribozomálních proteinů a skládacích faktorů. Ty jsou následně transportovány do jádra, kde se podílí na vzniku

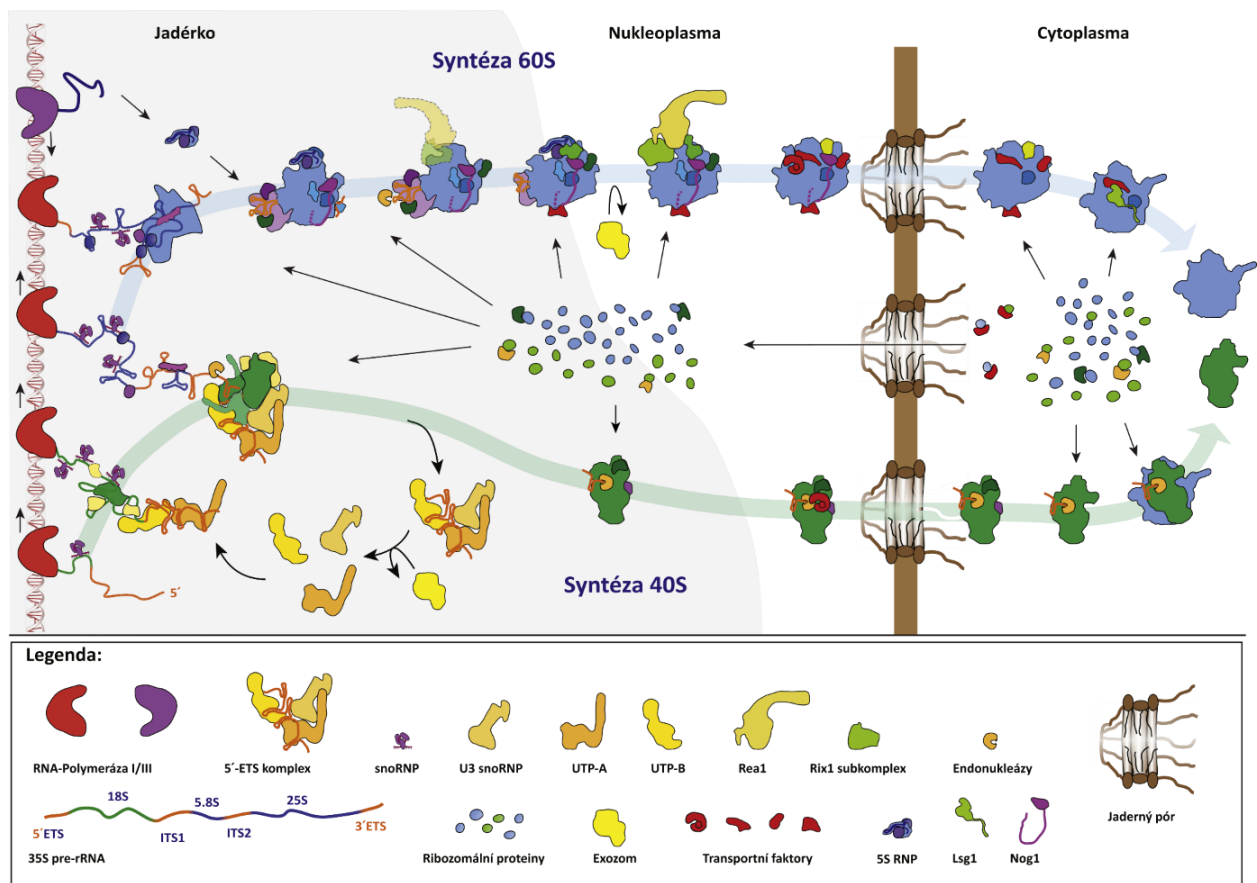
ribozomálních podjednotek. Většina ribozomálních proteinů jsou dostatečně malé na to, aby se do jádra mohly dostat pasivním transportem. Vzhledem k tomu, že jich je ale potřeba velké množství, je jejich transport usnadněn transportéry, většinou chaperony, které rozpoznávají jejich jadérový lokalizační signál (*nucleolar localization signal*, NLS). Některé RP, například RPL5 a RPL11, jsou do jádra transportovány pomocí specifických komplexů.

Pro úspěšnou syntézu ribozomů je potřeba koordinace všech tří zapojených polymeráz – Polymeráza I (Pol I) je zodpovědná za transkripci 47S rRNA, Polymeráza III (Pol III) za transkripci 5S rRNA a Polymeráza II (Pol II) se účastní syntézy mRNA kódujícího ribozomální proteiny. Modifikace Pol I a její ovlivňování pomocí různých pomocných faktorů je jedním z hlavních způsobů regulace syntézy ribozomů (Scull and Schneider, 2019).

### **3.1.3 Ribozomopatie**

Nemoci vzniklé na základě poruch syntézy či funkce ribozomů se nazývají ribozomopatie. Jejich příčinou mohou být mutace v genech ribozomálních proteinů, skládacích faktorů, rRNA, nebo defekty v rDNA transkriptu (De Keersmaecker et al., 2015). Navzdory tomu, že se ribozomy vyskytují ve všech buňkách, projevují se často ribozomopatie tkáňově specificky, postižena bývá například krvetvorba. Jedná se o velmi různorodou skupinu poruch, a to jak svými projevy, tak mechanismy vzniku. Ribozomopatie také mohou souviset s vyšším rizikem vzniku nádorů (Sulima et al., 2019).

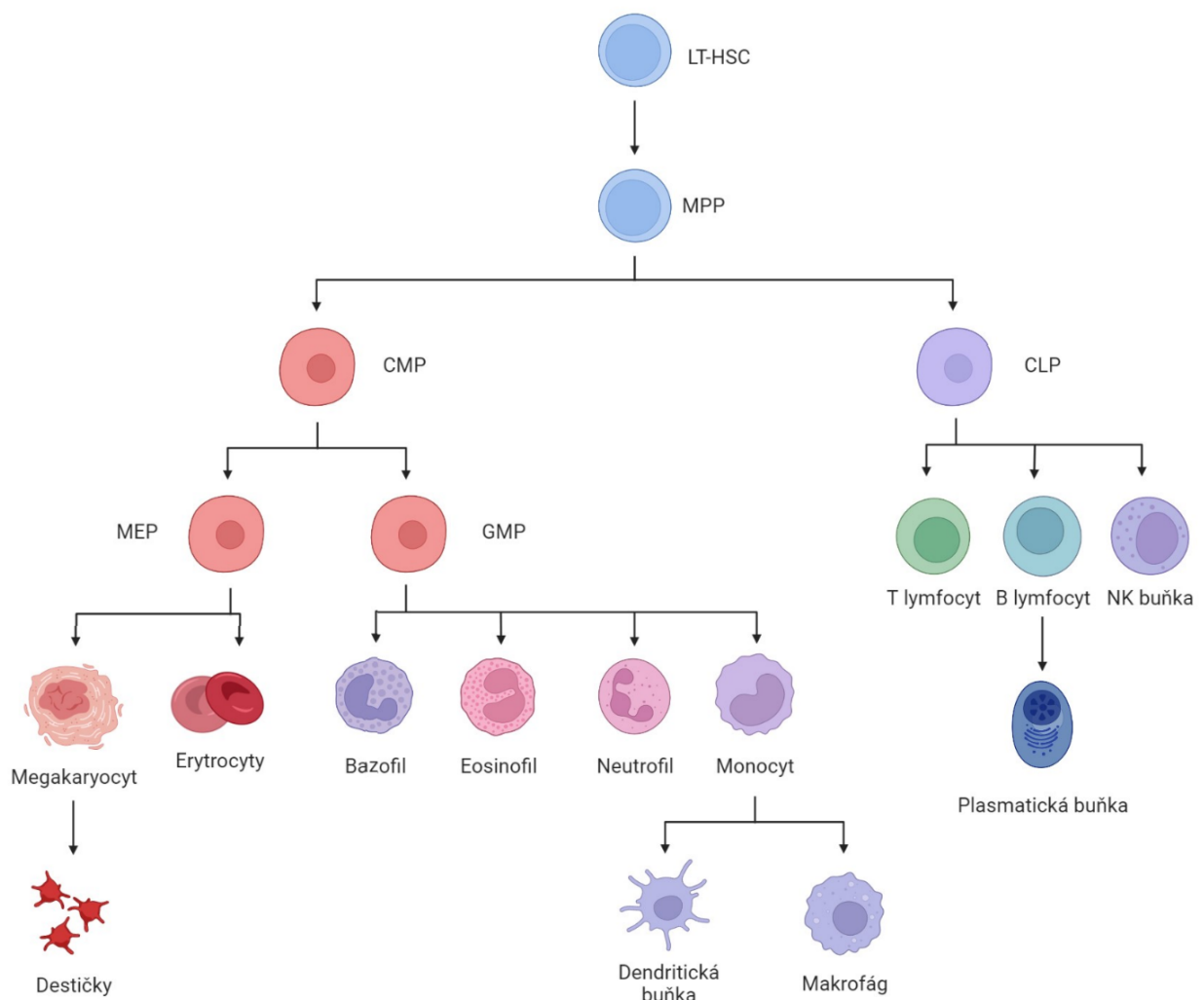
Mezi nejznámější ribozomopatie patří Diamondova-Blackfanova anémie (DBA), 5q-syndrom, Schwachmanův-Diamondův syndrom (SDS), X-vázaná kongenitální dyskeratóza (DC), syndrom hypoplastických chrupavek a vlasů (CHH) a Treacher Collinsův syndrom (TCS) (Narla and Ebert, 2010).



**Obr. 2:** Syntéza ribozomů u kvasinek: Většinu RP je potřeba transportovat z cytoplasmy do jádra. Syntéza jednotlivých podjednotek (40S – zelená šipka, 60S – modrá šipka) začíná ze společného pre-rRNA, které je transkribováno Polymerázou I. Různé AF a RP se váží na pre-rRNA a vytváří 90S preribozom. Rozpad 90S preribozomu uvolňuje 5'-EST komplex, jehož komponenty jsou recyklovány pro další syntézu ribozomů, a vzniká pre-40S komplex. Ten je s pomocí transportních faktorů transportován do cytoplasmy, kde dochází k další maturaci. Poslední krok maturace nastává po spojení do 80S ribozomu a probíhá při něm kontrola kvality. Pre-60S komplex vzniká po ukončení transkripce. Poté se k němu připojují některé AF a dále 5S komplex. V dalším průběhu zrání 60S podjednotky dochází k oddělení ITS2 a k remodelaci. Po přesunu do cytoplasmy skrz jaderný pór dochází k finální maturaci, kontrole kvality a spojení se 40S podjednotkou. Převzato a upraveno z (Kressler et al., 2017).

## 3.2 Hematopoéza

Hematopoéza je proces, při kterém vznikají krevní buňky. Všechny krevní buňky vznikají z hematopoetických kmenových buněk (HSC). Z dlouhožijících hematopoetických kmenových buněk (*long-term hematopoietic stem cell*, LT-HSC) vznikají multipotentní progenitory (*multipotent progenitor*, MPP). Ty se dělí na lymfoidní progenitory (*common lymphoid progenitor*, CLP) a myeloidní progenitory (*common myeloid progenitor*, CMP). CLP dávají vzniknout T a B lymfocytům a NK buňkám, zatímco z CMP vzniká progenitor granulocytů a makrofágů (*granulocyte-macrophage progenitor*, GMP) a progenitor pro megakaryocyty a erythrocyty (*megakaryocyte-erythroid progenitor*, MEP) (Akashi et al., 2000).



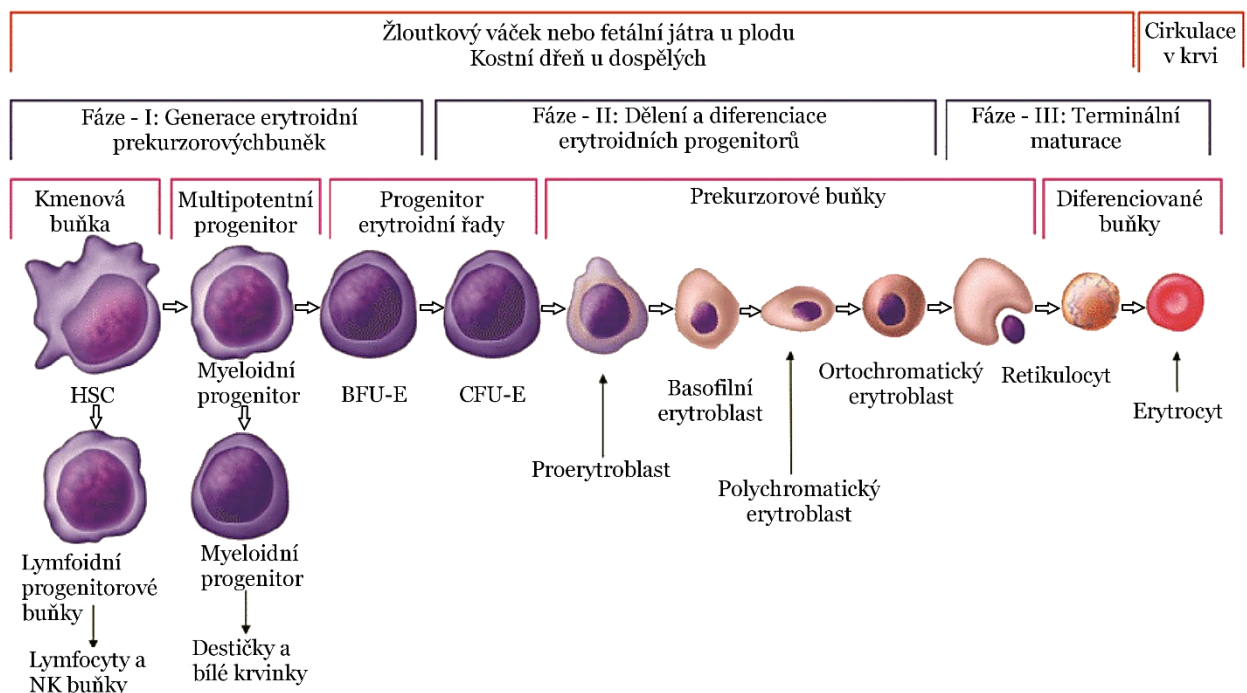
**Obr. 3:** Schéma hematopoézy. LT-HSC – dlouhožijící hematopoetická kmenová buňka, MPP – multipotentní progenitor, CMP – myeloidní progenitor, CLP – lymfoidní progenitor, MEP – progenitor pro megakaryocyty a erythrocyty, GMP – progenitor pro granulocyty a makrofágy. Vytvořeno v BioRender.com



### 3.3 Erytropoéza

Při erytropoéze dochází ke vzniku erytrocytů – červených krvinek. Hlavní funkcí erytrocytů je přenos dýchacích plynů. Jedná se o bezjaderné buňky, jejichž životnost je asi 120 dní, po kterých jsou pohlceny makrofágy. Denně se v těle obmění přibližně 1 % všech červených krvinek.

V již specificky erytroidní vývojové řadě z MEP vznikají BFU-E (*burst-forming unit – erythroid*) a z těch následně CFU-E (*colony-forming unit – erythroid*). Z CFU-E vznikají erytroidní prekurzory – proerytroblasty, basofilní erytroblasty, polychromatické erytroblasty, ortochromatické erytroblasty, retikulocyty a nakonec erytrocyty (Nandakumar et al., 2016).



**Obr. 4:** Schéma erytropoézy: Fáze I – diferenciace hematopoetických kmenových buněk do erytroidních prekurzorů; Fáze II – diferenciace BFU-E progenitorů do CFU-E progenitorů a následně dalších erytroidních prekurzorů; Fáze III – maturace erytrocytů. Převzato a upraveno z (Singh et al., 2016).

### 3.3.1 Regulace erythropoézy

Vzhledem k rychlosti, s jakou nové erythrocyty neustále vznikají, je potřeba tento proces regulovat. Hlavním cytokinem, který kontroluje erythropoézu je erythropoetin (EPO), hormon vznikající především v ledvinách a fetálních játrech. Jeho tvorba je regulována množstvím kyslíku v krvi (Ebert and Bunn, 1999).

Erythropoetin se váže na erythropoetinový receptor (EpoR) z rodiny cytokinových receptorů typu I, který je důležitý pro vývoj červených krvinek (Wu et al., 1995). V největší míře je exprimován ve stádiu CFU-E, nachází se i na BFU-E buňkách, i když v menším množství (Broudy et al., 1991). Exprese EpoR ve fetálních játrech je nezbytná pro průběh brzké erythropoézy v játrech, a jeho deficience vede u myši k předčasnému úmrtí zárodku v embryonálním stádiu E12.5 (ve věku 12,5 dne) (Lin et al., 1996; Wu et al., 1995).

Navázání EPO na EpoR řídí erythropoézu za normálního stavu i stresovou erythropoézu, při které je hladina EPO výrazně vyšší a dochází k omezení exprese Fas a FasL na erytroidních progenitorech (Liu et al., 2006).

Po navázání EPO na dvě molekuly receptoru dojde k jejich dimerizaci a následné změně konformace, což vede k aktivaci tyrosin kinázy JAK2 (Constantinescu et al., 1999; Moraga et al., 2015). Myši embrya deficientní pro *Jak2* gen postrádají červené krvinky (Neubauer et al., 1998; Parganas et al., 1998), což je v souladu s primární rolí tyrosin kinázy JAK2 v erythropoetinové signalizaci – tou je zejména fosforylace a aktivace cílových genů *Stat5a* a *Stat5b* (Constantinescu et al., 1999). Mezi cílové geny transkripčních faktorů STAT5 patří například *TFRC* (Kerenyi et al., 2008), *IDI* (Wood et al., 2009), *SPI2A* (Dev et al., 2013) nebo *TRIB3* (Dev et al., 2017), nicméně hlavním cílem je gen *BCL2L1*, který reguluje přežívání erythroidních progenitorů (Gillinder et al., 2017; Rhodes et al., 2005; Socolovsky et al., 1999; Socolovsky et al., 2001).

Hlavním genem regulujícím erythropoézu u obratlovců je transkripční faktor GATA1. Předšlé práce na myších modelech ukázaly na jeho zcela zásadní roli v erythropoéze, jelikož *Gata1* knockout vede k embryonální letalitě z důvodu zablokování fetální krvetvorby (Pevny et al., 1991; Weiss and Orkin, 1995). Podobně, vyřazení funkce *Gata1* u dospělých myši vede k anémii (Gutierrez et al., 2008).

GATA1 reguluje mnoho esenciálních procesů pro udržování erythropoézy. Ovlivňuje například syntézu hemu (Doty et al., 2019) a globinových řetězců (Doerfler et al., 2021) či udržování homeostázy buněčné membrány červených krvinek (Hasegawa et al., 2012) a regulaci procesů nezbytných pro erytroidní maturaci jako například autofáгии (Kang et al., 2012).

GATA1 reguluje také expresi genů, které ovlivňují buněčný cyklus. Patří mezi ně například *GFI1B* (Hernandez et al., 2010; Huang et al., 2004), *CDC6* (Fernandez-Morales et al., 2012; Vilaboa et al., 2004) a *CDKN1A* (p21) (Papetti et al., 2010).

Expres *GATA1* je největší ve fází erytropoézy CFU-E a BFU-E, i když v malém množství se *GATA1* vyskytuje už v dřívějších fázích erytropoézy a hematopoézy. Ve výše zmíněných raných fázích erytropoézy aktivuje *GATA1* expresi EpoR, a s další maturací erytroidních progenitorů množství *GATA1* klesá (Kobayashi and Yamamoto, 2007).

Poruchy související s *GATA1* jsou základem mnoha onemocnění. Narušení erytropoézy z důvodu souvisejícím s *GATA1* může být způsobeno třemi mechanismy: mutací v *GATA1*, která má za následek výraznou redukci množství *GATA1* proteinu (Crispino and Horwitz, 2017), narušenou translaci *GATA1* (Khajuria et al., 2018; Ludwig et al., 2014) nebo poruchami v chaperonu HSP70, který normálně v průběhu erytropoézy chrání *GATA1* před degradací kaspázou 3 (Frisan et al., 2012; Ribeil et al., 2007).

### 3.4 Diamondova-Blackfanova anémie

Diamondova-Blackfanova anémie (DBA) je autosomálně dominantní dědičné onemocnění s neúplnou penetrancí, které se projevuje poruchou krvetvorby vedoucí k anémii a často také fyzickými abnormalitami. Vyskytuje se v incidenci 7 případů na milion živě narozených dětí. V necelých 60 % případů vzniká mutace *de novo*, ve více než 40 % případů pacient mutaci zdědí (Orfali et al., 2004). Ve většině případů se nemoc projeví během prvního roku života, průměrně v 8 týdnech věku, diagnóza následuje průměrně ve 12 týdnech věku (Lipton et al., 2006). Více než 90 % případů je diagnostikováno do jednoho roku, 95 % do 2 let a 99 % do 5 let (Willig et al., 1999). Poměr postižených mužů a žen je přibližně 1:1, i když se vzácně mohou vyskytovat případy vázané na X chromosomu způsobené mutací v genech *GATA1* nebo *TSR2* (Gripp et al., 2014; Sankaran et al., 2012).

Diamondova-Blackfanova anémie se projevuje mimo samotné anémie širokou škálou různých dalších příznaků. Častým příznakem je růstová retardace vyskytující se téměř u třetiny pacientů, která může vzniknout následkem dalších přidružených malformací, anémie nebo samotné léčby (Chen et al., 2005). Přibližně polovina pacientů vykazuje také různé vrozené malformace. U pacientů se nejčastěji vyskytují kraniofaciální malformace, například hypertelorismus, široký kořen nosu, gotické patro a rozštěp patra, mezi další časté malformace

patří abnormality horních končetin, zejména tříčlankový palec, často postižen může být také urogenitální trakt či srdce (Da Costa et al., 2020; Vlachos et al., 2018b).

Pacienti s DBA mají vyšší riziko vzniku rakoviny, nejčastěji myelodysplastického syndromu s progresí do akutní myeloidní leukémie nebo osteosarkomů (Lipton and Ellis, 2009).

### **3.4.1 Léčba Diamondovy-Blackfanovy anémie**

Diamondova-Blackfanova anémie vyžaduje individuální přístup při léčbě, protože příznaky nemoci mohou být různé. Je nutné léčit anémii, a zároveň i řešit problémy způsobené malformacemi, růstovou retardací a dalšími příznaky. K léčbě anémie jsou využívány kortikosteroidy či krevní transfúze, ale jediným trvalým řešením je transplantace kostní dřeně. Celkové přežití (*overall survival*, OS) pacientů starších 40 let je 75 % (Lipton et al., 2006).

Kortikosteroidy se k léčbě DBA používají již od 50. let 20. století. 80 % pacientů zprvu reaguje na tuto léčbu dobře, kortikosteroidy vedou ke zlepšení či k úplné remisi anémie, nicméně dlouhodobá léčba kortikosteroidy může mít značné vedlejší účinky, a proto není vhodná pro všechny pacienty. Dlouhodobě je kortikosteroidy léčeno jen asi 40 % pacientů (Vlachos et al., 2008; Vlachos and Muir, 2010).

Další možností léčby je podávání transfúzí červených krvinek, a to zejména u pacientů, u kterých není z různých důvodů vhodná či možná léčba kortikosteroidy (Bartels and Bierings, 2019). Pokud jsou ale transfúze podávány dlouhodobě a pravidelně, vede to u pacientů k přílišnému množství železa v organismu, což má samo o sobě mnoho nežádoucích účinků a může vést až k úmrtí (Roggero et al., 2009).

Jediný trvalý způsob léčby anémie je transplantace kostní dřeně. Tato metoda je pro léčbu DBA používána již od roku 1976, a její úspěšnost se od té doby významně zvýšila, zejména v posledních 20 letech. Lepších výsledků je dosahováno, pokud je kostní dřeň transplantována mladším pacientům (Diaz-de-Heredia et al., 2021; Miano et al., 2021; Strahm et al., 2020).

Do budoucna by se dalo uvažovat o dalších možnostech léčby. V současné době probíhají klinické testy využití L-leucinu (Payne et al., 2012; Pospisilova et al., 2007; Vlachos et al., 2020; Vlachos et al., 2018a), nabízí se také využití genové terapie (Aspesi et al., 2017; Debnath et al., 2017; Jaako et al., 2014).

### 3.4.2 Genetika Diamondovy-Blackfanovy anémie

**Tabulka 1:** Geny mutované u pacientů s DBA, seřazeny dle četnosti výskytu. Převzato a upraveno z (Da Costa et al., 2020).

#### *nejčastěji mutované geny*

mutovaný gen	četnost výskytu mezi DBA pacienty
<i>RPS19</i>	25 – 30 %
<i>RPL5</i>	7 – 12 %
<i>RPS26</i>	6,6 – 9 %
<i>RPL11</i>	5 – 7 %
<i>RPL35A</i>	2 – 3 %
<i>RPS10</i>	1 – 3 %
<i>RPS24</i>	2,4 – 3 %
<i>RPS17</i>	1 – 3 %

#### *méně často mutované geny*

mutovaný gen	mutovaný gen
<i>RPL15</i>	<i>GATA1</i>
<i>RPS28</i>	<i>TSR2</i>
<i>RPS29</i>	<i>EPO</i>
<i>RPS7</i>	<i>ADA2</i>
<i>RPS15</i>	<i>HEATR3</i>
<i>RPS27A</i>	
<i>RPS27</i>	
<i>RPL9</i>	
<i>RPL18</i>	
<i>RPL26</i>	
<i>RPL27</i>	
<i>RPL31</i>	

#### 3.4.2.1 Poruchy ribozomálních proteinů v patogenezi DBA

Jako první mutace způsobující DBA byla v roce 1999 objevena mutace v genu *RPS19* (Draptchinskaia et al., 1999). Od té doby bylo popsáno mnoho dalších mutací v RPS a RPL genech, v některých případech může být DBA způsobena i mutacemi v jiných genech než v genech ribozomálních proteinů. Dnes víme o 20 RP genech, jejichž mutace může způsobovat DBA.

U pacientů s DBA dochází většinou k mutaci v některém z výše zmíněných genů (viz Tabulka 1), ale nejedná se o mutace ve stejných místech genů, v 80 % případů jsou mutace unikátní (Ulirsch et al., 2018). Všechny objevené mutace byly vždy heterozygotní dominantní, homozygotní mutace v obou alelách je pravděpodobně letální.

Mutace v některých genech se váží s větší pravděpodobností ke konkrétním fenotypovým projevům. Mutace v *RPS19* je většinou spojena s menším množstvím malformací, mutace v *RPL5* může mít naopak za následek malformační syndrom a mutace v *RPL11* často způsobuje

tříčlankový palec (Gazda et al., 2008; Ulirsch et al., 2018). Mutace v *RPS24* je častěji spojená s dědičnými srdečními chorobami (Vlachos et al., 2018b).

### 3.4.2.2 Mutace neribozomálních proteinů v patogenezi DBA

V některých případech, kdy pacienti vykazovali fenotyp Diamondovy-Blackfanovy anémie, u nich nebyla nalezena mutace v RP genech, ale byla nalezena mutace v jiných genech. Jedná se vždy o geny, které ovlivňují erythropoézu či hrají roli v syntéze ribozomů. U všech níže uváděných genů se jedná o jednotky případů pacientů s DBA, u kterých byla objevena mutace v daném genu.

Nejčastěji mutovaným genem v DBA, který nekóduje ribozomální protein, je *GATA1*. Jedná se o hlavní transkripční faktor erythropoézy. Nachází se na X chromozomu. Mutace v tomto genu vede k alternativnímu splicingu, jehož výsledkem je produkce kratší formy proteinu GATA1s. Dlouhá verze proteinu je stále přítomna, ale ve výrazně omezeném množství oproti zdravým jedincům (Abdulhay et al., 2019; Ludwig et al., 2014; Parrella et al., 2014; Sankaran et al., 2012).

*TRS2* je gen lokalizovaný na X chromozomu, jehož produkt TSR2 se v průběhu vytváření malé ribozomální podjednotky váže na protein RPS26. Mutace v tomto genu tedy může mít podobné následky jako mutace v genech ribozomálních proteinů (Gripp et al., 2014; Khajuria et al., 2018).

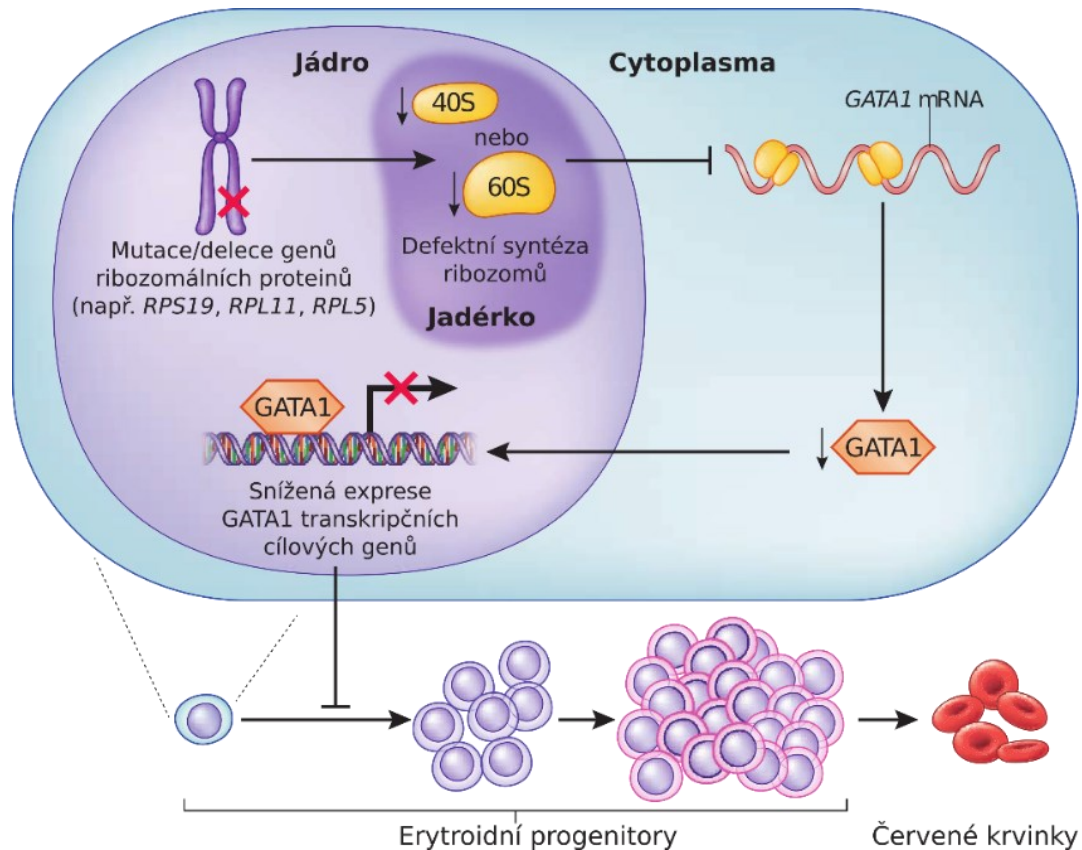
Dalšími mutovanými geny nalezenými u DBA pacientů jsou *EPO* – gen pro erythropoetin (Kim et al., 2017), *CECR1*, který produkuje protein ADA2 (*adenosine deaminase 2*) (Karaosmanoglu et al., 2021; Ulirsch et al., 2018) a *HEATR3*, který hraje roli v importu RPL5 a RPL11 při syntéze velké ribozomální podjednotky (O'Donohue et al., 2022).

### 3.4.3 Mechanismy ovlivnění erythropoézy

Přesný mechanismus, jak poruchy ribozomů vedou k anémii u DBA pacientů, není zcela známý. Mutace v genech ribozomálních proteinů vedou k poruchám syntézy ribozomů a ke sníženému množství velkých či malých ribozomálních podjednotek (Quarello et al., 2016). Zdá se, že snížená syntéza jedné z ribozomálních podjednotek může být důsledkem přirozeného mechanismu, jehož úkolem je zabránit inkorporaci poškozených ribozomálních proteinů, aby se zabránilo vzniku nefunkčních ribozomů (Hiregange et al., 2022). Nedostatek jedné z podjednotek pak vede ke sníženému počtu složených ribozomů (Khajuria et al., 2018).

U DBA pacientů s mutací v RP genech dochází vlivem defektu ribozomů ke snížení množství GATA1, protože dochází k narušení translace *GATA1* mRNA. Ke snížení množství GATA1 dochází zejména v časných erytroidních progenitorech (Khajuria et al., 2018). Umělé zvýšení množství GATA1 *in vitro* vede ke zlepšení průběhu erythropoézy (Ludwig et al., 2014).

Vliv mutace v RP na množství GATA1 se liší v závislosti na tom, který ribozomální protein je poškozen. Mutace v ribozomálních proteinech malé ribozomální podjednotky (RPS) mají pravděpodobně větší vliv na snížení množství GATA1 než mutace v ribozomálních proteinech velké ribozomální podjednotky (RPL) (Iskander et al., 2021).



**Obr. 5:** Schéma vlivu mutace v RP genech na GATA1 a erythropoézu: Poruchy v RP ovlivňují maturaci 40S nebo 60S ribozomálních podjednotek, což vede k poruše syntézy ribozomů. V takovém případě dochází k poškození translace *GATA1* mRNA a ke snížení množství proteinu GATA1. Menší množství GATA1 má za následek sníženou expresi GATA1 transkripčních cílových genů, což hraje roli v defektu v erythropoéze v DBA. Převzato a upraveno z (Boulwood and Pellagatti, 2014).

Další faktor ovlivňující množství GATA1 je chaperonový protein HSP70, který stabilizuje a chrání GATA1. Bylo pozorováno výrazné snížení jeho exprese u pacientů s mutací v *RPL5* nebo *RPL11*, a tím menší množství GATA1. Tyto změny ovšem nebyly pozorovány u pacientů s mutací v *RPS19*, což koresponduje s tím, že pacienti s mutací v *RPL5* a *RPL11* mají většinou závažnější fenotypové projevy onemocnění (Gastou et al., 2017).

V časných fázích erythropoézy dochází v buňkách pacientů s DBA k prodlení v produkci globulinu, což má za následek nerovnováhu mezi hemem a globinem. Tím dochází ke zvýšení množství volného hemu, který se hromadí v buňkách, kde facilituje zvýšenou produkci ROS (*reactive oxygen species*) (Rio et al., 2019; Yang et al., 2016). V buňkách, kde takto došlo ke zvýšení volného hemu, bylo pozorováno snížené množství proteinu BACH1. Větší rozdíly byly pozorovány u buněk s mutací v *RPL5* a *RPL11* oproti buňkám s mutací v *RPS19* (Rio et al., 2019). Rozdíly byly pozorovány také v produkci FLVCR1. Při pokusech na myších a na buněčných kulturách *in vivo* bylo ukázáno, že mutace ve *FLVCR1* může vést k fenotypu podobnému DBA (Keel et al., 2008; Rey et al., 2008). Při měření množství proteinu FLVCR1 v buňkách od DBA pacientů se ovšem naopak ukázalo, že obsahují větší množství tohoto proteinu (Rio et al., 2019).

#### **3.4.3.1 Role tumor supresorového proteinu p53 v hematopoéza**

Tumor supresorový protein p53 je kódovaný genem *TRP53*, který je mutován ve více než polovině všech lidských nádorů (Olivier et al., 2010). p53 může být aktivován širokou škálou stresových signálů a jeho aktivace vede k zastavení buněčného cyklu a případně až k apoptóze buňky. Negativním regulátorem p53 je protein MDM2, E3 ubiquitin ligáza, který tvoří komplex s p53 a ubiquitínuje ho, což vede k jeho degradaci (Woods and Vousden, 2001).

Narušení morfologie nebo funkce jádérka vede k jadérovému stresu, který aktivuje p53, případně jiné stresové signály. Mezi nejčastější spouštěče jadérového stresu patří poškození lokusu rDNA (Rubbi and Milner, 2003), narušení transkripce či modifikace rRNA (Yu et al., 2021a) nebo narušení skládání ribozomů (Fumagalli et al., 2009; Fumagalli et al., 2012; Pestov et al., 2001; Suzuki et al., 2012; Volarevic et al., 2000). Poslední ze zmíněných spouštěčů jadérového stresu se uplatňuje v Diamondově Blackfanově anémii.

Mutace v ribozomálních proteinech vedou k chybám v syntéze ribozomálních podjednotek a tím k akumulaci jiných ribozomálních proteinů. Některé RP se mohou vázat na MDM2 a tím bránit ubiquitinaci a degradaci p53. Nejdůležitějšími RP, které se váží na MDM2, jsou RPL5 (Dai and Lu, 2004) a RPL11 (Bhat et al., 2004; Dai et al., 2006; Lohrum et al., 2003; Zhang et al., 2003).

I další RP se mohou vázat na MDM2, například RPL15 (Daftuar et al., 2013), RPL26 (Ofir-Rosenfeld et al., 2008; Zhang et al., 2010), RPL23 (Dai et al., 2004; Jin et al., 2004), RPL37 (Daftuar et al., 2013), RPS3 (Yadavilli et al., 2009), RPS7 (Chen et al., 2007), RPS20 (Daftuar et al., 2013), RPS26 (Cui et al., 2014; Zhang et al., 2013) a RPS27 (Xiong et al., 2011). Zároveň však delece těchto a dalších RP vedou také k aktivaci p53, a to mimo jiné s pomocí RPL11, který se



váže na MDM2 (Cui et al., 2014; Fumagalli et al., 2009; Fumagalli et al., 2012; Nicolas et al., 2016). Výjimkou jsou proteiny RPL5 a RPL11, jejichž delece neaktivuje p53 a jejichž přítomnost je naopak nutná pro navázání se na MDM2 a aktivaci p53 (Nicolas et al., 2016; Teng et al., 2013).

K aktivaci p53 dochází u pacientů s DBA především v erytroidních progenitorech. Tyto buňky velice rychle proliferují, a pravděpodobně proto v nich dochází k větší citlivosti a snadnější aktivaci p53 (Dutt et al., 2011). Bylo také zjištěno, že p53 inhibuje funkci Polymerázy I (Zhai and Comai, 2000), což opět z důvodu rychlé proliferace ovlivňuje nejvíce právě erytroidní progenitory.

Vzhledem k tomu, že u některých pacientů s DBA byla prokázána mutace v RPL5 nebo v RPL11 (Gazda et al., 2008), můžeme z toho soudit, že existuje i jiný mechanismus nezávislý na p53, jakým v DBA může docházet k apoptóze erytroidních buněk (Singh et al., 2014).

Aktivace p53 je také ovlivňována proteinem GATA1, který může p53 vázat a tím ho inhibovat. V případě sníženého množství GATA1 tak dochází ke snadnější aktivaci p53 (Trainor et al., 2009).

### 3.5 Myší modely DBA

Zvířecí modely hrají důležitou roli ve zkoumání lidských onemocnění. Umožňují zkoumání mechanismů nemoci či testování různých léčebných postupů. Od objevení mutací, které způsobují DBA, byla snaha vyrobit funkční zvířecí model, avšak s různou úspěšností. Zatímco vytvoření myšího modelu se ukazuje jako problematické, rybí modely dána (*Danio rerio*) poměrně věrně kopírují příznaky DBA (Danilova et al., 2008, 2011; Torihara et al., 2011; Uechi et al., 2008; Yadav et al., 2014). Na rybích modelech je studována patogeneze DBA a také jsou pomocí nich hledány nové možnosti léčby, například pomocí L-leucinu (Payne et al., 2012).

První myší model DBA, který ovšem nekopíroval příznaky DBA, byl prezentován v roce 2004 (Matsson et al., 2004). Od té doby až dosud bylo vytvořeno mnoho myších modelů s mutacemi v různých RP genech, které více či méně kopírují fenotyp DBA. Mnoho vytvořených myších modelů ukazuje, že omezení či úplné zrušení funkce p53 vede k záchraně fenotypu daného modelu. Častým problémem různých myších modelů je embryonální letalita, proto některé modely využívají možnosti vypnout cílový gen až u dospělé myši, například pomocí systému Cre rekombinázy a LoxP úseků (Morgado-Palacin et al., 2015). Myší modely se také potýkají s problémem toho, že často kopírují jen některé příznaky DBA, například jen anémii nebo naopak jen kosterní abnormality. Jedním z častých společných znaků myších modelů s mutací v genech ribozomálních proteinů je deformovaný ocas a bílá skvrna na břicho (McGowan et al., 2008; Oliver et al., 2004; Watkins-Chow et al., 2013).

Geny *Rpl11* a *Rpl5* hrají důležitou roli při syntéze ribozomů i při regulaci p53, a oba tyto geny mohou být mutovány v DBA. Mutace v genu *Rpl11* se u myšího modelu ukázala jako embryonálně letální i v případě mutace jen jedné alely, proto byl vytvořen model, který umožňuje vypnutí genu u dospělé myši. Delece obou alel u tohoto modelu se ukázala jako letální, delece jedné alely vede k chronické anémii – je snížen celkový počet erytroblastů a je narušena i jejich maturace. Tento myší model se také projevuje zvýšenou náchylností ke vzniku lymfomů způsobených radiací (Morgado-Palacin et al., 2015).

Regulaci genu u dospělé myši využívá i myší model s mutací *Rpl5*, který se obdobně jako předchozí model projevuje anémií a také menší proliferací erytroidních progenitorů BFU-E a CFU-E (Kazerounian et al., 2019). Další myší model s mutací v *Rpl5* oproti předchozím modelům poměrně věrně kopíruje různé příznaky DBA jako například kosterní abnormality, kranální či kardiovaskulární defekty a nízkou hmotnost. U těchto myší se prenatálně vyskytují poruchy maturace erytrocytů a zvýšená úmrtnost a po narození trpí anémií, která ale do dospělosti vymizí – v sedmi týdnech věku již nebyla pozorována anémie ani poruchy erythropoézy (Yu et al., 2021b).

První myší model s mutací v *Rps19* představili Mattson a kol. Homozygotní myši tohoto modelu umíraly brzy v embryonálním vývoji, pravděpodobně ještě před stádiem blastocysty, zatímco heterozygotní myši se svým fenotypem nijak nelišily od kontrolních, a to morfolologicky ani při sledování hemoanalýzy, hematopoézy či erytropoézy (Mattson et al., 2004; Mattson et al., 2006).

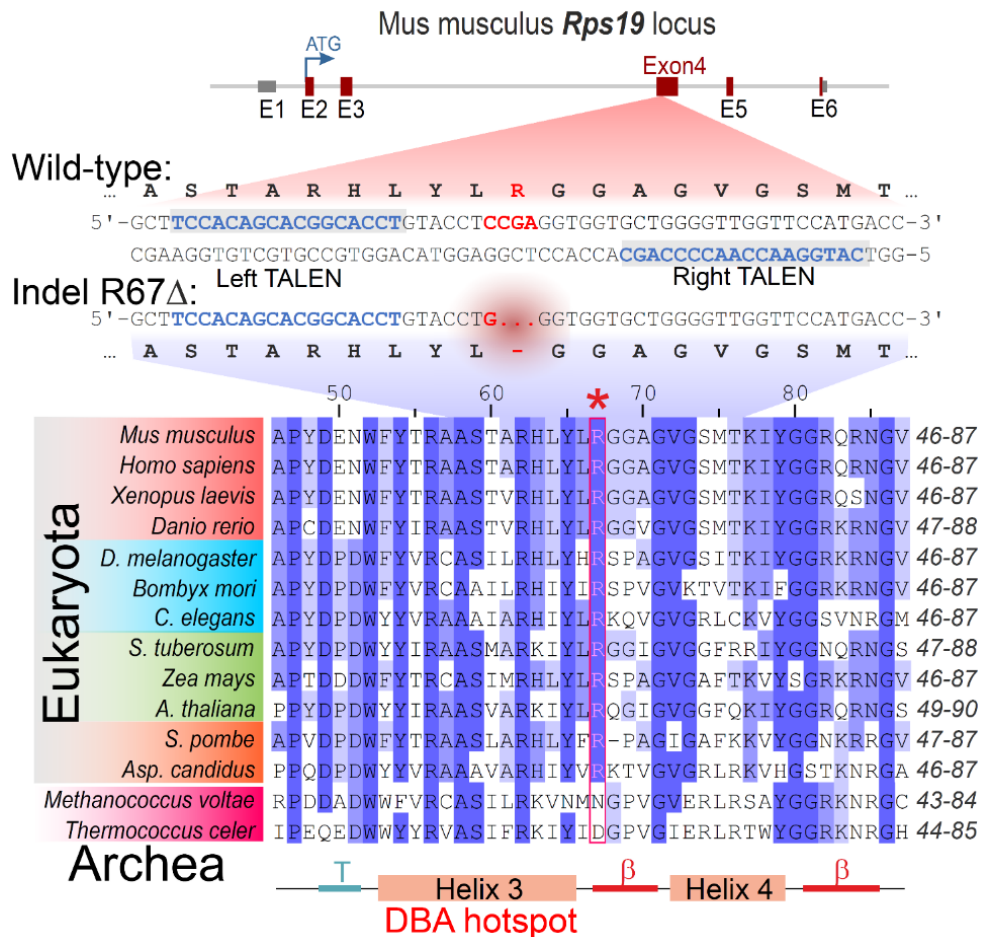
Další myším model s mutací ve stejném genu je model *Rps19*<sup>Y54N</sup> (tedy se substitucí asparaginu na pozici 54 v genu *Rps19* za tyrosin) jehož fenotyp je částečně podobný fenotypu DBA – myši mají menší porodní hmotnost, pomalejší růst a mírnou anémii způsobenou zvýšenou apoptózou v kostní dřeni způsobenou akumulací p53 (McGowan et al., 2008).

Devlin a kol. vytvořili myší model *Rps19*<sup>R62W</sup> (substituce tryptofanu za arginin na pozici 62). Tato mutace vede u myši k letalitě v brzkých embryonálních stádiích. Dále proto byl vytvořen model, u kterého byla exprese ovládána pomocí Cre rekombinázy a LoxP úseků. U takovýchto dospělých zvířat se vyskytovala mírná anémie, snížený počet erytroidních progenitorů a narušená erytropoéza (Devlin et al., 2010).

Jaako a kol. vytvořili myší model, který umožňuje regulaci *Rps19* exprese. Tím způsobený nedostatek RPS19 vede k anémii, jejíž závažnost závisí na tom, jak moc je regulovaná exprese *Rps19*. Podobně jako u některých pacientů s DBA, i u těchto myši se vyskytuje trombocytopenie. Při dlouhodobém poklesu RPS19 dochází k nevratnému vyčerpání hematopoetických kmenových buněk. Fenotyp této myši může být zlepšen ztrátou p53, ale stejná mutace v *Trp53* vede k různým výsledkům závislým na míře poklesu RPS19 (Jaako et al., 2011).

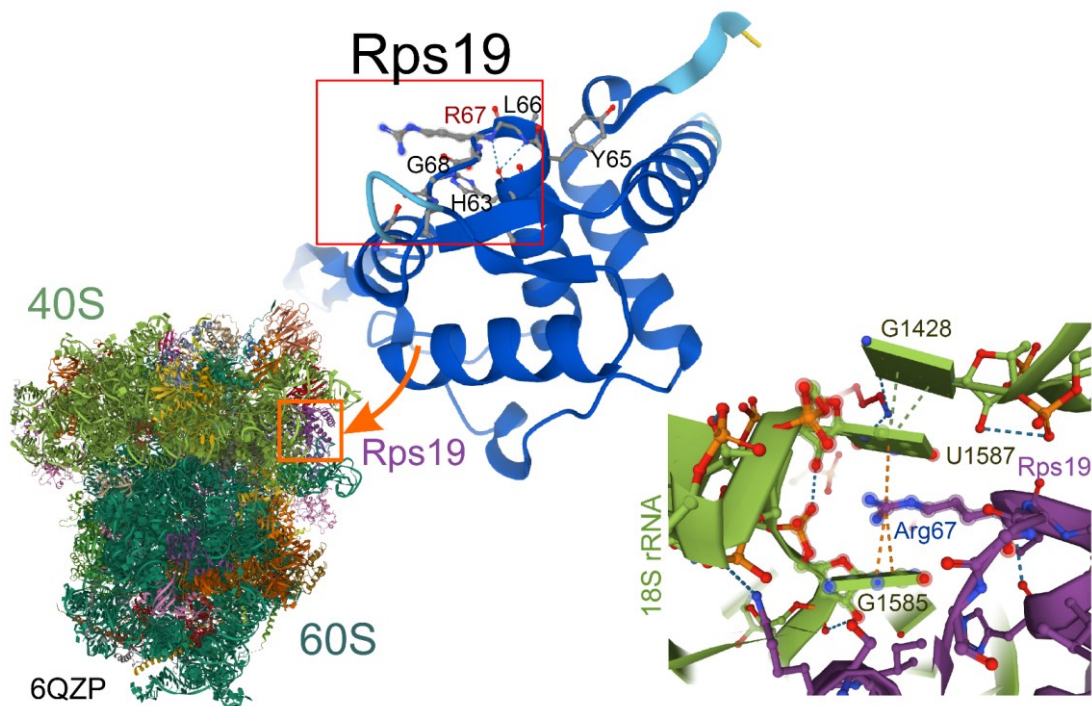
### 3.5.1 Myší model $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$

Ve své diplomové práci pracuji s myším modelem s mutací v genu *Rps19*, na jehož vzniku se podílela naše laboratoř. Tento myší model má deletovaný arginin na pozici 67, což je vysoce konzervovaná aminokyselina. Tato mutace se nachází poblíž DBA hotspotu, tedy místa, které je často mutováno v případě onemocnění DBA (Gregory et al., 2007).



**Obr. 6:** Mutace v myším *Rps19* lokusu pomocí TNALENové mutagenázy, která má za následek delecí argininu 67 (R67), který je kódovaný v exonu 4, bez narušení čtecího rámce. Seřazení reprezentativních sekvencí ukazujících odpovídající úsek kódující RPS19 protein u různých Eukaryotických a Archea druhů. Konzervovaný arginin 67 je označen červenou hvězdičkou. (T = turn,  $\beta$  = beta sheet) (vytvořeno Mgr. Jurajem Kokavcem, PhD.)

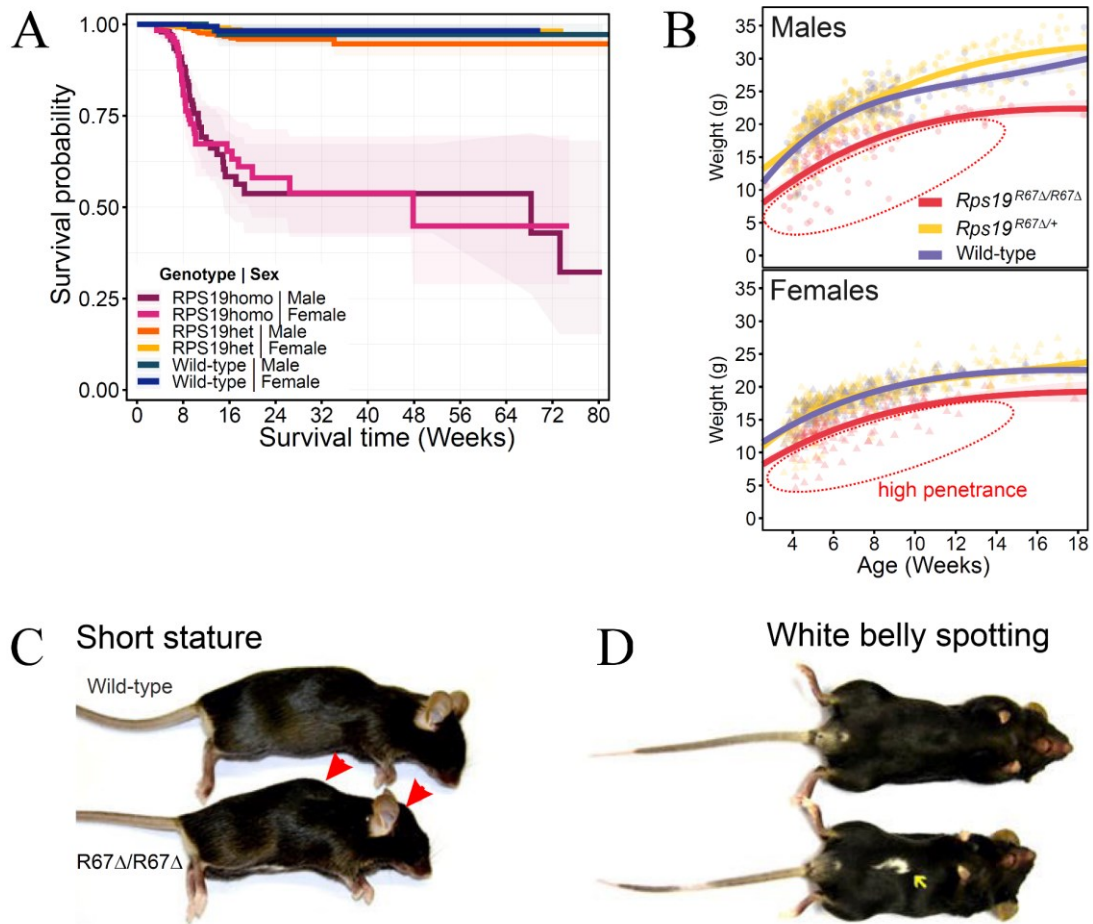
Ve složené malé ribozomální podjednotce boční řetězec argininu 67 interaguje s dvěma nukleotidy 18S rRNA (Jumper et al., 2021), mutace v tomto místě by tedy mohla mít za následek chybné skládání malé ribozomální podjednotky.



**Obr. 7:** 3D zobrazení lidského 80S ribozomu (Natchiar et al., 2017); podrobnější zobrazení myšního RPS19 proteinu, jehož struktura byla předpovězena pomocí Alpha Foldu (Jumper et al., 2021) se zvýrazněnou oblastí aminokyselin v blízkosti argininu 67; podrobnější zobrazení interakcí mezi argininem 67 a 18S rRNA. (vytvořeno Mgr. Jurajem Kokavcem, PhD.)

Heterozygotní myši, které mají tuto mutaci jen na jedné alele, jsou ve všech ohledech srovnatelné s wild-type kontrolami (délka života, plodnost, hmotnost, vývojové defekty). U homozygotních myši  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$  není zvýšená embryonální letalita, jak tomu je u mnoha jiných myších modelů DBA.

Homozygotní myši model  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$  se projevuje fenotypem, který v mnoha ohledech imituje lidské příznaky DBA. Tyto myši mají různé kosterní a kraniofaciální malformace, v některých případech může být ovlivněn i vývoj mozku a neurokrania. Také se u těchto myši vyskytují kardiovaskulární problémy. Rodí se s menší hmotností a v průběhu života rostou pomaleji, zejména samci. Přibližně polovina těchto myši umírá do 20 týdnů věku, ostatní přežívají dlouhodobě. Stejně jako v případě DBA, i fenotyp tohoto myšního modelu může být velmi heterogenní.  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$  myši mají bílou skvrnu na břicho, která byla pozorována i u několika jiných myších modelů DBA (McGowan et al., 2008; Oliver et al., 2004; Watkins-Chow et al., 2013).



**Obr. 8:** **A)** Přežívání kontrolních, heterozygotních  $Rps19^{R67\Delta/+}$  a homozygotních  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$  myší; **B)** průměrný růst kontrolních, heterozygotních a homozygotních myší, rozděleno zvlášť na samce a samice; **C, D)** Kontrolní a homozygotní myš, červenými šipkami je označeno ohnutí v hrudní a šijové oblasti, žlutou šipkou je označena bílá skvrna na bříše. (vytvořeno Mgr. Jurajem Kokavcem, PhD.)

Mnoho předchozích myších modelů ukázalo na důležitou roli p53 v DBA. Myš  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$  byla proto zkřížena s myší s mutací v genu *Trp53*. Takto vytvořené myši  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}Trp53^{-/-}$  nevykazují žádné z příznaků DBA jako  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$  myši. Jejich průměrná hmotnost a rychlost růstu je vyšší než u  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$  myší, ale nižší než u kontrolních wild-type a  $Trp53^{-/-}$  myší. Průměrná délka života je 25 týdnů, což odpovídá přežívání  $Trp53^{-/-}$  myší, které poté umírají v důsledku nádorů.

Pomocí RNA sekvenování bylo objeveno, že u  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$  myší dochází ke zvýšené expresi genů *Zmat3*, *Phlda3* a *Eda2r*. Pomocí single-cell sekvenování byly tyto výsledky potvrzeny, a navíc byly objeveny další dva ovlivněné geny – *Cdkn1a* (p21) a *Ccng1* (cyklin G1). Všechny tyto geny jsou ovlivňovány pomocí p53 (Biegging-Rolett et al., 2020; Brosh et al., 2010; Dulic et al., 1994; el-Deiry et al., 1993; Kawase et al., 2009; Kimura and Nojima, 2002; Okamoto and Beach, 1994).

## 4 Cíle

- popis změn v erytropoéze u myšího modelu Diamondovy-Blackfanovy anémie  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$
- zjištění vlastností hematopoetických kmenových buněk myšího modelu  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$  a popis změn v hematopoetických a progenitorových buňkách
- sledování vlivu mutace v *Trp53* na myší model  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$  a popis vlastností myšího modelu  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}Trp53^{-/-}$

## 5 Materiály

### 5.1 Zvířata

Experimenty byly prováděny na myších (*Mus musculus*) chovaných v CCP (České centrum pro fenogenomiku), s potravou a vodou *ad libitum*.

- Myši kmene C57BL/6N
- Myši kmene C57BL/6N s mutací Rps19<sup>R67Δ/R67Δ</sup>
- Myši kmene C57BL/6N s leukocytovým markerem CD45.1 (B6.SJL–Ptprca Pepcb/BoyJ) (The Jackson Laboratory)
- Trp53 knockout (B6.129S2-Trp53tm1Ty/J) poskytnutý Dr. Winfriedem Eldelmannem (Albert Einstein College of Medicine, NY)

Všechny experimenty se zvířaty byly prováděny v souladu se zákonem o ochraně zvířat proti týrání (246/1992 Sb) a s Evropskou směrnicí 86/609/EEC.

### 5.2 Přístroje

Analytické váhy ALJ 220-4 (KERN)

BD LSRFortessa™ Cell Analyzer (Becton Dickinson)

Bioanalyzátor 2100 Bioanalyzer Instrument (Agilent)

Centrifuga 5415R (Eppendorf)

Centrifuga 5810R (Eppendorf)

Hemolytický analyzátor BC 5300 Vet (Mindray)

LightCycler 480 II (Roche)

Magnetický míchač Heating Magnetic Stirrer (Velp Scientifica)

Magnetický stojan NeoGeneStar™ MultiForm MiniMagSlide™ (NeoGeneStar)

Multifunkční modulární reader Infinite M200 PRO (Tecan)

R500 Small Animal Anesthesia Machine (RWD Life Science)

Spektrofotometr NanoDrop ND-1000 (Thermo Science)

Stolní centrifuga Prism Mini Centrifuge (Sigma-Aldrich)

Termoblok AccuBlock Digital Dry Bath (Labnet)

Termoblok ThermoCell MixingBlock (Bioer)

Termocykler T100 Thermal Cycler (Bio-Rad)

Vortex WIZARD IR Infrared Vortex Mixer (Velp Scientifica)



## 5.3 Chemikálie

### 5.3.1 Komerční kity

DNA-free™ DNA Removal Kit (Thermo Fisher Science)

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Science)

iQ™ SYBR Green Supermix (Bio-rad)

NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina® (Dual Index Primer Set 1) (New England BioLabs)

NEBNext® Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (New Endgland BioLabs)

NEBNext® Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina® (New England BioLabs)

SPRIselect (Backman Coulter)

### 5.3.2 Další chemikálie

Aeranne Isoflurane (Baxter)

Albumin Fraction V, biotin-free (Carl Roth)

EDTA disodium salt dehydrate (VWR)

Ethanol absolutní (Penta)

Ethanol 70% (m/m) (Penta)

Fenol (Sigma-Aldrich)

Glycogen, RNA grade (Thermo Fisher Science)

Chloroform (Penta)

Isoamylalkohol (Penta)

Isopropanol (Penta)

Proteinkináza K (Sigma Aldrich)

RNase free H<sub>2</sub>O

TrisBaze (Amresco)

TRIZol® Reagent (Thermo Fisher Science)

Zoletil (Virbac)

## 5.4 Roztoky a média

0,5 M EDTA (pH 8,0)

80% EtOH

1 M NaCl

1x PBS

10% SDS

1 M Tris-HCl (pH 8,5/7,5)

### **PBS/BSA**

PBS	0,5 l
Albumin	2,5 g
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	2 ml

### **DNA Digestion pufr**

Tris-HCl (1 M, pH 8,5)	20 ml
NaCl (1M)	40 ml
EDTA (0,5M, pH 8,0)	2 ml
SDS (10 %)	4 ml
ddH <sub>2</sub> O	134 ml

### **TE pufr**

Tris-HCl (1 M, pH 7,5)	1 ml
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	0,2 ml
ddH <sub>2</sub> O	doplnit do 100 ml

## 5.5 Software

Excel (Microsoft)

FACSDiva Software (BD Bioscience)

FlowJo Software (LLC)

Inkscape

LightCycler 480 SW 1.5.1 (Roche Life Science)

RStudio + balíčky v R Bioconductor (tidyverse, DESeq2)

## 5.6 Protílátky pro průtokovou cytometrii

**Tabulka 2:** Používané protílátky pro průtokovou cytometrii.

Marker	Fluorochrom	Klon	Výrobce
B220	FITC	RA3-6B2	BioLegend
CD4	APC	GK1.5	BioLegend
CD8a	APC	53-6.7	BioLegend
CD11b (Mac-1)	BV421	M1/70	BioLegend
CD16/32	BV510	93	BioLegend
CD34	biotin	MEC14.7	BioLegend
CD44	FITC	IM7	BioLegend
CD45	PE-Cy7	30-F11	BioLegend
CD45.1	AlexaFluor700	A20	BioLegend
CD45.2	PE-Cy7	104	BioLegend
CD48	FITC	HM48-1	BioLegend
CD71	PE	RI7217	BioLegend
CD117	BV421	2B8	BioLegend
CD127 (IL7R)	BV785	A7R34	BioLegend
CD135 (FLT3)	APC	A2F10	BioLegend
CD150	BV605	TC15-12F12.2	BioLegend
Gr-1	BV605	RB6-8C5	BioLegend
Lineage cocktail (LIN+)	AlexaFluor700	17A2; RB6-8C5; RA3-6B2; Ter-119; M1/70	BioLegend
NK1.1	PE	PK136	BioLegend
Propidium iodide (PI)	PE/TexasRed		BioLegend
Sca-1	PE	D7	BioLegend
Streptavidin	PE-Cy7		BioLegend
Ter119	PerCP	TER-119	BioLegend
Ter119	APC	TER-119	BioLegend

## 5.7 Primery

**Tabulka 3:** Seznam použitých primerů pro qPCR reakci.

<b>Primer</b>	<b>Sekvence</b>
Bax – F	CCTTTTTGCTACAGGGTTTC
Bax – R	ATATTGCTGTCCAGTTCATC
Bbc3 – F	ACAATCTCTTCATGGGACTC
Bbc3 – R	TACATGGTGCAGAAAAAGTC
Ccna2 – F	AGCAATGTTTTTGGGAGAAC
Ccna2 – R	AGGGTATATCCAGTCTGTTG
Ccnd2 – F	ATGATGAAGTGAACACACTC
Ccnd2 – R	CTTTGAGACAATCCACATCAG
Ccne1 – F	CAAAACTTGAGGAAATCTACCC
Ccne1 – R	CCACTTGGACATAGACATTC
Ceng1 – F	AACATTCCAAGATAAGTGGC
Ceng1 – R	GTCCAGACACAATCCATTTC
Cdkn1a – F	ACCTGATGATACCCAACACTAC
Cdkn1a – R	CTGTGGCACCTTTTATTCTG
Cdkn1b – F	ATCTGCCTCTAAAAGCATTG
Cdkn1b – R	CCATCCCTAACGTTTATGTG
Eda2r – F	AAGTTTTCCAGCTCTATCCC
Eda2r – R	GAAAGAGACCTTTCTAGTTCAC
mGapdh – F	ACTTTGTCAAGCTCATTTCCTGGTATG
mGapdh – R	TTTCTTACTCCTTGGAGGCCATGTAG
mGata1 – F	GAATCCTCTGCATCAACAAGC
mGata1 – R	GGGCAAGGGTTCTGAGGT
mHprt – F	GCTGGTGAAAAGGACCTCT
mHprt – R	CACAGGACTAGAACACCTGC
Phlda3 – F	GAGGCGTATCATTTTATCGAC
Phlda3 – R	CTCATGTTGATAGCTTCTGG
Zfp3612 – F	CAGGACCCAGAAAAATGTC
Zfp3612 – R	GATTTCTCCGTCTTGCAC
Zmat3 – F	GCACACTATCAGGGTAAAAAC
Zmat3 – R	ACAGTAGTCATTCTCTGTA

## **6 Metody**

### **6.1 Příprava buněčných suspenzí**

#### **6.1.1 Izolace buněk ze sleziny, kostní dřeně a jater**

Po usmrcení myši cervikální dislokací jim byla vypreparována kostní dřeň ze stehenních a holenních kostí, slezina a játra. S orgány bylo dále pracováno na ledu. Slezina byla zvážena a následně homogenizována pomocí sítky v 1 ml vychlazeného PBS. Velký lalok jater byl homogenizován pomocí sítky ve 2 ml vychlazeného PBS. Kostní dřeň byla vypláchnuta z obou stehenních a holenních kostí 1 ml PBS pomocí jehly a pipetou byla homogenizována. Všechny vzorky byly nakonec přefiltrovány. Pomocí hemolytického analyzátoru byla změřena buněčnost sleziny, brzlíku a kostní dřeně.

#### **6.1.2 Izolace buněk z fetálních jater**

Embrya ve věku 14.5 dne (E14.5) byla vypreparována z usmrcené myši. Z embryí byla vypreparována fetální játra, která byla poté homogenizována v 1 ml PBS. Pomocí hemolytického analyzátoru byla změřena buněčnost. Z embryí byla odebrána část tkáně pro následné genotypování.

## **6.2 Průtoková cytometrie**

#### **6.2.1 Barvení buněk ze sleziny, kostní dřeně a fetálních jater**

Při barvení pro průtokovou cytometrii panelem na erytropoézu (CD45 – PE-Cy7, CD44 – FITC, CD117 – BV421, CD71 – PE, Ter119 – APC) bylo použito  $5-10 \cdot 10^6$  buněk z kostní dřeně, sleziny nebo fetálních jater. Pro barvení panelem na buněčné linie (CD45 – PE-Cy7, B220 – FITC, CD4 – APC, CD8a – APC, CD11b (Mac-1) – BV421, Gr-1 – BV605, NK1.1 – PE, Ter119 – PerCP) bylo použito  $5-10 \cdot 10^6$  buněk z kostní dřeně či sleziny.

Tato množství byla napipetována do zkumavek pro průtokovou cytometrii. Do každé zkumavky byly přidány 3 ml vychlazeného PBS/BSA. Vzorky byly stočeny na centrifuze (5 minut, 350 g, 4 °C) a poté byl slit supernatant. Do každého vzorku byla přidána směs protilátek dle Tabulky 4 ve 20  $\mu$ l PBS/BSA. Po promíchání byly vzorky nechány na ledu ve tmě po dobu 30 minut, během kterých byly několikrát promíchány. Ke vzorkům byly přidány 3 ml PBS/BSA a následně byly centrifugovány (5 minut, 350 g, 4 °C). Poté byl odlit supernatant. Buňky byly následně resuspendovány ve 200  $\mu$ l PBS/BSA s 0,2  $\mu$ l PI (PE/TexasRed). Po přefiltrování byly vzorky změřeny na průtokovém cytometru. Naměřená data byla analyzována pomocí softwarů FACSDiva a FlowJo.

### **6.2.2 Barvení buněk kostní dřeně panelem LSK**

Do zkumavek pro průtokovou cytometrii bylo napipetováno 500 µl buněčné suspenze z kostní dřeně vyizolované z obou stehenních i holenních kostí. Po promytí (3 ml PBS/BSA, centrifugace; stejně jako je uvedeno výše) byla do každé zkumavky přidána směs protilátek ve 20 µl PBS/BSA dle Tabulky 4, kromě Streptavidinu (LIN+ – AlexaFluor700, CD117 (e-Kit) – BV421, Sca1 – PE, CD48 – FITC, CD150 – BV605, CD16/CD32 – BV510, CD34 – biotin, CD135 (FLT3) – APC, CD127 (IL7R) – BV785). Po 30 minutách ve tmě byly vzorky promyty (opět dle postupu popsáno výše) a byl přidán Streptavidin (PE-Cy7). Po dalších 20 minutách byly vzorky opět promyty, resuspendovány v PBS/BSA s PI (PE/TexasRed) a změřeny pomocí průtokového cytometru.

### **6.2.3 Barvení periferní krve**

Uspaným myším bylo z retroorbitálního sinu odebráno 4–6 kapek krve do zkumavek s EDTA, zkumavka byla poté okamžitě protřepána. 50 µl krve bylo přefiltrováno na 96 jamkovou destičku (U-bottom). Do každého vzorku byla napipetována směs protilátek, dle panelu pro periferní krev v Tabulce 4 (CD45 – PE-Cy7, B220 – FITC, CD4 – APC, CD8a – APC, CD11b (Mac-1) – BV421, Gr-1 – BV605, NK1.1 – PE). Vzorky byly poté promíchány na vortexu a na 20 minut uloženy do tmy. Do každé jamky bylo poté napipetováno 150 µl PBS/BSA, destička byla centrifugována při pokojové teplotě (5 minut, 350 g) a následně byl odpipetován supernatant. Tento krok promývání byl ještě jednou zopakován. Do každé jamky bylo poté napipetováno 150 µl PBS/BSA. Vzorky byly poté změřeny na průtokovém cytometru. Naměřená data byla analyzována pomocí softwarů FACSDiva a FlowJo.

### 6.3 Barvení pro průtokovou cytometrii

Tabulka 4: Použité panely protilátek pro barvení pro průtokovou cytometrii.

#### Panel na periferní krev

Marker	Fluorochrom	Objem
CD45	PE-Cy7	0,33 µl
B220	FITC	0,33 µl
CD4	APC	0,25 µl
CD8a	APC	0,25 µl
CD11b (Mac-1)	BV421	0,25 µl
Gr-1	BV605	0,25 µl
NK1.1	PE	0,5 µl

#### Panel na erytropoézu

Marker	Fluorochrom	Objem
CD45	PE-Cy7	0,4 µl
CD44	FITC	0,4 µl
CD117	BV421	0,4 µl
CD71	PE	0,4 µl
Ter119	APC	0,4 µl

#### Panel na buněčné linie

Marker	Fluorochrom	Objem
CD45	PE-Cy7	0,33 µl
B220	FITC	0,33 µl
CD4	APC	0,25 µl
CD8a	APC	0,25 µl
CD11b (Mac-1)	BV421	0,25 µl
Gr-1	BV605	0,25 µl
NK1.1	PE	0,5 µl
Ter119	PerCP	0,5 µl

#### Panel na LSK

Marker	Fluorochrom	Objem
LIN+	AlexaFluor700	4 µl
CD117 (e-Kit)	BV421	1 µl
Sca-1	PE	1 µl
CD48	FITC	1 µl
CD150	BV605	1 µl
CD16/32	BV510	1 µl
CD34	biotin	1 µl
CD135 (FLT3)	APC	1 µl
CD127 (IL7R)	BV785	1 µl
Streptavidin	PE-Cy7	1 µl

#### Panel na periferní krev po transplantaci

Marker	Fluorochrom	Objem
CD45.1	AlexaFluor700	0,33 µl
CD45	PE-Cy7	0,33 µl
B220	FITC	0,33 µl
CD4	APC	0,25 µl
CD8a	APC	0,25 µl
CD11b (Mac-1)	BV421	0,25 µl
Gr-1	BV605	0,25 µl
NK1.1	PE	0,5 µl

#### Panel na erytropoézu po transplantaci

Marker	Fluorochrom	Objem
CD45.1	AlexaFluor700	0,4 µl
CD45.2	PE-Cy7	0,4 µl
CD44	FITC	0,4 µl
CD117	BV421	0,4 µl
CD71	PE	0,4 µl
Ter119	APC	0,4 µl

#### Panel na buněčné linie po transplantaci

Marker	Fluorochrom	Objem
CD45.1	AlexaFluor700	0,33 µl
CD45.2	PE-Cy7	0,33 µl
B220	FITC	0,33 µl
CD4	APC	0,25 µl
CD8a	APC	0,25 µl
CD11b (Mac-1)	BV421	0,25 µl
Gr-1	BV605	0,25 µl
NK1.1	PE	0,5 µl
Ter119	PerCP	0,5 µl

## 6.4 Transplantace kostní dřeně

### 6.4.1 Příprava buněk k transplantaci

Pro transplantaci byly použity kontrolní myši linie CD45.1 a myši se zkoumanými genotypy linie CD45.2 (wild-type,  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$ ,  $Trp53^{-/-}$  a  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}Trp53^{-/-}$ ) ve věku 8 týdnů. Zvířata byla usmrcena cervikální dislokací a ze stehenních, holenních a pažních kostí byla vyizolována kostní dřeň. Pomocí hemolytického analyzátoru byla změřena buněčnost. Buněčné suspenze z kostních dření byly následně smíchány tak, aby poměr CD45.1 a CD45.2 buněk byl 1:1 (a při dalším opakování experimentu 1:3). Tato směs buněk byla poté naředěna PBS do koncentrace  $10^7$  buněk/ml. Tím byly vytvořeny čtyři buněčné suspenze, z nichž každá obsahovala buňky CD45.1 a buňky CD45.2 jednoho ze čtyř výše zmíněných genotypů.

### 6.4.2 Aplikace buněk kostní dřeně

Myši linie CD45.1 byly letálně ozářeny dávkou 8,5 Gy. Po dvou hodinách bylo myším uspaným intramuskulární aplikací sedativního anestetika pro laboratorní zvířata (Zoletil) do retroorbitálního sinu aplikováno 300  $\mu$ l připravené směsi buněk izolovaných z kostní dřeně, tj.  $1,5 \cdot 10^6$  buněk z CD45.1 myší a  $1,5 \cdot 10^6$  buněk z CD45.2 myší, celkem tedy  $3 \cdot 10^6$  buněk. Myším byla následně v měsíčních intervalech v inhalační anestezii (Isofluran) odebírána krev a vyhodnocována na hemolytického analyzátoru a pomocí průtokové cytometrie. Postup barvení byl stejný jako u periferní krve (viz kapitola 6.2.3) s tím rozdílem, že při barvení byl použit panel na periferní krev po transplantaci (CD45.1 – AlexaFluor700, CD45.2 – PE-Cy7, B220 – FITC, CD4 – APC, CD8a – APC, CD11b (Mac-1) – BV421, Gr-1 – BV605, NK1.1 – PE). Po 4 měsících byly myši utraceny a byla z nich odebrána slezina a kostní dřeň pro měření na průtokovém cytometru. Postup byl stejný jako u jiných myší (viz kapitola 6.2.1), při barvení byl použit panel na buněčné linie po transplantaci (CD45.1 – AlexaFluor700, CD45.2 – PE-Cy7, B220 – FITC, CD4 – APC, CD8a – APC, CD11b (Mac-1) – BV421, Gr-1 – BV605, NK1.1 – PE, Ter119 – PerCP) a panel na erythropoézu po transplantaci (CD45.1 – AlexaFluor700, CD45.2 – PE-Cy7, CD44 – FITC, CD117 – BV421, CD71 – PE, Ter119 – APC).

## 6.5 Izolace DNA pro genotypování

Část tkáně z myších embryí byla umístěna do zkumavky, do které bylo přidáno 500  $\mu$ l DNA Digestion Buffer a proteinkináza K do koncentrace 0,2 mg/ml (10  $\mu$ l proteinkinázy K – stock solution 10 mg/ml). Vzorky se inkubovaly na třepačce při 55 °C, dokud se tkáň zcela nerozpustila. Vzorky byly poté krátce stočeny a bylo k nim přidáno 500  $\mu$ l směsi fenol/chloroform/isoamylalkohol (25:24:1). Zkumavky byly následně v ruce promíchány.



Následně byly vzorky stočeny při pokojové teplotě (3,5 minuty, 13 000 g) a horní vodná fáze byla přepipetována do nové zkumavky. Ke vzorku bylo přidáno 500 µl vychlazeného 98 % EtOH. Se zkumavkou bylo následně několikrát otočeno, dokud se nezačala viditelně srážet DNA. Poté byly vzorky stočeny (3,5 minuty, 13 000 g) a byl slit supernatant. Ke každému vzorku bylo přidáno 500 µl vychlazeného 70 % EtOH a následně byl opět stočen se stejným nastavením. Po slití supernatantu byly zkumavky nechány otevřené hlavou dolů, dokud nevyschly zbytky etanolu. Poté bylo ke každému vzorku přidáno 200 µl TE pufru a následně byly vzorky odeslány ke genotypování.

## 6.6 Analýza RNA

Vyzolované buňky z kostní dřeně, jater a fetálních jater v PBS/BSA byly centrifugovány (5 minut, 2 000 g, 4 °C) a následně byl odpipetován supernatant. Po rozbití pelety byl ke vzorku přidán 1 ml TRIZOLu a vzorek v něm byl rozpuštěn. Následně se inkuboval 5 minut při pokojové teplotě. Bylo přidáno 200 µl chloroformu, vzorek byl promíchán na vortexu a následně inkubován 2–3 minuty při pokojové teplotě. Poté byl centrifugován (15 minut, 12 000 g, 4 °C). Po stočení byla horní vodná fáze přepipetována do zkumavky s 540 µl chloroformu, zvortexována a opět centrifugována se stejnými parametry. Poté byla horní vodná fáze přepipetována do zkumavky s 500 µl izopropanolu a 2,5 µl glykogenu. Po promíchání byl vzorek nechán 10 minut při pokojové teplotě. Poté byl centrifugován (10 minut, 12 000 g, 4 °C) a následně byl slit supernatant. Peleta byla poté promyta v 1 ml 75% EtOH.

Vzorek byl centrifugován (5 minut, 10 000 g, 4 °C) a následně byl odpipetován supernatant. Vzorek byl poté nechán při pokojové teplotě vyschnout. Následně bylo postupováno dle protokolu k DNA-free™ DNA Removal Kit (Thermo Fisher Science) – ke vzorku bylo přidáno 20 µl RNase free H<sub>2</sub>O, 2 µl 10x DNase I Buffer a 1 µl rDNase I a vzorek byl promíchán. Poté se inkuboval 30 minut ve 37 °C. Do vzorku byly přidány 2 µl DNase Inactivation Reagent a byl nechán 2–3 minuty při pokojové teplotě, během kterých byl několikrát zamíchán. Poté byl centrifugován (2 minuty, 10 000 g, 4 °C). Supernatant byl přepipetován do nové zkumavky.

Na přístroji NanoDrop byla změřena koncentrace vzorku a poté byl naředěn RNase free H<sub>2</sub>O do koncentrace 400 mg/µl. 3 µl vzorku byly poté použity pro měření RNA na bioanalyzátoru (Agilent 2100 Bioanalyzer).

## 6.7 qPCR

Do stripu byly napipetovány 2 µg RNA, tj. 5 µl připravených vzorků naředěných do koncentrace 400 mg/µl (viz postup v kapitole 6.6). Ke každému vzorku byla přidána RNase free H<sub>2</sub>O do celkového objemu 10 µl. Poté byl připraven RT Master Mix dle protokolu k High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Science), podle kterého bylo dále postupováno.

### **RT Master Mix**

10x RT Buffer	2 µl
25x dNTP Mix (100 mM)	0,8 µl
10x RT Random Primers	2 µl
MultiScribe Reverse Transcriptase	1 µl
RNase Inhibitor	1 µl
RNase free H <sub>2</sub> O	3,2 µl

Ke každému vzorku bylo napipetováno 10 µl RT Master Mixu, následně byly vzorky promíchány a stočeny na stolní centrifuze. Poté byly vzorky vloženy do termocykleru s následujícím nastavením:

**Tabulka 5:** Nastavení termocykleru při přepisu RNA do cDNA.

	Krok 1	Krok 2	Krok 3	Krok 4
Teplota	25°C	37°C	85°C	4°C
Čas	10 min	120 min	5 min	∞

Získané cDNA bylo naředěno ddH<sub>2</sub>O do 100 µl. Do každé jamky 384-jamkové destičky bylo napipetováno 5 µl Primer Mixu a 5 µl cDNA Mixu.

### **Primer Mix**

iQ SYBR Green Supermix	2,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	2 µl
primer Forward x Reverse (10 µM)	0,5 µl

### **cDNA Mix**

iQ SYBR Green Supermix	2,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	2,25 µl
cDNA (20 µg/ml)	0,25 µl

Vzorky byly na destičky pipetovány vždy v triplikátech (tříkrát kombinace stejného vzorku a primeru). Destička byla vložena do přístroje LightCycler 480 II s následujícím nastavením:

**Tabulka 6:** Nastavení LightCycleru 480 II pro qPCR.

pre-inkubace 1	50°C	2 min
pre-inkubace 2	95°C	10 min
amplifikace (45x)	95°C	15 s
	60°C	1 min
	72°C	10 s
melting curve	95°C	5 s
	65°C	1 min
	97°C	0,11°C/s
cooling	37°C	2,5°C/s

Výsledky měření byly vyhodnoceny v programu LightCycler 480 SW.

## 6.8 RNA sekvenování

K sekvenování RNA byly použity buňky z fetálních jater (viz kapitola 6.1.2). RNA bylo získáno stejně jako v kapitole 6.6. Měřením na bioanalyzátoru (Agilent 2100 Bioanalyzer) byla ověřena kvalita vzorků ( $RIN \geq 9,5$ , doporučené minimum kvality je  $RIN > 7$ ) a jejich koncentrace. Dále bylo postupováno podle protokolu ke kitu NEBNext® Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina®, který je k dispozici na stránkách výrobce ([https://international.neb.com/-/media/nebus/files/manuals/manuale7760\\_e7765.pdf](https://international.neb.com/-/media/nebus/files/manuals/manuale7760_e7765.pdf)) [posl. přístup 9.8.2022].

Vzorky byly naředěny nuclease free H<sub>2</sub>O do objemu 50 µl tak, aby každý obsahoval 1 µg RNA. Pomocí kitu NEBNext® Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module byly vzorky vyčištěny od nadbytku rRNA. Pomocí magnetické separace bylo ze vzorků separováno poly(A)+ RNA, které reprezentuje mRNA populaci. Následně byla provedena syntéza prvního řetězce cDNA. Nastavení termocyklieru bylo ponecháno dle protokolu, tj. pro fragmenty RNA < 200 bází. Poté byla provedena syntéza druhého řetězce cDNA a purifikace cDNA za pomoci SPRIselect Beads.

Poté bylo provedeno naštěpení cDNA a následně proběhla adaptorová ligace, při které byl použit NEBNext Adaptor z kitu NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina® (Dual Index Primer Set 1) a modrý USER enzym. Následovala purifikace vzorků opět pomocí SPRIselect Beads a poté bylo provedeno PCR obohacení DNA s navázaným adaptorem, při kterém byl použit kit NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina® (Dual Index Primer Set 1), ze kterého byly pro jednotlivé vzorky vybrány různé kombinace i7 (forward) a i5 (reverse) primerů. Na základě množství vstupní RNA (1 µg) bylo provedeno 8 cyklů PCR. Nakonec byly vzorky opět přečištěny pomocí SPRIselect Beads a jejich kvalita byla změřena na bioanalyzátoru Agilent 2100 Bioanalyzer. Vzorky byly poté zkombinovány a odeslány k sekvenování na přístroji NovaSeq6000 v režimu párovaného sekvenování: Index1 – 8 bp, Index2 – 8 bp, Read1 – 111 bp, Read2 – 111 bp.

## 6.9 Statistika a vizualizace dat

S daty bylo pracováno v programu R Studio v programovacím jazyku R, mimo jiné za pomoci balíčků Bioconductor a Tidyverse. Pro porovnávání dvou genotypů mezi sebou byl používán Student's t-test, při porovnávání více genotypů byl používán Dunnett's test. Při měření genotypů wild-type,  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$ ,  $Trp53^{-/-}$  a  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}Trp53^{-/-}$  byly porovnávány všechny genotypy oproti wild-type kontrolám a  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}Trp53^{-/-}$  také oproti  $Trp53^{-/-}$  kontrolám. Signifikance byly do grafů zaneseny následovně: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

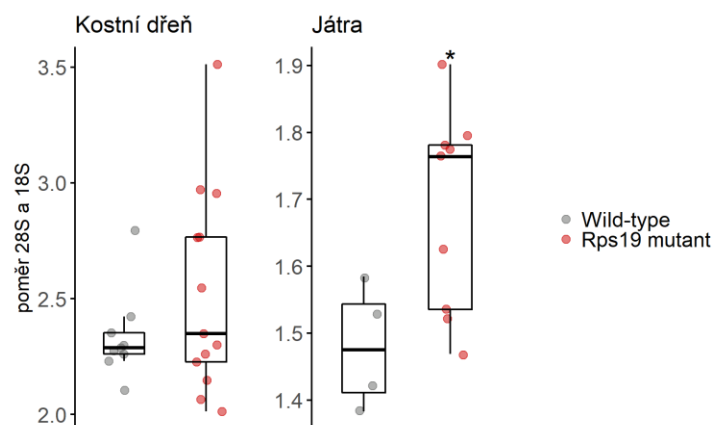
## 7 Výsledky

### 7.1 Analýza složení ribozomální RNA u dospělých myší $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$

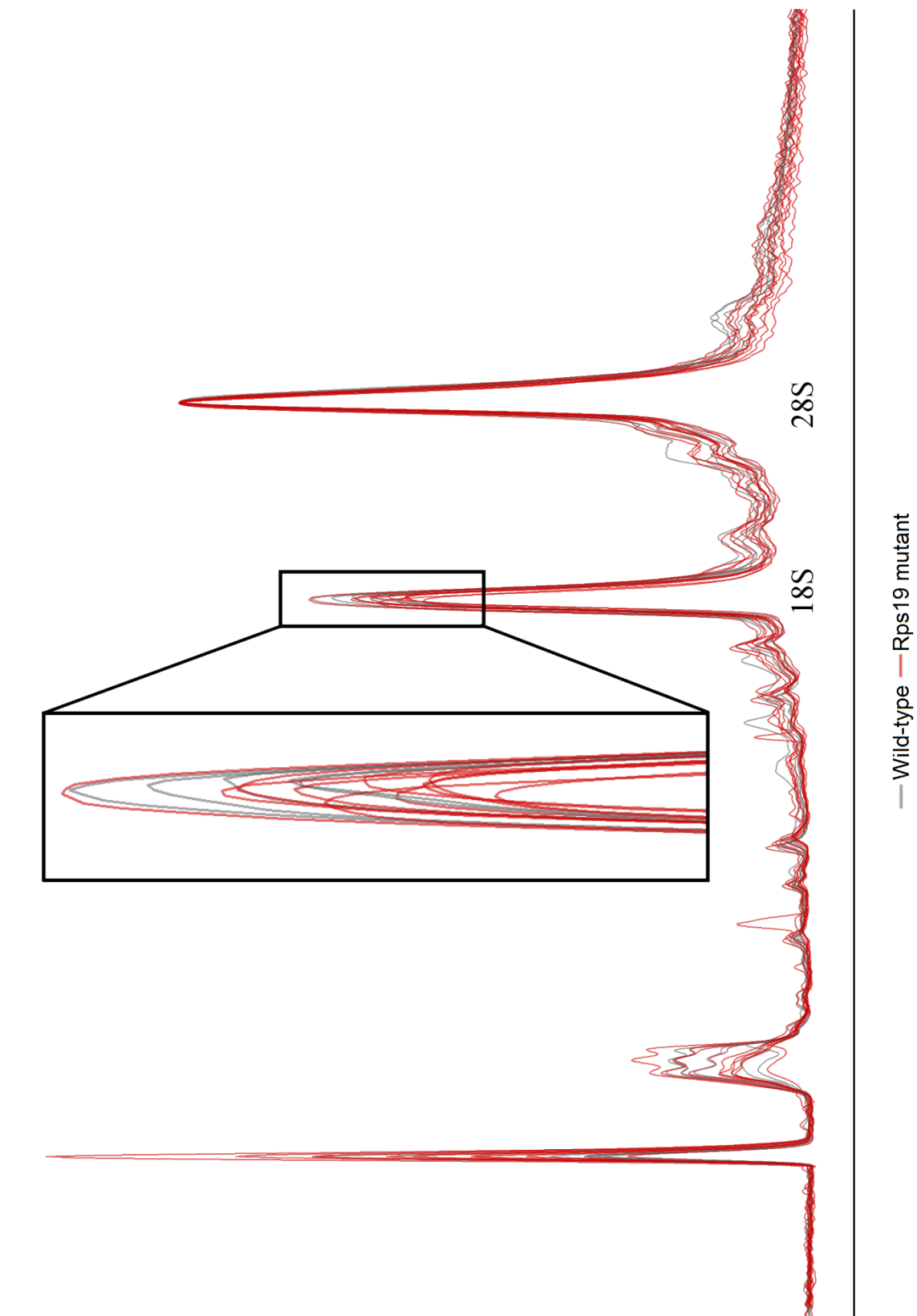
Protein RPS19 se nachází v malé ribozomální podjednotce a arginin 67 interaguje s 18S rRNA. Předpokládali jsme proto, že mutace v tomto místě by mohla mít za následek poruchy ve skládání malé ribozomální podjednotky. Očekávali jsme, že myši  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$  budou z toho důvodu tvořit méně malé ribozomové podjednotky, což by mělo vést k nepoměru mezi množstvím velké a malé podjednotky.

Pomocí elektroforézy jsme na bioanalyzáru Agilent 2100 Bioanalyzer měřili poměr 28S a 18S rRNA. 28S rRNA se nachází ve velké ribozomální podjednotce, zatímco 18S rRNA se nachází v malé ribozomální podjednotce, nepoměr v množství jednotlivých podjednotek by se tedy měl projevit změnou poměru těchto dvou rRNA (Quarello et al., 2016). Protože DBA i další ribozomopatie se často projevují tkáňově specificky, prováděli jsme toto měření z buněk kostní dřeně a jater, tedy hematopoetických orgánů, ve kterých jsme očekávali, že změny budou patrné.

Při měření buněk z kostní dřeně jsme nepozorovali signifikantní rozdíl. V buňkách z jater dochází u  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$  myši ke změně poměru 28S/18S rRNA – tento poměr je u myši s mutací v *Rps19* vyšší, tedy jaterní buňky těchto myši obsahují méně 18S rRNA, z čehož můžeme soudit, že obsahují také méně malých ribozomálních podjednotek v poměru k množství velkých ribozomálních podjednotek než kontrolní myši.



**Obr. 9:** Poměr 28S rRNA a 18S rRNA v kostní dřeni a v játrech u kontrolních wild-type myši (šedě) a  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$  myši (červeně) odpovídající poměru velké a malé ribozomální podjednotky. Statistika: Student's t-test (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ )



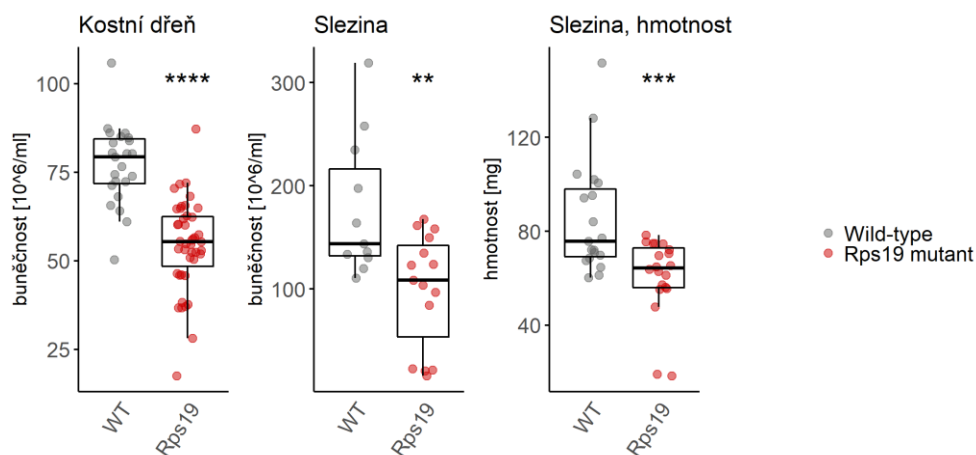
**Obr. 10:** Výsledky elektroforézy z buněk z jater, výsledky jsou srovnány podle peaku 28S (vpravo), na zvětšeném peaku 18S je vidět, že u  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$  myši (červeně) je tento peak v průměru menší než u kontrol (šedě).

## 7.2 Poruchy definitivní krevetvorby v myším modelu $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$

### 7.2.1 Snížená buněčnost kostní dřeně a sleziny

Diamondova-Blackfanova anémie je především poruchou erythropoézy, proto jsme chtěli charakterizovat změny, ke kterým dochází v hematopoetických orgánech našeho myšího modelu. K hlavním hematopoetickým orgánům se řadí kostní dřeň a slezina, zaměřili jsme se proto nejprve na tyto orgány a na to, k jakým změnám v kostní dřeni a slezině dochází u  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$  myši. Pomocí hemolytického analyzátoru jsme změřili jejich buněčnost a slezinu jsme také zvažili na analytických vahách.

U  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$  myši jsme pozorovali výrazně menší buněčnost kostní dřeně i sleziny, stejně jako významně menší hmotnost sleziny.

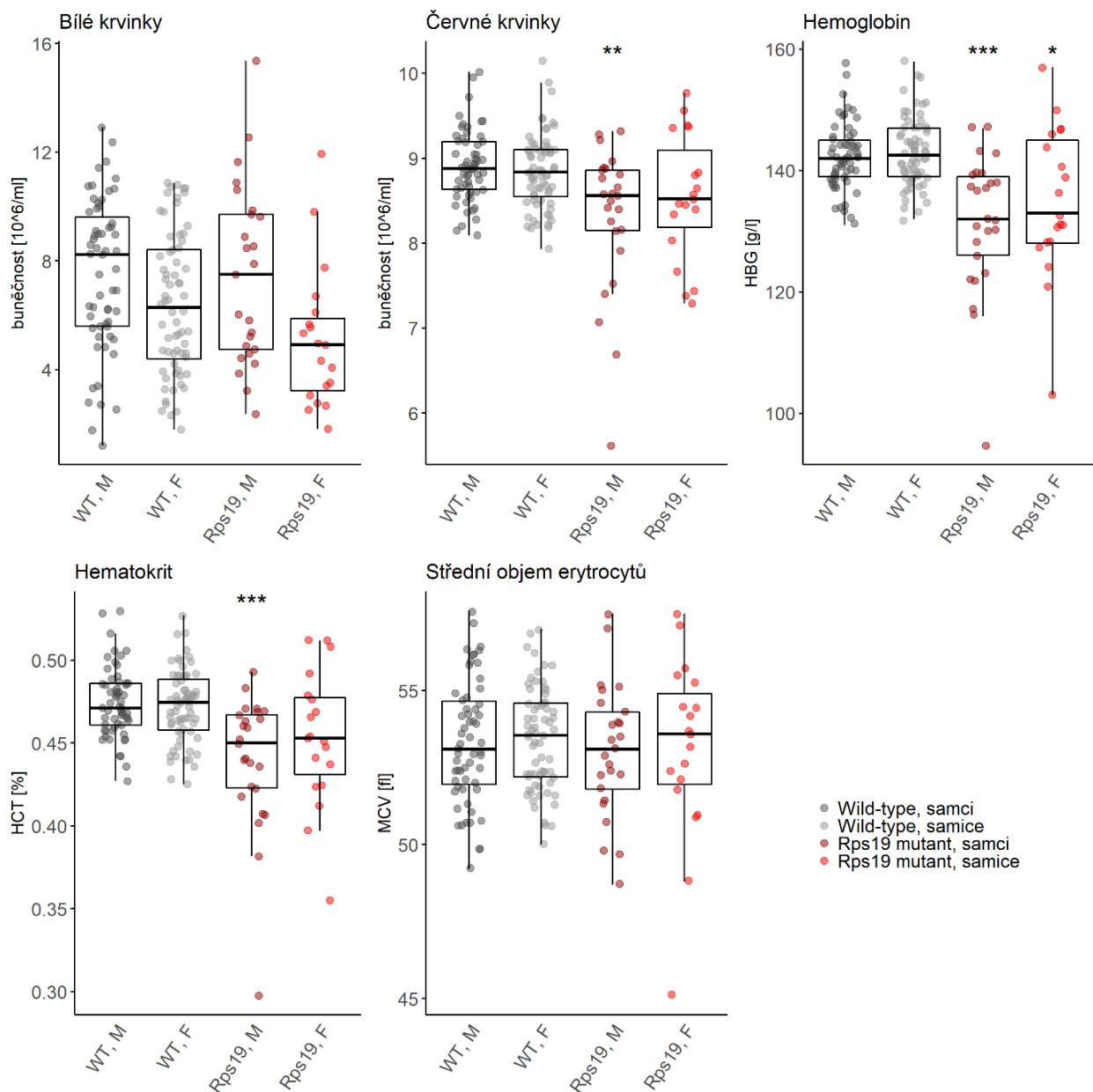


**Obr. 11:** Srovnání buněčnosti kostní dřeně a sleziny a hmotnosti sleziny u wild-type myši (šedě) a  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$  myši (červeně). Statistika: Student's t-test (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ )

## 7.2.2 Změny složení periferní krve u dospělých myši $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$

Dalším krokem v charakterizaci změn v hematopoéze byla analýza periferní krve. Myším byla odebírána krev, která byla vyhodnocována na hemolytickém analyzátoru. Výsledky jsme rozdělili dle genotypů a pohlaví.

Pozorovali jsme snížené množství červených krvinek, hemoglobinu i hematokritu. Rozdíly byly signifikantnější pro samce než samice, jejichž fenotyp je ovlivněn méně. Z měření také vyplývá, že množství bílých krvinek není mutací v *Rps19* ovlivněno.



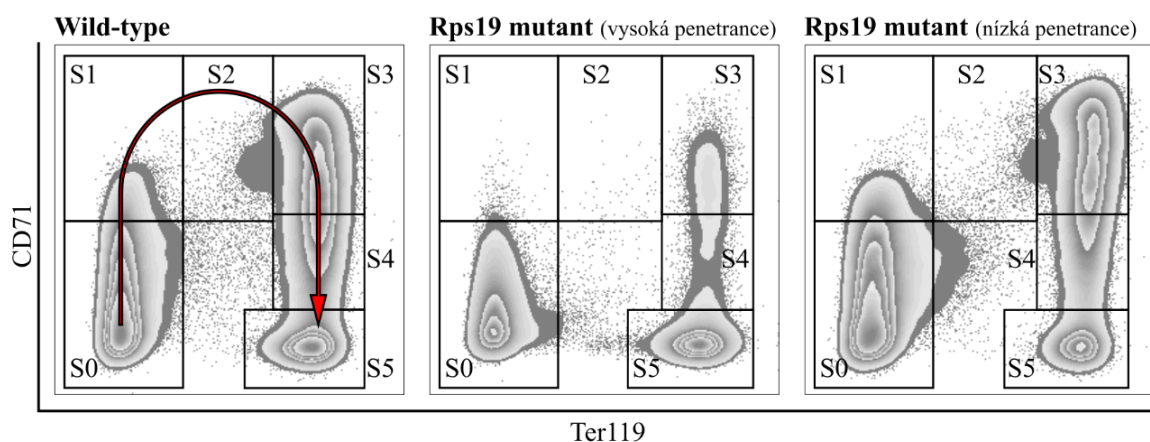
**Obr. 12:** Výsledky měření periferní krve na hemolytickém analyzátoru, rozděleno dle genotypu a pohlaví myši. Statistika: Student's t-test (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ )



### 7.2.3 Změny v průběhu erytropoézy u dospělých myši $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$

Z výsledků výše je zřejmé, že mutace *Rps19* má negativní vliv na hematopoetické orgány i na celkový počet červených krvinek. Následně jsme chtěli zjistit, jak probíhá erytropoéza u našeho myšního modelu a kde v jejím průběhu dochází ke změnám, které mají za následek pozorovaný úbytek červených krvinek.

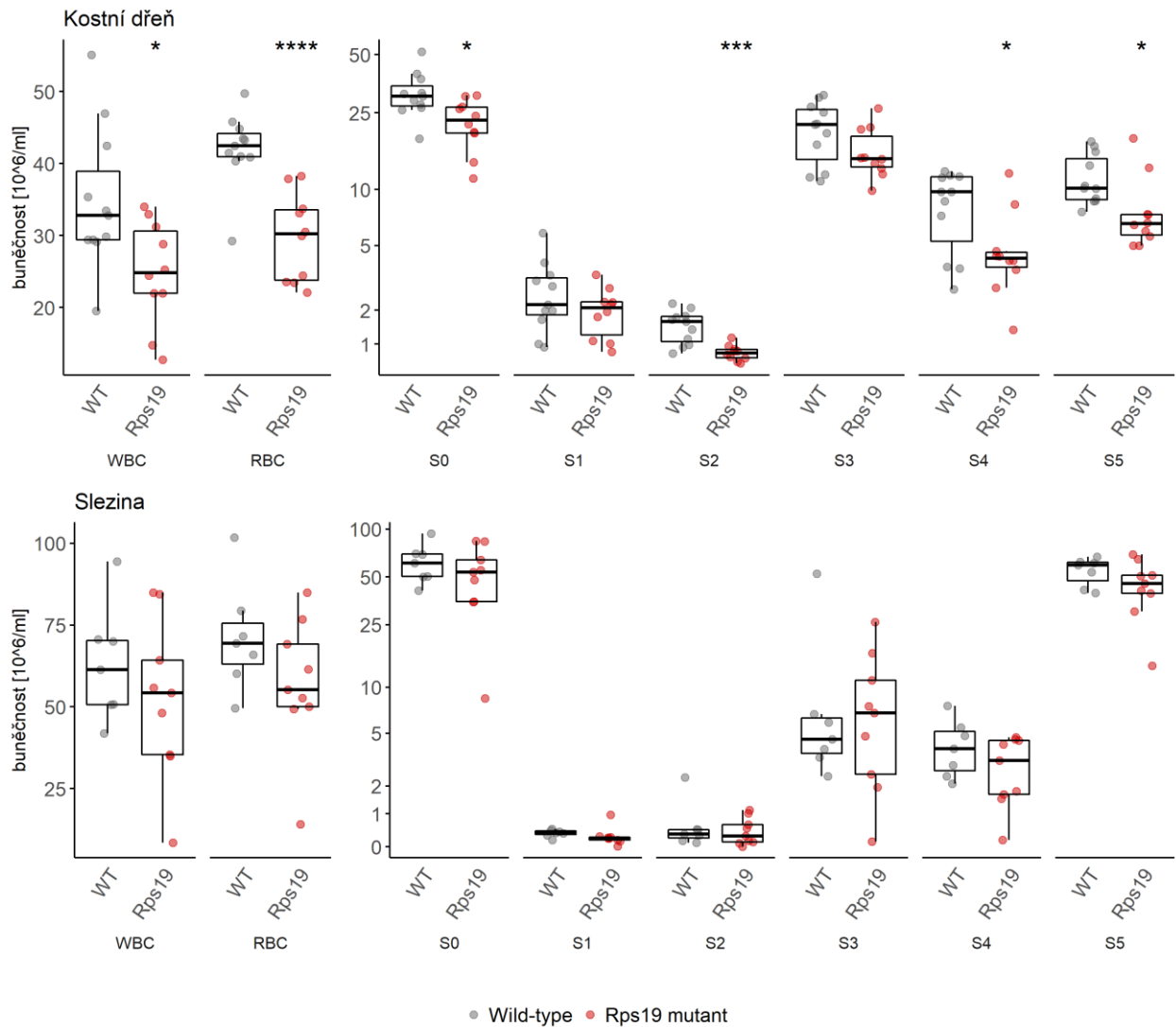
Pomocí průtokové cytometrie jsme sledovali erytropoézu v kostní dřeni a slezině. Pro odlišení červených a bílých krvinek jsme použili markery Ter119 a CD45. Dále jsme na základě markerů CD71 a Ter119 rozdělili červené krvinky do jednotlivých stádií erytropoézy dle dělení používaného Popovou a kol. (Pop et al., 2010).



**Obr. 13:** Ukázka erytropoézy v kostní dřeni, sledováno pomocí markerů CD71 a Ter119 na vygatované populaci červených krvinek, červená šipka naznačuje průběh vývoje erytrocytů; S0 – všechny progenitorové a kmenové buňky, S1 – časné proerytroblasty, S2 – pozdní proerytroblasty, S3 – basofilní erytroblasty, S4 – ortochromatické erytroblasty a retikulocyty, S5 – zralé erytrocyty

Ve shodě s výsledky z měření buněčnosti kostní dřene jsme pozorovali pokles množství červených i bílých krvinek v kostní dřeni u  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$  myši. U červených krvinek dochází k významně větším změnám než v počtu bílých krvinek, které jsou ovlivněny jen minimálně. Pozorujeme tedy zejména poruchy erytropoézy. Z naměřených dat jsme zjistili, že k nejvýznamnějším změnám dochází ve stádiu pozdních proerytroblastů, z čehož můžeme usuzovat, že k poruše erytropoézy dochází právě v tomto stádiu vývoje.

Měřili jsme také erytropoézu ve slezině, kde jsme ovšem oproti kostní dřeni nepozorovali žádné signifikantní rozdíly mezi kontrolními wild-type a  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$  myši.



**Obr. 14:** Erythropoéza v kostní dřeni a slezině sledována pomocí průtokové cytometrie, za použití markerů Ter119 a CD45 pro rozlišení bílých a červených krvinek a pomocí markerů Ter119 a CD71 pro rozlišení stádií erythropoézy. WBC – bílé krvinky, RBC – červené krvinky; S0 – všechny progenitorové a kmenové buňky, S1 – časně proerytoblasty, S2 – pozdní proerytoblasty, S3 – basofilní erytoblasty, S4 – ortochromatické erytoblasty a retikulocyty, S5 – zralé erytrocyty. Statistika: Student's t-test (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ )

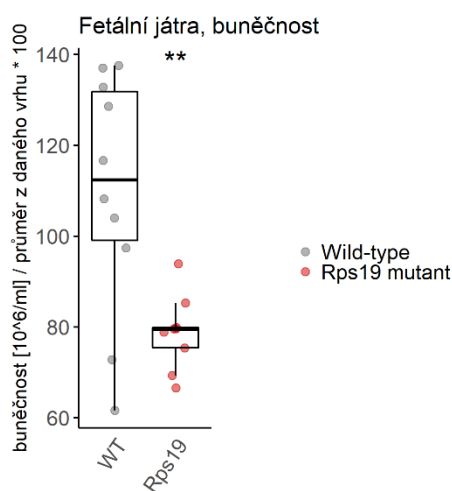
#### 7.2.4 Poruchy fetální erythropoézy u myši $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$

Jedním z častých problémů dosud zkoumaných myších modelů byla embryonální letalita homozygotů. Námi používaný myší model se rodí v očekávaných poměrech, k embryonální letalitě tedy pravděpodobně nedochází. Rozhodli jsme se sledovat erythropoézu ve fetálních játrech, abychom viděli, zda dochází ke změnám již v prenatálním stádiu vývoje.

Pro měření jsme používali embrya ve věku 14,5 dne (E14.5). Pomocí průtokové cytometrie za použití stejných markerů jako u erythropoézy v dospělých myších jsme pozorovali erythropoézu ve fetálních játrech. Pomocí hemoanalyzátoru jsme také měřili buněčnost fetálních jater.

U  $Rps19$  homozygotních embryí ( $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$ ) jsme pozorovali sníženou buněčnost oproti wild-type i  $Rps19$  heterozygotním embryím ( $Rps19^{R67\Delta/+}$ ) ze stejného vrhu. Prosté porovnávání naměřené buněčnosti mezi embryi z různých samic se ukázalo jako problematické, protože i drobné rozdíly ve věku embryí, kterým jsme nedokázali zabránit, měly za následek významně vyšší či nižší buněčnost v průměru v celém vrhu, porovnávali jsme proto buněčnost ve vztahu k průměrné buněčnosti embryí daného vrhu.

V erythropoéze jsme pozorovali rozdíly mezi kontrolními a  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$  embryi způsobené celkově nižší buněčností fetálních jater u  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$  embryí, ale nepozorovali jsme snížení některé konkrétní populace v erythropoéze.

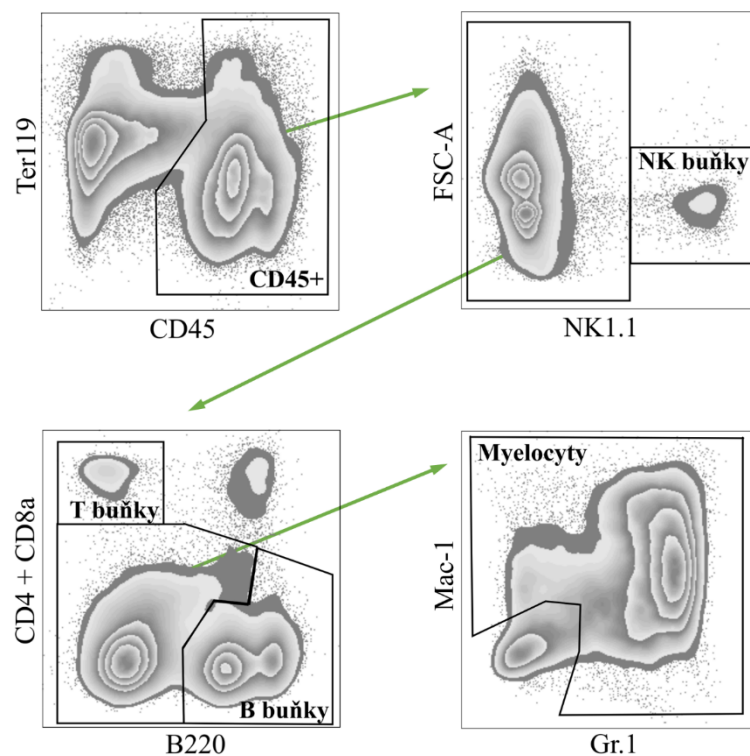


**Obr. 15:** Buněčnost fetálních jater, v procentech vztaženo k průměrné buněčnosti embryí v daném vrhu. Statistika: Student's t-test (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ )

### 7.2.5 Vývoj neerytroidních krevních buněk u myši $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$

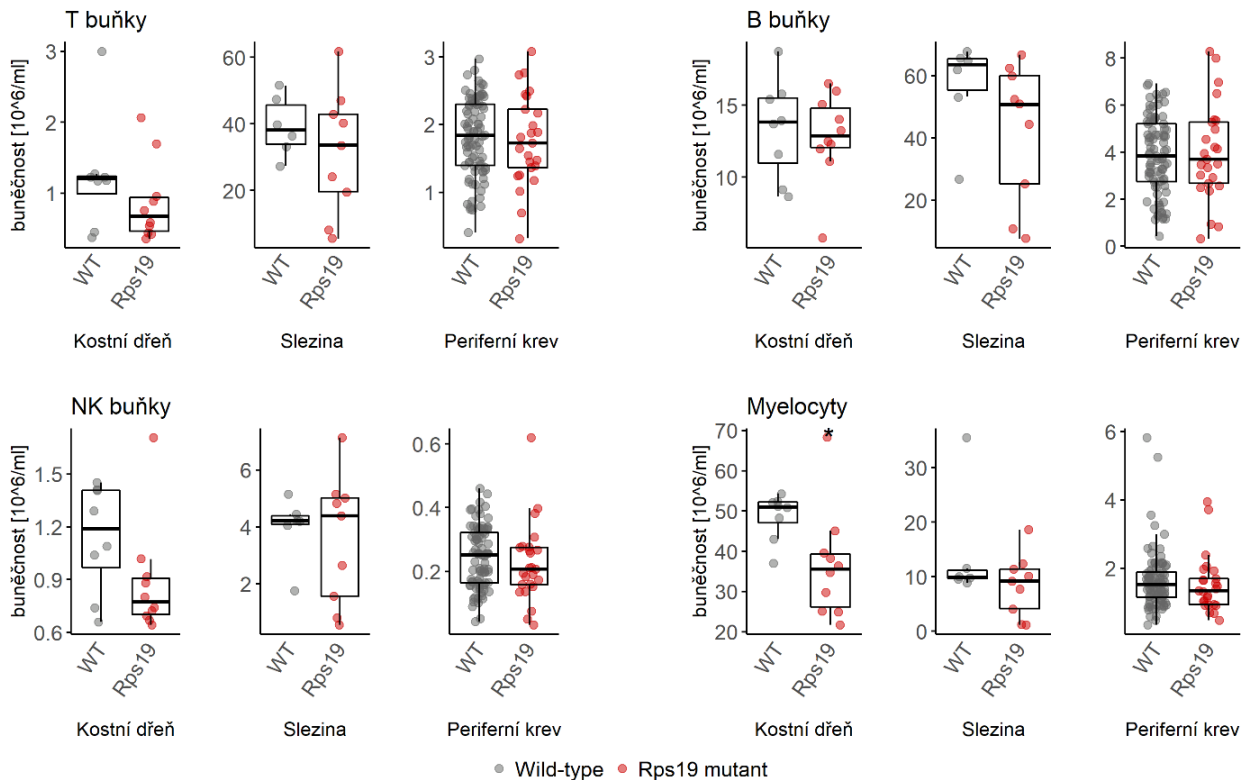
Měřením erythropoézy jsme zjistili, že k jejím poruchám dochází ve stádiu proerytoblastů, tedy poměrně brzy ve vývoji erytrocytů. Zajímalo nás proto, zda je ovlivněna pouze erytroidní vývojová řada nebo zda se poruchy vývoje týkají i jiných krevních buněk. Pomocí průtokové cytometrie jsme sledovali množství T buněk, B buněk, NK buněk a myelocytů v kostní dřeni, slezině a periferní krvi.

Pro rozlišení jednotlivých buněčných linií jsme použili následující markery: CD4 a CD8a pro T buňky, B220 pro B buňky, NK1.1 pro NK buňky a GR.1 a Mac-1 pro myelocyty.



**Obr. 16:** Ukázka gatovací strategie při měření buněčných linií krevních buněk v kostní dřeni. Po vybrání singletů a živých buněk jsme postupovali dle ukázaných dotplotů. Nejprve jsme vybrali CD45+ buňky, z těch jsme vygatovali NK buňky. Z NK1.1 negativních CD45 pozitivních buněk jsme vygatovali T buňky (CD4 a CD8a pozitivní) a B buňky (B220 pozitivní). Z CD4 a CD8a negativních, B220 negativních buněk jsme vygatovali myelocyty (Gr.1 pozitivní, Mac-1 pozitivní).

Mezi T lymfocyty, B lymfocyty ani NK buňkami jsme nepozorovali změny v počtech buněk mezi kontrolními a *Rps19*<sup>R67Δ/R67Δ</sup> myši. Jediný signifikantní rozdíl jsme pozorovali v kostní dřeni v počty myelocytů, který byl lehce snížen u *Rps19*<sup>R67Δ/R67Δ</sup> myši. Celkově z těchto výsledků vidíme, že naše mutace v *Rps19* nezpůsobuje změny v lymfoidní linii, ale pouze v myeloidní linii, ve které jsou erytrocyty ovlivněny výrazně více než myelocyty.



**Obr. 17:** Srovnání množství T buněk, B buněk, NK buněk a myelocytů v kostní dřeni, slezině a periferní krvi u kontrolních wild-type myši a *Rps19*<sup>R67Δ/R67Δ</sup> myši. Statistika: Student's t-test (\* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001)

### 7.3 Narušený vývoj hematopoetických kmenových buněk u myši Rps19<sup>R67Δ/R67Δ</sup>

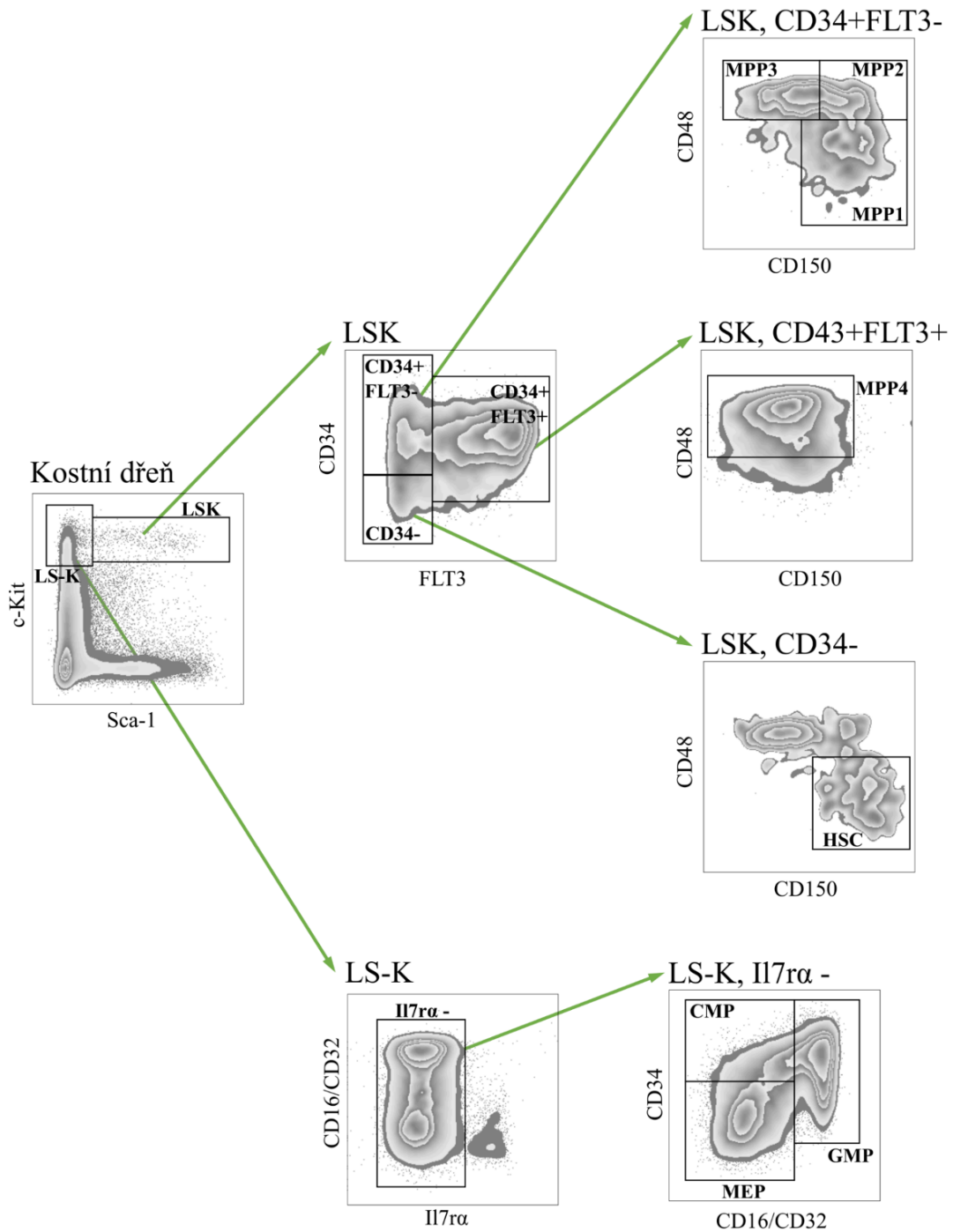
U myšního modelu Rps19<sup>R67Δ/R67Δ</sup> jsme pozorovali menší buněčnost hematopoetických orgánů a poruchy erythropoézy již ve stádiu proerytroblastů. To nás vedlo k otázce, zda dochází ke změnám v hematopoéze již před diferenciací do erytroidní řady.

Pomocí průtokové cytometrie jsme sledovali buňky kostní dřeně. Ze všech živých buněk jsme vybrali populace lineage negativní Sca-1 negativní c-Kit pozitivní (LS-K) a lineage negativní Sca-1 pozitivní c-Kit pozitivní (LSK). U Rps19<sup>R67Δ/R67Δ</sup> myši jsme pozorovali výrazné zmenšení obou těchto populací oproti kontrolním myším.

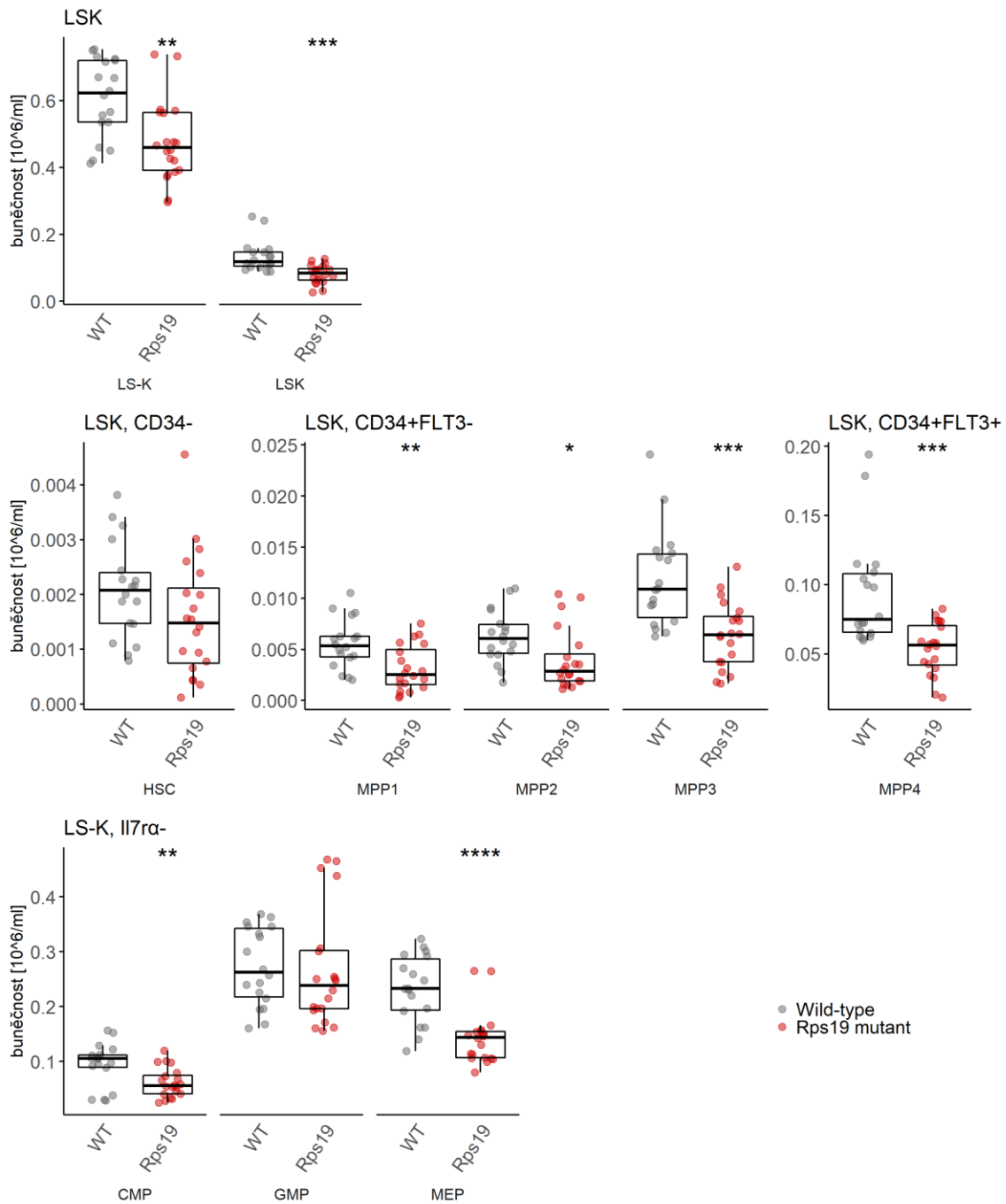
LSK populaci jsme dále rozdělili na základě markerů CD34 a FLT3 (CD135) a dále CD48 a CD150 na hematopoetické buňky (*hematopoietic stem cells*, HSC) (CD34-FLT3-CD150+CD48-) a několik populací multipotentních progenitorů (MPP) – krátkodobě obnovující se HSC (MPP1) (CD34+FLT3-CD150+CD48+), myeloidně zaměřené MPP (MPP2) (CD34+FLT3-CD150+CD48+), balancované MPP (MPP3) (CD34+FLT3-CD150+CD48+) a lymfoidně zaměřené MPP (MPP4) (CD34+FLT3+CD150-CD48+) (Cabezas-Wallscheid et al., 2014).

LS-K buňky, kterých je přibližně desetkrát více než LSK buněk, jsou převážně časně erytroidní a granulocytové progenitory. Z těchto buněk jsme gatovali Il7 $\alpha$  (CD127) negativní buňky, ze kterých jsme na základě markerů CD34 a CD16/CD32 gatovali populaci myeloidních progenitorů (*common myeloid progenitor*, CMP) (Il7 $\alpha$ -CD34+CD16/CD32-), progenitorů pro megakaryocyty a erytrocyty (*megakaryocyte-erytroid progenitor*, MEP) (Il7 $\alpha$ -CD34-CD16/CD32+) a progenitorů granulocytů a makrofágů (*granulocyte-macrophage progenitor*, GMP) (Il7 $\alpha$ -CD34+CD16/CD32+) (Challen et al., 2009).

Populace hematopoetických kmenových buněk (HSC) je srovnatelná u Rps19<sup>R67Δ/R67Δ</sup> myši a u kontrolních myši. U buněk, které se začaly diferenciovat, již ale pozorujeme změny. K významnému zmenšení dochází u populací MPP1, MPP2, MPP3 i MPP4. Změny v dalších vývojových stádiích můžeme pozorovat na LS-K populaci. Zde jsme naměřili výrazné zmenšení populací CMP a MEP.



**Obr. 18:** Ukázka gatovací strategie LSK a LS-K populací. HSC – hematopoetické kmenové buňky, MPP – multipotentní protentory, MPP1 – krátkodobě obnovující se HSC, MPP2 – myeloidní zaměřené MPP, MPP3 – balancované MPP, MPP4 – lymfoidně zaměřené MPP, CMP – myeloidní progenitory, GMP – progenitory granulocytů a makrofágů, MEP – progenitory pro megakaryocyty a erytrocyty.



**Obr. 19:** Hematopoetické buňky a multipotentní progenitory v kostní dřeni, porovnání kontrol a Rps19<sup>R67Δ/R67Δ</sup> myši. HSC – hematopoetické kmenové buňky, MPP – multipotentní progenitory, MPP1 – krátkodobě obnovující se HSC, MPP2 – myeloidní zaměřené MPP, MPP3 – balancované MPP, MPP4 – lymfoidně zaměřené MPP, CMP – myeloidní progenitory, GMP – progenitory granulocytů a makrofágů, MEP – progenitory pro megakaryocyty a erythrocyty. Statistika: Student's t-test (\* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001)

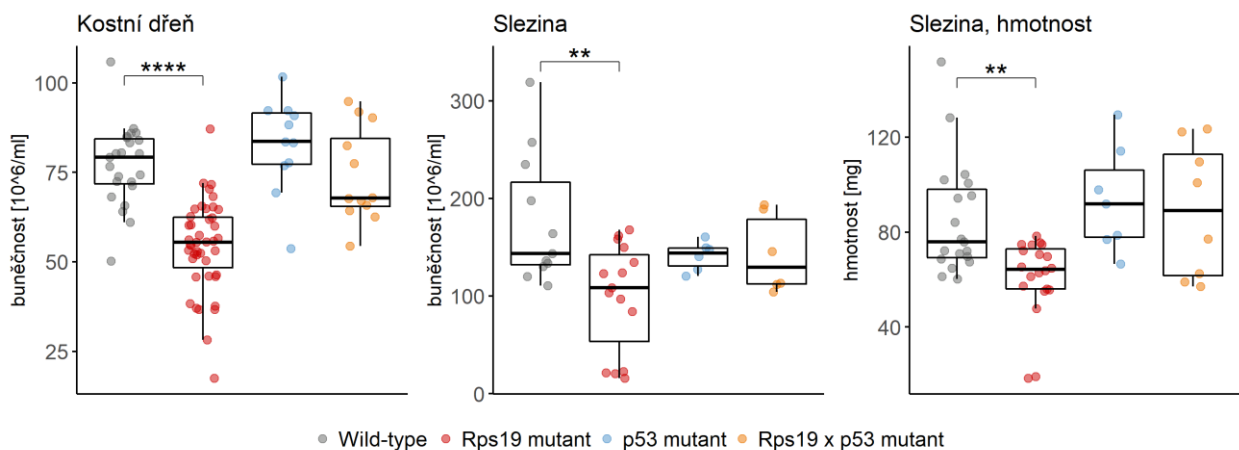


## 7.4 Kompenzace fenotypových změn následkem deficience *Trp53*

Protein p53 hraje v patologii DBA významnou roli. To potvrzují i dříve vytvořené myší modely, ve kterých ztráta funkce *Trp53* vedla k záchraně fenotypu (Barlow et al., 2010; Jaako et al., 2011; Watkins-Chow et al., 2013). Chtěli jsme proto na našem myším modelu  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$  zjistit, jak se bude tento model chovat v případě ztráty p53. Pro tento účel jsme používali myši s homozygotní mutací v *Rps19* a zároveň s homozygotní mutací v *Trp53*. Jak bylo již zmíněno v přehledu v kapitole 3.5.1, tento dvojité homozygotní myší model má v prvních týdnech života lepší přežívání než myši s mutací jen v *Rps19*, zároveň mají tyto myši větší hmotnost než  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$  myši, na první pohled se tedy zdá, že ztráta funkce *Trp53* vede k záchraně fenotypu.

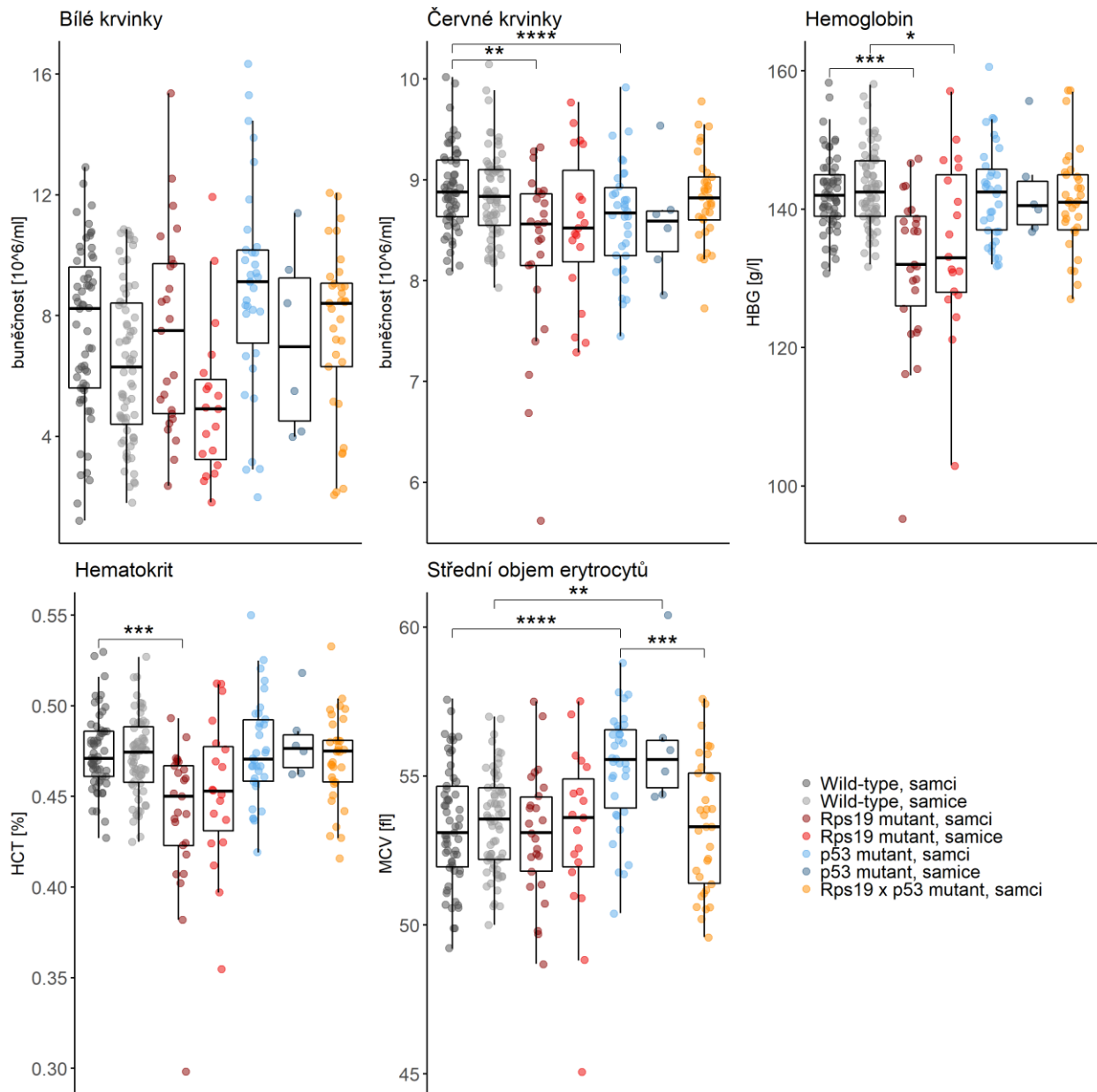
Experimenty uvedené v kapitole 7.2 jsme prováděli také s buňkami z myši s genotypy  $Trp53^{-/-}$  a  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}Trp53^{-/-}$ .

Pomocí měření hemoanalyzátozem a vážení sleziny jsme zjistili, že  $Trp53^{-/-}$  myši ani  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}Trp53^{-/-}$  myši se signifikantně neliší od kontrolních myši v celkové buněčnosti kostní dřeně a sleziny, ani v hmotnosti sleziny.



**Obr. 20:** Buněčnost kostní dřeně a sleziny a hmotnost sleziny pro myši genotypů wild-type,  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$ ,  $Trp53^{-/-}$  a  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}Trp53^{-/-}$ . Statistika: Dunnett's test (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ )

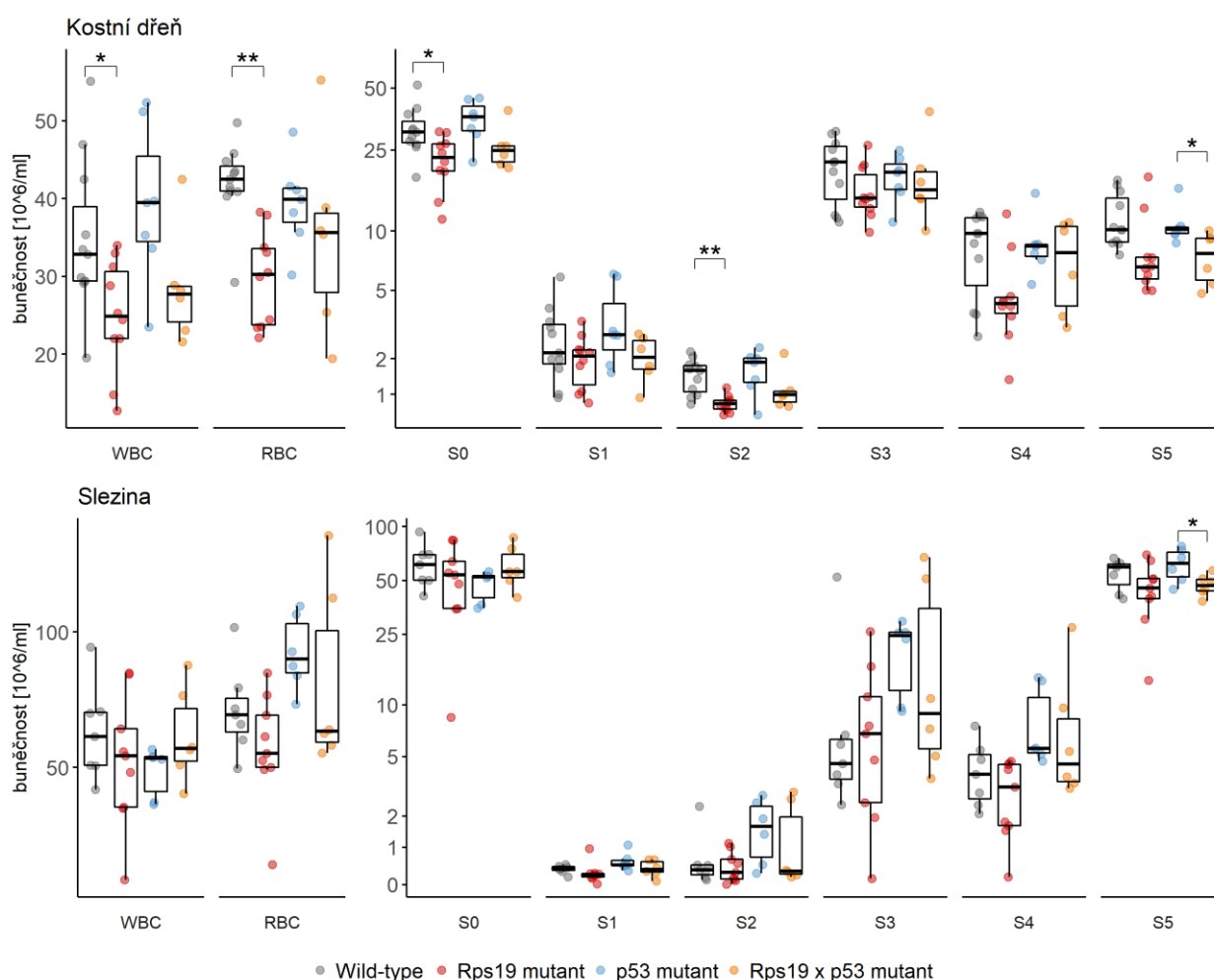
Na hemoanalyzeru jsme také měřili složení periferní krve. Výsledky tohoto měření jsme porovnávali opět pro každé pohlaví zvlášť. U  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}Trp53^{-/-}$  myši jsme mohli porovnávat pouze výsledky samců, jelikož samice s tímto genotypem se téměř nerodí. U myši s mutací pouze v  $Trp53$  jsme pozorovali změny oproti kontrolním myším – snížený počet červených krvinek a zvýšený střední objem erytrocytů.



**Obr. 21:** Výsledky hemoanalýzy z periferní krve, rozděleno dle genotypu (wild-type,  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$ ,  $Trp53^{-/-}$  a  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}Trp53^{-/-}$ ) a pohlaví. Statistika: Dunnett's test (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ )

### 7.4.1 Průběh erythropoézy v myším modelu $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}Trp53^{-/-}$

Pomocí průtokové cytometrie jsme pozorovali jednotlivá stádia erythropoézy za použití stejných markerů a gatování, které je popsáno výše v kapitole 7.2.3. Myši s mutací pouze v genu *Trp53*, které jsme používali jako kontrolu ke zkoumaným dvojitým mutantům  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}Trp53^{-/-}$ , vykazovaly stejné výsledky jako wild-type myši. Dvojití mutanti  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}Trp53^{-/-}$  měli celkově menší buněčnost kostní dřeně než wild-type kontroly i *p53* kontroly, a to jak v celkovém počtu červených a bílých krvinek, tak i v jednotlivých stádiích erythropoézy, ovšem nejednalo se o signifikantní rozdíl. Ve slezině jsme pozorovali mírně zvýšený počet červených krvinek u *p53* kontrolních myši oproti wild-type kontrolám, a to zejména ve stádiích S3 a S4, ani zde se nejedná o signifikantní rozdíly. Dvojití mutanti mají lehce zmenšenou populaci S5 oproti *p53* kontrolám.

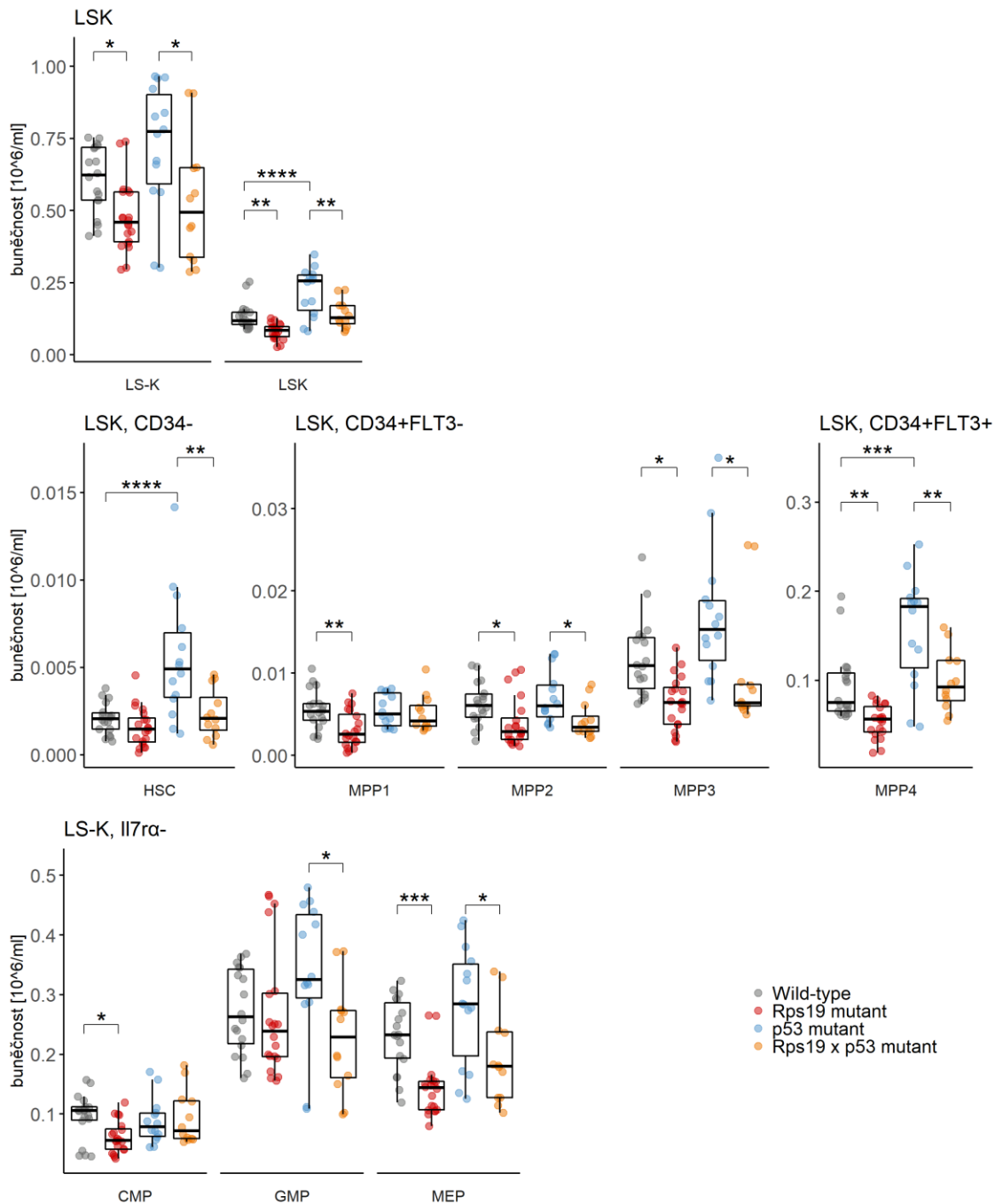


**Obr. 22:** Erythropoéza v kostní dřeně a slezině. WBC – bílé krvinky, RBC – červené krvinky; S0 – všechny progenitorové a kmenové buňky, S1 – časné proerytroblasty, S2 – pozdní proerytroblasty, S3 – basofilní erytroblasty, S4 – ortochromatické erytroblasty a retikulocyty, S5 – zralé erytrocyty. Statistika: Dunnett's test (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ )

#### 7.4.2 Abnormality hematopoetických buněk v myším modelu $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}Trp53^{-/-}$

Porovnávali jsme také složení hematopoetických kmenových buněk u kontrolních wild-type myši,  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$  myši,  $Trp53^{-/-}$  myši a  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}Trp53^{-/-}$  myši. Kromě výsledků popsaných výše v kapitole 7.3 týkajících se rozdílů mezi kontrolními wild-type a  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$  myšmi jsme pozorovali zejména zvýšené množství některých buněčných populací u  $Trp53^{-/-}$  myši. Tyto myši mají zvýšené množství LSK buněk. Při detailnějším rozlišení populací jsme pozorovali zvýšení počtu CD34 negativních buněk, tedy zejména HSC, a dále zvětšenou populaci MPP4.

U dvojitých mutantů ( $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}Trp53^{-/-}$ ) jsme pozorovali u všech populací hodnoty srovnatelné s kontrolními wild-type myšmi. Mutace v *Trp53* tedy ruší fenotyp způsobený mutací v *Rps19*, ale mutace v *Rps19* stále hraje alespoň malou roli, protože tito dvojití mutanti neodpovídají p53 kontrolám.



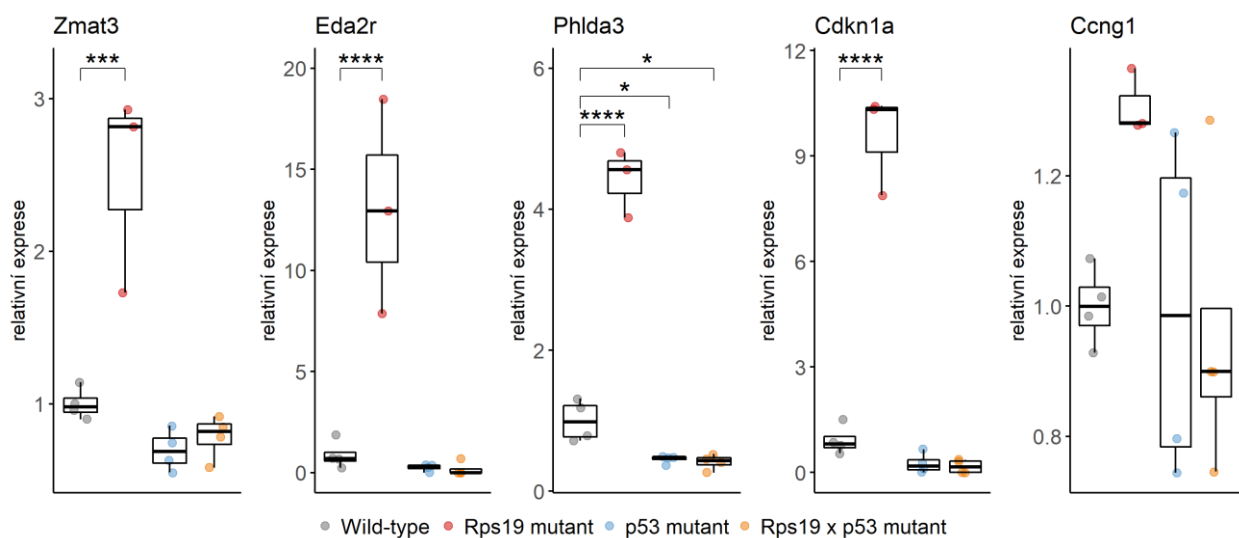
**Obr. 23:** Hematopoetické buňky a multipotentní progenitory v kostní dřeni. HSC – hematopoetické kmenové buňky, MPP – multipotentní protenitory, MPP1 – krátkodobě obnovující se HSC, MPP2 – myeloidní zaměřené MPP, MPP3 – balancované MPP, MPP4 – lymfoidně zaměřené MPP, CMP – myeloidní progenitory, GMP – progenitory granulocytů a makrofágů, MEP – progenitory pro megakaryocyty a erytrocyty. Statistika: Dunnett's test (\* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001)

## 7.5 Změny genové exprese u myši $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$ a $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}Trp53^{-/-}$

Z výsledků RNA sekvenování c-Kit<sup>+</sup> progenitorů a single-cell sekvenování hematopoetických buněk a progenitorů z kostní dřeně, které bylo provedeno v naší laboratoři, je zřejmé, že mutace v *Rps19* vede ke změně exprese několika genů, které jsou všechny součástí p53 signální dráhy. Konkrétně se jedná o zvýšenou expresi genů *Zmat3*, *Phlda3* a *Eda2r*, *Cdkn1a* (p21) a *Ccng1* (cyklin G1).

Tyto dříve naměřené výsledky jsme chtěli potvrdit pomocí qPCR. Měření jsme prováděli na buňkách z kostní dřeně. Sledovali jsme expresi výše uvedených genů, a dále jsme vybrali několik dalších genů, u kterých jsme očekávali, že by mohlo docházet ke změně exprese. Měřili jsme expresi následujících genů: *Bax*, *Bbc3*, *Ccna2*, *Ccnd2*, *Ccne1*, *Ccng1*, *Cdkn1a*, *Cdkn1b*, *Cdkn2b*, *Eda2r*, *Gata1*, *Phlda3*, *Zmat3* a *Zpf36l2*.

Tímto měřením jsme potvrdili předchozí výsledky z naší laboratoře, tedy zvýšenou expresi u genů *Zmat3*, *Phlda3*, *Eda2r*, *Cdkn1a* a *Ccng1* u  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$  myší, u ostatní měřených genů jsme nepozorovali rozdíly v jejich expresi.



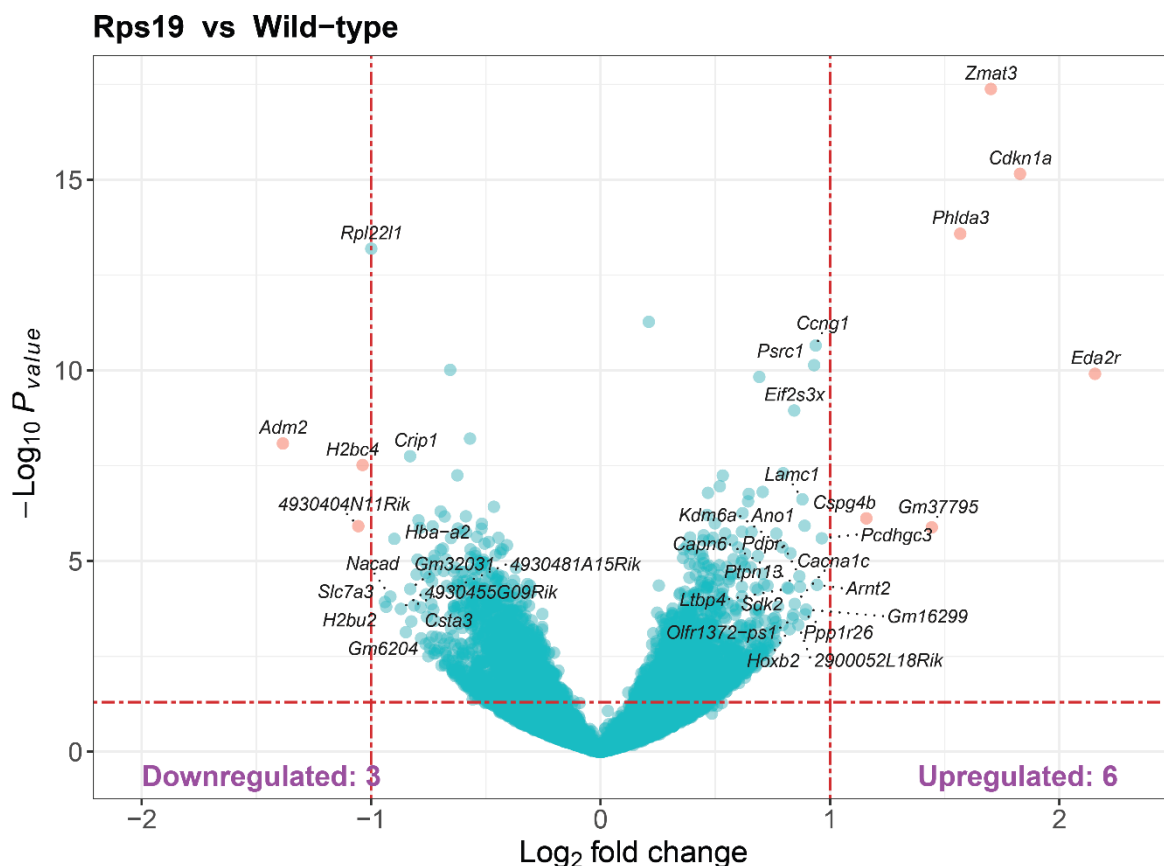
**Obr. 24:** Relativní exprese genů *Phlda3*, *Zmat3*, *Eda2r*, *Cdkn1a* a *Ccng1* u myší genotypů wild-type,  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$ ,  $Trp53^{-/-}$  a  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}Trp53^{-/-}$  změřená pomocí qPCR. Zobrazeny jsou geny, u kterých byly naměřeny změny v expresi mezi wild-type a  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$  vzorky. Statistika: Dunnett's test (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ )

### 7.5.1 Genová exprese ve fetálních játrech myši $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$ a $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}Trp53^{-/-}$

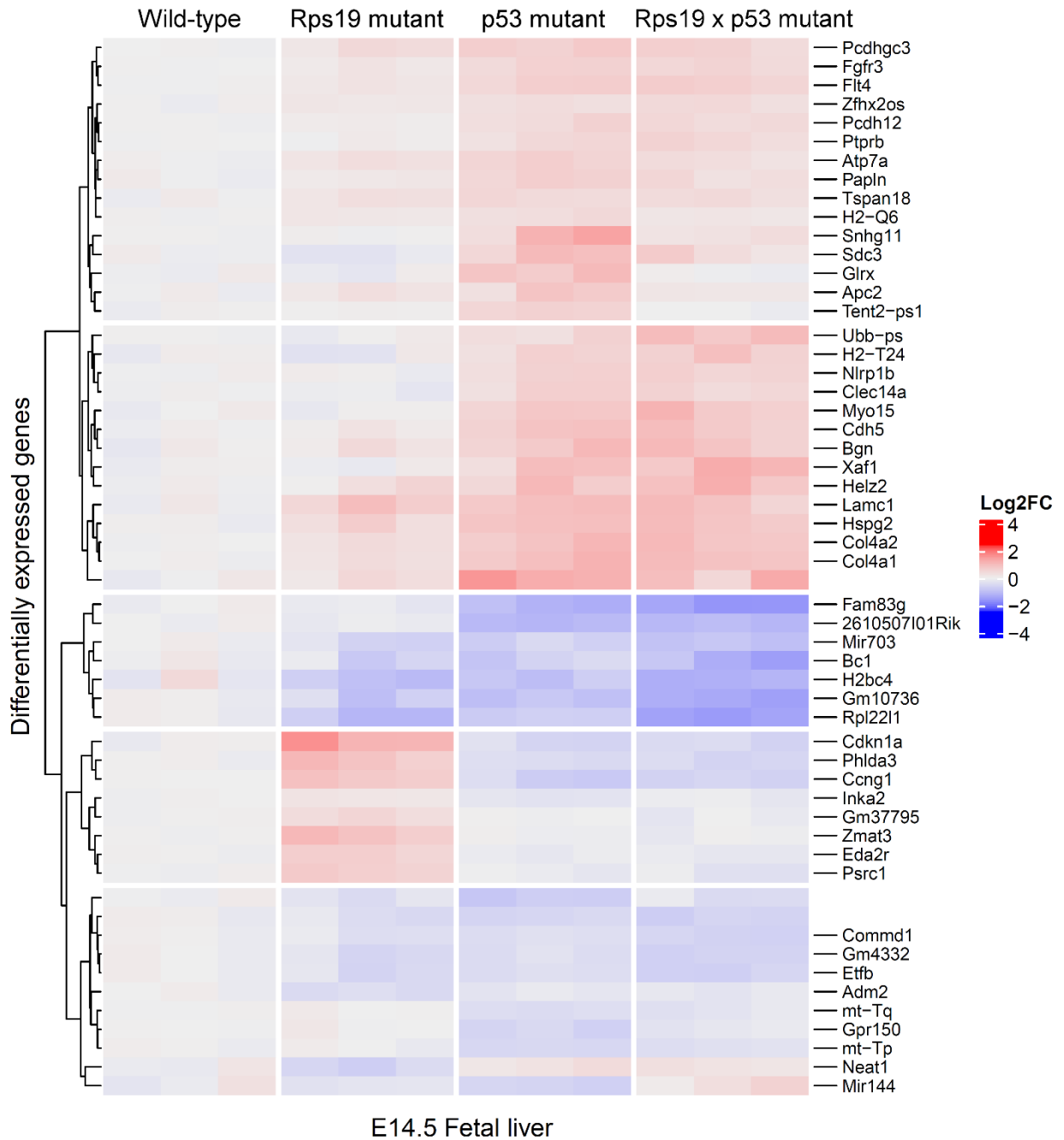
Pomocí RNA sekvenování jsme sledovali změnu exprese genů ve fetálních játrech. I zde jsme pozorovali zvýšenou expresi genů, u nichž jsme pozorovali změny i v kostní dřeni pomocí qPCR. Více než dvakrát zvýšenou expresí u  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$  myši se významně vyznačovaly geny *Zmat3*, *Cdkn1a* a *Phlda3*. Signifikantně zvýšena, i když méně než dvakrát, je také exprese genů *Ccng1*, *Psrc1* a *Eif2s3x*. *Psrc1* je, stejně jako všechny dříve zmíněné geny, regulován pomocí p53. *Eif2s3x* hraje roli v malé ribozomální podjednotce. U genu *Eda2r* jsme také pozorovali výrazně zvýšenou expresi u  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$  myši, zatímco u ostatních genotypů nebyl exprimován téměř vůbec.

U  $Trp53^{-/-}$  myši jsme pozorovali downregulaci *Fam83g*, stejně jako u  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}Trp53^{-/-}$  myši. U  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}Trp53^{-/-}$  myši nevidíme změny u žádného z genů, které byly upregulovány u  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$  myši. U  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$  i  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}Trp53^{-/-}$  myši jsme pozorovali downregulaci genu *Rpl22l1*.

Expresa *Rps19* není u žádného z genotypů změněná, ale na datech ze sekvenování jsme pozorovali u  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$  myši a  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}Trp53^{-/-}$  myši mutaci v *Rps19*.



**Obr. 25:** Porovnání genové exprese u  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$  a kontrolních myši. Červeně jsou označeny geny s více než 2x zvýšenou expresí a s  $p < 0,05$ .



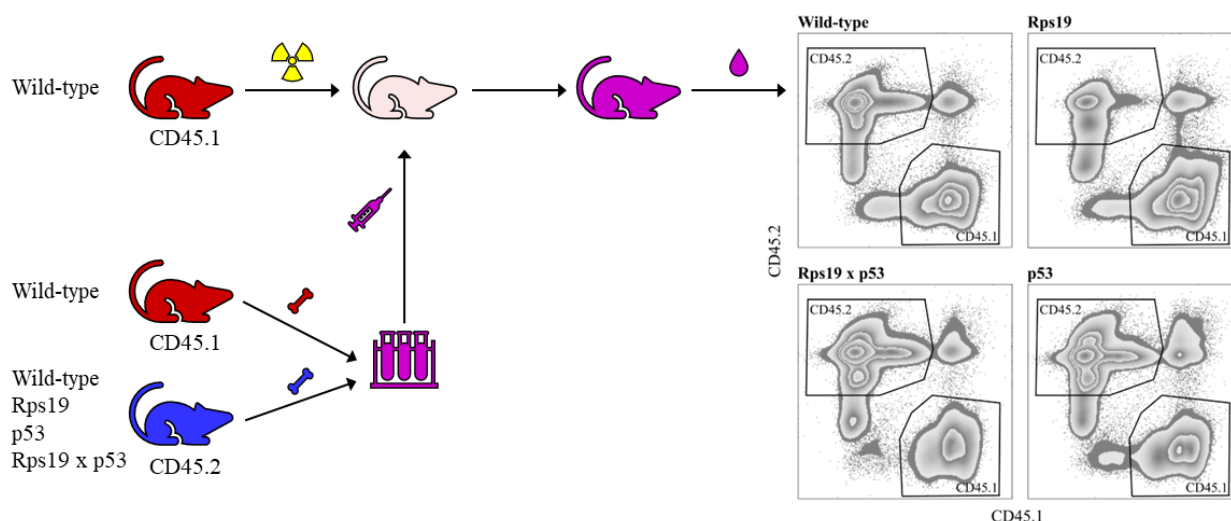
**Obr. 26:** Změna genové exprese ve fetálních játrech kontrolních wild-type myši,  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$  myši,  $Trp53^{-/-}$  myši a  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}Trp53^{-/-}$  myši, heatmapa vybraných (nejvíce změněných) genů.



## 7.6 Poruchy repopulační aktivity kmenových buněk z $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$ myší

Z dosud uvedených výsledků můžeme vidět, že k poruše erytropoézy dochází v jejích velmi časných stádiích a že k defektům dochází již v multipotentních progenitorech. Abychom dále posoudili vlastnosti hematopoetických kmenových buněk u  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$  myší a také vliv mutace *Trp53* na mutaci v *Rps19*, provedli jsme kompetitivní transplantaci kostní dřeně a sledovali jsme repopulační potenciál kmenových buněk.

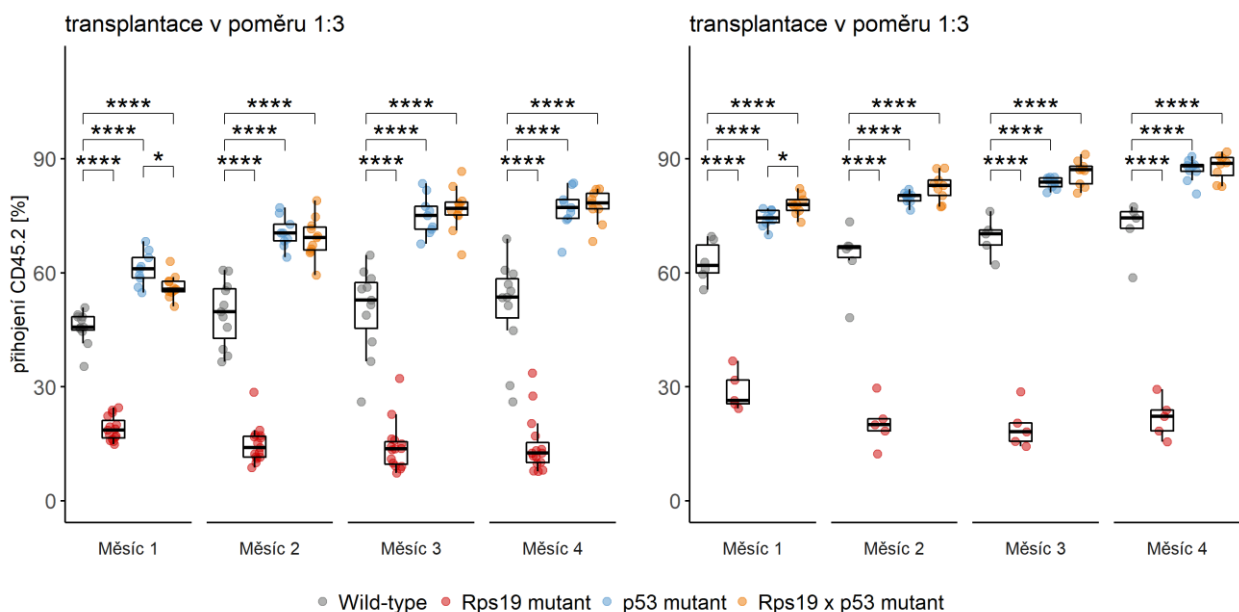
Pro transplantaci jsme používali CD45.1 (kontrolní) a CD45.2 (experimentální) myši. Jedná se o dva myší kmeny, které se liší povrchovým antigenem CD45. Obě izoformy tohoto antigenu jsou funkčně identické a zároveň rozlišitelné například pomocí průtokové cytometrie. Antigen CD45 je exprimován na všech hematopoetických buňkách s jádrem, proto je možné pomocí jeho variant CD45.1 a CD45.2 odlišit, která hematopoetická buňka pochází z které myši.



**Obr. 27:** Schéma experimentu: Do ozářených CD45.1 myší jsme aplikovali směs buněk z kostní dřeně z kontrolních CD45.1 (červená) a experimentálních CD45.2 (modrá) myší, a to v poměru 1:1 a 1:3. Do každé ozářené myši bylo transplantováno  $3 \times 10^6$  buněk. V měsíčních intervalech jsme odebírali a vyhodnocovali krev, po 4 měsících jsme vyhodnotili i kostní dřeň a slezinu. Zobrazené dotploty jsou příkladem výsledků z periferní krve 4 měsíce po transplantaci.

Experiment jsme prováděli ve dvou opakování s poměrem CD45.1 a CD45.2 buněk 1:1. Z výsledků můžeme vidět, že v tomto případě dochází u wild-type buněk zpočátku k přihojení přibližně 45 %, v průběhu čtyř měsíců poměr CD45.2 buněk lehce stoupá na 51 %. U buněk z  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$  myši vidíme, že při stejném počátečním poměru 1:1 jsou po prvním měsíci přihojeny průměrně z 19 % a v průběhu čtyř měsíců toto číslo ještě klesá až na necelých 15 %. Můžeme tedy říct, že repopulační schopnost těchto buněk je silně snížena. Buňky s mutací v genu  $Trp53$  se po měsíci přihojily přibližně z 61 % a po 4 měsících toto číslo vystoupalo na téměř 77 %. Buňky s mutací v obou genech ( $Trp53$  i  $Rps19$ ) se přihojují podobně jako poslední zmíněné – po měsíci bylo přihojeno přibližně 56 %, po 4 měsících přibližně 77 %.

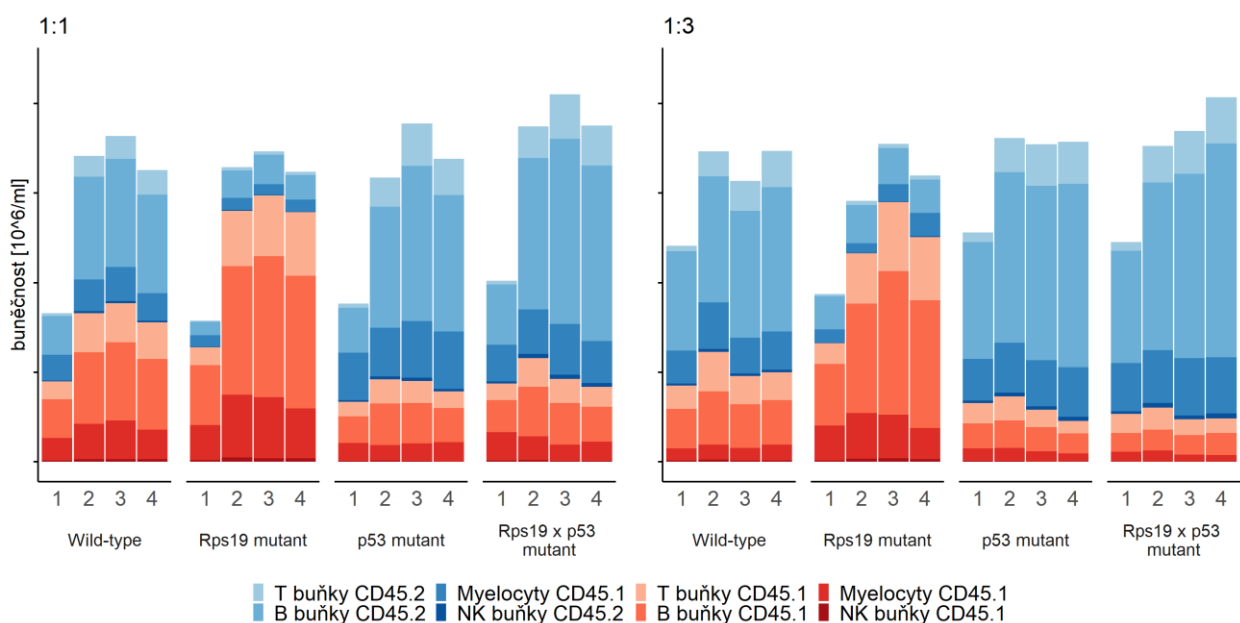
Při dalším opakování experimentu jsme transplantovali buňky CD45.1 a CD45.2 v poměru 1:3, očekávali jsme tedy vyšší procento přihojení CD45.2 buněk. U buněk z wild-type myši došlo nejprve k přihojení přibližně 63 % a po čtyřech měsících se toto číslo zvedlo přibližně na očekávanou hodnotu – 72 %. U  $Trp53^{-/-}$  buněk i u  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}Trp53^{-/-}$  buněk došlo k přihojení v souladu s předchozími výsledky – po 1 měsíci se přihojilo 74 %, respektive 77 %, a po 4 měsících stoupl jejich množství na 87 %, respektive 88 %. U  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$  buněk došlo po měsíci k přihojení 29 % a po 4 měsících se přihojení ustálilo na přibližně 22 %.



**Obr. 28:** Procento přihojení CD45.2 buněk po transplantaci v měsíčních intervalech. Statistika: Dunnett's test (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ )

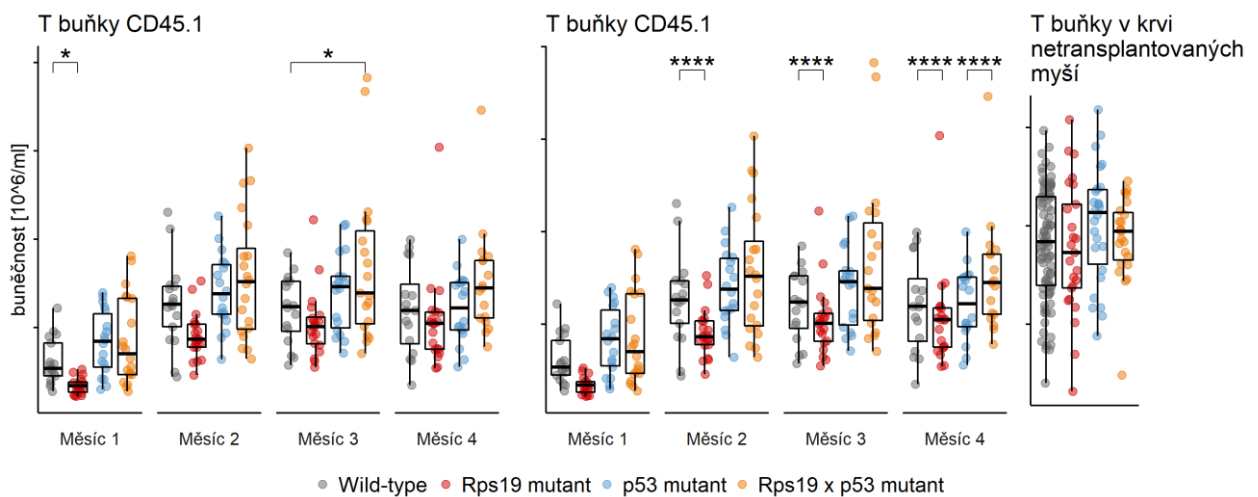
V prvním měsíci po transplantaci byla celková buněčnost periferní krve přibližně poloviční než ve druhém a dalších měsících, kdy už se celková buněčnost zásadně neměnila. Ve druhém experimentu při použití transplantovaných buněk v poměru 1:3 byla buněčnost po prvním měsíci o něco vyšší než v předchozím experimentu, ale stále snižená oproti buněčnosti v dalších měsících.

Sledovali jsme také jednotlivé buněčné linie v krvi transplantovaných myší. Pomocí průtokové cytometrie jsme rozlišili T buňky, B buňky, NK buňky a myelocyty. Naměřené buňky jsme nejprve rozdělili podle antigenů CD45.1 a CD45.2 a dále jsme gatovali jednotlivé populace dle stejného systému, který je ukázán v kapitole 7.2.5 a v obrázku 16. Poměr jednotlivých buněčných linií zůstává stále stejný ve všech případech, jedinou výjimku tvoří T buňky.



**Obr. 29:** Buněčné linie v periferní krvi po transplantaci, modře z transplantovaných CD45.2 buněk, červeně z CD45.1.

Po transplantaci jsme pozorovali snížené množství T buněk u myši s transplantovanými buňkami s mutací v *Rps19*. Abychom mohli porovnávat buněčnosti mezi jednotlivými genotypy, kde se lišilo procento přihojení CD45.2, vynásobili jsme buněčnost koeficientem tak, aby odpovídala tomu, kdyby daná myš měla 100 % buněk CD45.1 či CD45.2 buněk. V prvních dvou měsících po transplantaci můžeme vidět snížené množství T buněk i v linii CD45.1 (tedy v kontrolních buňkách), po 4 měsících již tento rozdíl ale zmizel. U CD45.2 buněk, tedy těch s mutací v *Rps19*, můžeme rozdíl v množství T buněk pozorovat i po čtyřech měsících po transplantaci. U těchto buněk nepozorujeme trend, že by se množství T buněk v průběhu času zvyšovalo. Jak můžeme vidět v obrázku 30, u myši s mutací v *Rps19*, kterým nebyla transplantována kostní dřeň, tento rozdíl v množství T buněk nepozorujeme.

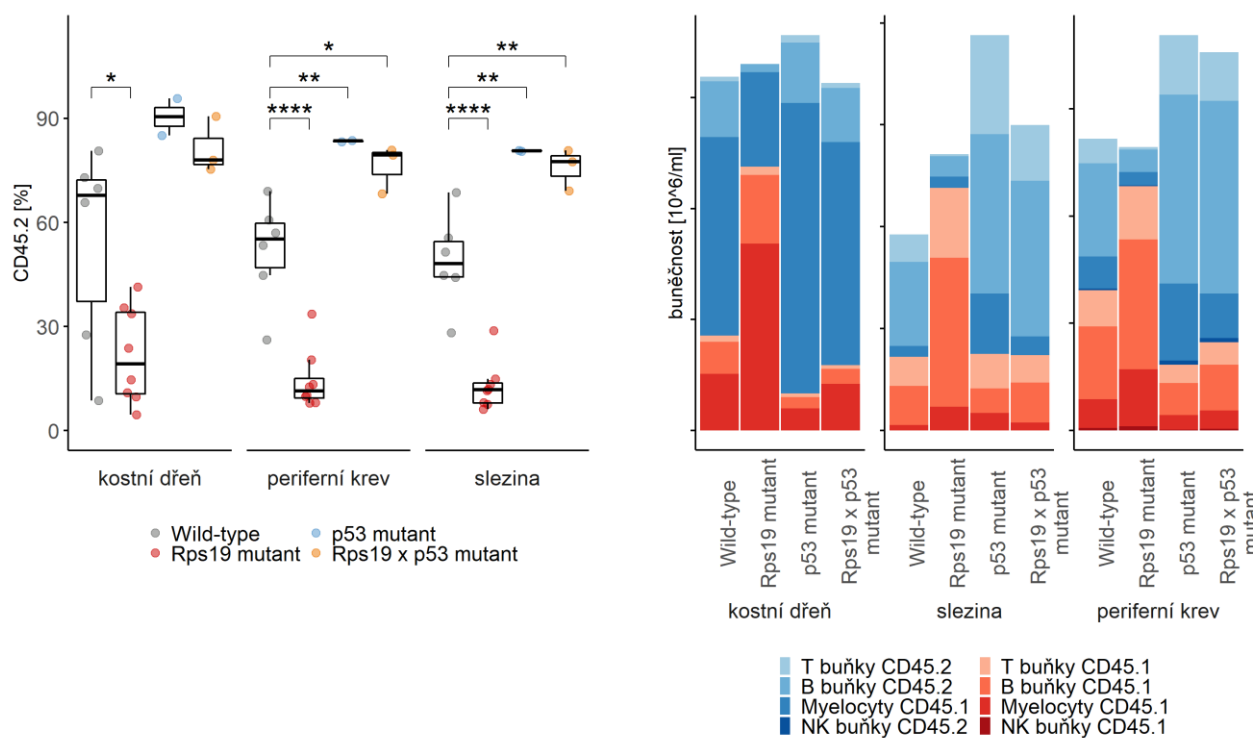


**Obr. 30:** Množství T buněk po transplantaci linie CD45.1 (kontrolní) a CD45.2, vpravo množství T buněk v krvi myši bez transplantace. Uváděná buněčnost odpovídá buněčnosti v případě, že by myš měla 100 % CD45.1, respektive CD45.2 buněk. Statistika: Dunnett's test (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ )

Po čtyřech měsících po transplantaci jsme z myší odebrali kostní dřeň a slezinu a vyhodnotili jsme i tyto orgány. Přihojení CD45.2 bylo v kostní dřeni o něco vyšší než v krvi a slezině, ale stále se jednalo o signifikantně nižší procento, než u kontrolních myší – v kostní dřeni se přihojilo přibližně 25 % CD45.2 buněk při počátečním poměru 1:1.

Poměr jednotlivých buněčných linií byl v jednotlivých orgánech různý, ale byl stejný mezi jednotlivými genotypy, s výjimkou sníženého množství T buněk CD45.2, jejichž množství ve všech orgánech korespondovalo s výsledky z periferní krve, které jsou ukázány výše.

Pomocí průtokové cytometrie jsme také měřili erythropoézu v kostní dřeni i slezině (stejně jako v kapitole 7.2.3). Ani v jednom z těchto orgánů jsme nepozorovali změny mezi jednotlivými genotypy.



**Obr. 31:** Přihojení CD45.2 buněk po 4 měsících v kostní dřeni, krvi a slezině; buněčné linie v kostní dřeni, slezině a periferní krvi 4 měsíce po transplantaci. Statistika: Dunnett's test (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ )

## 8 Diskuse

Hlavním cílem mé diplomové práce bylo charakterizovat poruchy krvetvorby u našeho myšího modelu Diamondovy-Blackfanovy anémie, který má mutaci v genu *Rps19*, konkrétně delecii argininu na pozici 67. Dříve vytvořené myší modely DBA, které mají mutace v různých RP genech, ne vždy věrně kopírují příznaky spojené s DBA a zároveň se potýkají s různými problémy, například s embryonální letalitou (Devlin et al., 2010; Matsson et al., 2004; Morgado-Palacin et al., 2015).

Námi používaný model kopíruje mnohé fenotypové projevy DBA, zejména poruchy krvetvorby, ale také například menší vzrůst, sníženou porodní hmotnost, zkrácenou dobu života a různé kardiovaskulární, urogenitální, kosterní či kraniofaciální malformace a výjimečně také hydrocefalus. Zároveň jsme u něj nepozorovali problém s embryonální letalitou. Oproti DBA pacientům, u kterých je mutace pravděpodobně vždy heterozygotní, v případě našeho modelu jsou heterozygotní myši ovlivněny jen minimálně a fenotyp je pozorován u homozygotních myší. Mutace v tomto konkrétním místě *RPS19* sice nebyla u pacientů s DBA nalezena, ale nachází se v blízkosti hotspotu, ve kterém dochází u pacientů s DBA k mutacím často. Zároveň je boční řetězec argininu 67 místem pro post-translační modifikace skupinou tzv. protein arginin methyltransferáz (PRMT), které zavádějí metylace na postranní řetězce argininů u mnoha významných proteinů podílejících se na transkripční regulaci buněčné homeostázy a metabolismu.

Ve své práci jsem se zaměřila především na charakterizaci erythropoetických a hematopoetických vlastností tohoto myšího modelu, a také na vliv mutace v genu *Trp53*. Přestože role chronicky zvýšené exprese tumor supresorového proteinu p53 v DBA byla popsána na mnoha jiných zvířecích modelech (Jaako et al., 2011; Watkins-Chow et al., 2013), je tento model výjimečný v tom, že umožňuje studovat mnohé aspekty interakce mutantní RPS19 a Trp53 signální dráhy jak na genetické, tak na fenotypové úrovni.

### 8.1 Poruchy složení ribozomální podjednotky v myším modelu *Rps19*<sup>R67Δ/R67Δ</sup>

Pro maturaci 20S do 18S rRNA v průběhu syntézy ribozomů je zapotřebí mimo jiné protein RPS19. Snížení jeho množství naruší tento proces a vede ke sníženému množství malé ribozomální podjednotky (Flygare et al., 2007; Choesmel et al., 2007).

Na buňkách z periferní krve pacientů s DBA byly pozorovány změny v množství ribozomálních podjednotek. Tyto změny byly pozorovány pomocí měření poměru 28S/18S rRNA, který odpovídá poměru množství velkých a malých ribozomálních podjednotek. U pacientů s mutací v RPL byl tento poměr snížen (tedy bylo naměřeno menší množství velké podjednotky)

a u pacientů s mutací v RPS byl zvýšen (Quarello et al., 2016). V souladu s tímto měřením bylo na jednom z myších modelů pozorováno snížené množství volné malé podjednotky u myši s mutací v *Rps19* (Jaako et al., 2011).

Přestože mutace v našich myších je v místě, které přímo interaguje s 18S rRNA, podařilo se nám ukázat změněný poměr 28S/18S jen v játrech, zatímco v kostní dřeni jsme žádné signifikantní změny nepozorovali, pravděpodobně také z důvodu zvýšené proteosyntézy v játrech a jejich víceméně homogenního složení z převážně buněk jednoho typu – hepatocytů, s vysokým obsahem polyribosomů. Z dat získaných pomocí sekvenování RNA z fetálních jater také vyplývá, že nedochází ke snížení genové exprese *Rps19*. Z těchto výsledků tedy můžeme usuzovat, že mutace *Rps19*<sup>R67Δ/R67Δ</sup> nemá za následek zásadní snížení množství RPS19. Důsledkem této mutace dochází nejen částečně k omezení maturace malé ribozomální podjednotky, ale zároveň pravděpodobně i k omezení jejího dalšího fungování v případě, že k jejímu vniknutí dojde.

## 8.2 Poruchy hematopoézy a erytropoézy

Přestože je anémie jedním z nejčastějších projevů ribozomopatií, přesný mechanismus, jak souvisí poruchy ribosomů s erytropoézou není zcela jednoznačně objasněn. Předpokládané možnosti jsou ovlivnění transkripce nebo translace GATA1 v důsledku defektů v syntéze ribosomů (Ludwig et al., 2014) nebo kvůli toxicitě nadbytku hemu (Rio et al., 2019; Yang et al., 2016). Pokud by se podařilo vyvinout myší model DBA, jehož erytropoéza by odpovídala erytropoéze u pacientů s DBA, mohl by sloužit mimo jiné pro studium toho, jaké mechanismy spojují poruchy ribosomů s erytropoézou.

Přestože je tradičně DBA spojována s nedostatkem červených krvinek, ukazuje se, že v některých případech mohou být ovlivněny i jiné krevní buňky. Ze vzorků od 128 pacientů s DBA bylo ve více než polovině případů detekováno snížené množství lymfocytů (B lymfocytů a NK buněk) nebo IgM (Iskander et al., 2019). Jiná studie, ovšem na menším množství vzorků, naopak nenašla v množství lymfocytů žádné signifikantní rozdíly (Giri et al., 2015). Data z našeho myšího modelů získaná pomocí průtokové cytometrie neukazují signifikantní rozdíly v množství lymfocytů. Výše zmíněná studie, která pozorovala snížené množství lymfocytů u některých pacientů s DBA, nenašla žádnou souvislost mezi tím, který ribozomální protein je mutován a tím, zda dochází ke snížení počtu leukocytů. To, že náš model ukazuje normální počty leukocytů tady není nutně odchylkou od toho, jak se projevuje DBA způsobená mutací v *RPS19* u lidí.

Z našeho měření průběhu erythropoézy jsme zjistili, že k poruchám dochází zejména ve stádiu pozdních proerytroblastů. To je v souladu s poznatky ohledně poruch erythropoézy u pacientů s DBA, u kterých byly pozorovány změny ve stádiu CFU-E a proerytroblastů (Yang et al., 2016).

Dále jsme chtěli zjistit, zda u našeho modelu dochází k poruchám erythropoézy již v průběhu embryonálního vývoje, zvláště proto, že u některých jiných myších modelů byla anémie pozorována zejména v embryích (Yu et al., 2021b). U embryí ve stádiu E14.5 jsme potvrdili menší buněčnost fetálních jater, která korelovala s celkově menší velikostí  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$  embryí. Snažili jsme se zjistit, zda ve fetálních játrech dochází, podobně jako u dospělých myší v kostní dřeni, k redukci populace proerytroblastů, ale z našich výsledků jsme toto nebyli schopni potvrdit. Zdá se tedy, že v našem myším modelu dochází ve fetálním stádiu spíše k celkové poruše růstu v důsledku mutace *Rps19* a veškeré projevy anémie mohou být tímto zastíněny. Zjištění přesnějších dat ohledně poruch ve fetální erythropoéze nám bránil také fakt, že i drobné rozdíly ve věku embryí, kterým jsme nebyli schopni zabránit, měly za následek výrazné změny v erythropoéze, čímž mohl být případný defekt v proerytroblastech zastíněn.

Abychom mohli posoudit, ve kterém stádiu definitivní hematopoézy dochází ke změnám v důsledku mutace *Rps19*, sledovali jsme pomocí průtokové cytometrie zastoupení Lin-Sca+c-Kit+ (LSK) buněk v kostní dřeni. LSK populace je obohacena o časná stadia hematopoetických kmenových buněk a multipotentních progenitorů, a porovnáním kontrol a  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$  myší jsme zjistili, že ačkoliv hematopoetické buňky nejsou pozorovatelně změněny, u multipotentních progenitorů jsme již pozorovali výrazné ovlivnění mutací v *Rps19*. Tyto výsledky naznačují, že poruchy krvetvorby mohou nastávat již relativně brzy v linii vedoucí k vývoji červených krvinek, buď z přímého důsledku nedostatečnosti RPS19 anebo poruchou zpětné vazby, která naruší přirozenou rovnováhu mezi dělicími se a diferencujícími se buňkami kostní dřene. Nedostatek funkčních ribozomů nebo nedostatečná syntéza proteinů mohou vést k tomu, že HSC se s menší pravděpodobností budou diferencovat do erytroidních progenitorů, jak bylo popsáno v několika studiích (Khajuria et al., 2018; Signer et al., 2014; Spevak et al., 2020).

Pro další zhodnocení vlastností hematopoetických buněk v našem myším modelu jsme prováděli kompetitivní transplantaci kostní dřene. Z těchto experimentů můžeme vyvozovat významně snížený repopulační potenciál hematopoetických buněk z myší mutovaným genem *Rps19*. Zároveň předchozí experimenty provedené v naší laboratoři ukázaly, že pokud budeme transplantovat buňky ze zdravých donorů (krvetvorné buňky z CD45.1 myší) do neozářených experimentálních myší s mutací v *Rps19*, k žádnému přihojení nedojde. Narušen tedy je kompetitivní potenciál buněk s mutací, nikoliv však integrita kostní dřene  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$  myší.



U buněk z  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$  myši jsme pozorovali menší množství T buněk, a to v průběhu celých 4 měsíců měření. Protože u myši s mutací v *Rps19* bez transplantace jsme změnu v T buňkách nepozorovali, je zřejmé, že k tomuto poklesu T buněk dochází v důsledku transplantace.

### 8.3 Změny v genové expresi v myším modelu $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$

Pomocí qPCR a RNA sekvenování jsme ukázali, že v myším modelu  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$  dochází k upregulaci několika genů. Konkrétně se jedná o geny *Phlda3*, *Zmat3*, *Eda2r*, *Cdkn1a*, *Ccng1* a *Psrc1*. Všechny tyto geny jsou cílové geny transkripčního faktoru Trp53.

*Phlda3* (*Pleckstrin Homology Like Domain Family A Member 3*) je p53 regulovaný gen, jehož produkt, protein PHLDA3, se pomocí své PH domény (*pleckstrin homology domain*) váže na PIP3 (*phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphate*) v membráně, a tak kompetitivně zabraňuje vazbě AKT3 na PIP3 (Kawase et al., 2009). *Zmat3* (*Zinc finger matrin type 3*) je p53 regulovaný tumorsupresorový gen. Protein ZMAT3 zvyšuje stabilitu *Trp53* mRNA tím, že se váže na ARE (AU-bohatá oblast, *AU-rich element*) ve 3' UTR (3' nepřekládaná oblast, *3' untranslated region*) (Vilborg et al., 2009). EDA2R (*Ectodysplasin A2 receptor*) aktivuje nukleární faktor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) a je přímým transkripčním cílem p53 (Tanikawa et al., 2010). *Psrc1*, jehož zvýšená exprese byla pozorována ve fetálních játrech pomocí RNA sekvenování, kóduje protein PSRC1 (*Proline And Serine Rich Coiled-Coil 1*) označovaný častěji jako DDA3. U myši podporuje buněčný růst a je aktivován pomocí p53 (Hsieh et al., 2007), ovšem lidský DDA3 je pomocí p53 naopak downregulován (Hsieh et al., 2008).

Cyklin G1, kódovaný genem *Ccng1*, pozitivně i negativně reguluje buněčný růst (Bates et al., 1996). Jedná se o transkripční cíl p53, který může vytvářet komplex s protein fosfatázou 2 (PP2A, *protein phosphatase 2*) a následně dochází k defosforylaci MDM2, čímž dochází i k regulaci p53 (Okamoto et al., 2002).

Produktem genu *Cdkn1a* je cyklin dependentní kinázový inhibitor 1 (CDKN1A, *cyclin-dependent kinase inhibitor 1*) také nazývaný p21. Jedná se o důležitý inhibitor buněčného cyklu, který je regulován mimo jiné pomocí p53 (Kreis et al., 2019). Na vzorcích periferní krve pacientů s DBA byla pozorována zvýšená exprese *CDKN1A* (Sjogren et al., 2015), stejně jako na některých zvířecích modelech (Doty et al., 2021; Jaako et al., 2011; Morgado-Palacin et al., 2015; Narla et al., 2014).

Změnu exprese těchto stejných genů, kromě *Eda2r* a *Psrc1*, popsali u svého myšího modelu (také s mutací v *Rps19*) i Jaako et al.. U tohoto myšího modelu byla navíc pozorována změna v expresi genů *Ptp4a3* a *Bax* (Jaako et al., 2011), které u našeho myšího modelu změněny nebyly.

Také jsme pomocí RNA sekvenování pozorovali sníženou expresi genu *Rpl221l*. Změny v expresi dalších ribozomálních proteinů mimo toho, který je mutován, byly pozorovány i u vzorků od pacientů s DBA s mutací v *RPS19* (Gazda et al., 2006).

Protože získávat kostní dřev od pacientů s DBA je náročné, a protože může být nemoc způsobena širokou škálou mutací v mnoha různých genech, neexistuje mnoho studií, které by zkoumaly expresi genů přímo u pacientů s DBA s mutací v *RPS19*. Studie na 10 DBA pacientech s mutací v *RPS19* (nikoli delecí celé alely) ukázala, že u těchto pacientů dochází ke snížené expresi *RPS19* i ke sníženému množství proteinu RPS19 (Gazda et al., 2004). Analýza vzorků od jiných pacientů, u kterých mutace v *RPS19* nezpůsobovala předčasné zařazení stop kodonu, snížení exprese *RPS19* nepozorovala (Gazda et al., 2006). Naše výsledky RNA sekvenování ukazují, že v našem myším modelu nedochází ke snížené expresi *Rps19*, což je v souladu s očekáváním, protože v našem modelu dochází k delecí tří nukleotidů, a nedochází tím pádem k posunu čtecího rámce ani k předčasnému zařazení stop kodonu.

#### **8.4 Role tumor supresorového genu *Trp53* v patogenezi DBA**

Dosavadní výzkum na jiných myších modelech i na buňkách od pacientů s DBA ukazuje na klíčovou roli proteinu p53 v DBA (Dutt et al., 2011; Jaako et al., 2011; Watkins-Chow et al., 2013). Dosud nepřesvědčivě zodpovězenou otázkou zůstává, zda je mechanismus vzniku DBA vždy závislý na p53 nebo zda roli může hrát i mechanismus na p53 nezávislý.

Jelikož všechny geny, u kterých jsme pozorovali zvýšenou expresi, se nachází v p53 signální dráze, můžeme z toho usuzovat, že mechanismus vzniku příznaků DBA u našeho myšího modelu je závislý na zvýšené aktivitě signální dráhy p53. Je již známo, že zvýšená aktivita *Trp53* vede k celé škále poruch v krvetvorbě, zejména v erytropoéze (Pant et al., 2012).

Z dat získaných z RNA sekvenování vidíme, že u myší *Rps19<sup>R67Δ/R67Δ</sup>Trp53<sup>-/-</sup>* dochází ke změně v expresi mnoha genů, ale jedná se z velké části o stejné geny, jejichž exprese je změněna i u *Trp53<sup>-/-</sup>* myší. Rozdíly v genové expresi mezi *Trp53<sup>-/-</sup>* a *Rps19<sup>R67Δ/R67Δ</sup>Trp53<sup>-/-</sup>* myšmi jsou jen minimální. Důležitým výsledkem je, že nedochází k rozdílu mezi expresí u genů, jejichž exprese je zvýšena u *Rps19<sup>R67Δ/R67Δ</sup>* myší.

Z našich naměřených dat, ať už se jednalo o qPCR, RNA sekvenování nebo měření hematopoetických buněk pomocí průtokové cytometrie vyplývá, že DBA úzce souvisí s rolí proteinu p53. Výsledky u *Rps19<sup>R67Δ/R67Δ</sup>Trp53<sup>-/-</sup>* myší se většinou signifikantně neliší od výsledků *Trp53<sup>-/-</sup>* myší. Toto pozorování je ve shodě s výsledky u jiných myších modelů DBA (Jaako et al., 2011; Watkins-Chow et al., 2013).

Na výsledcích měření průběhu hematopoézy (LSK buněk) pomocí průtokové cytometrie ovšem můžeme pozorovat, že složení LSK buněk u  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}Trp53^{-/-}$  myši je srovnatelné spíše s výsledky wild-type myši než  $Trp53^{-/-}$  myši. Mutace v *Trp53* tedy očividně sice potlačuje vliv mutace v *Rps19*, ale tento efekt není zcela stoprocentní.

Našimi experimenty s  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}Trp53^{-/-}$  myšmi jsme potvrdili, že mechanismus vzniku příznaků DBA v našem modelu je z velké části závislý na proteinu p53 a mutace v genu *Trp53*, který ho kóduje, vede k záchraně fenotypu našeho myšního modelu, zároveň ale zřejmě dochází i k některým menším změnám, které jsou na p53 nezávislé.

## 9 Závěr

Cílem této diplomové práce byla charakterizace erythropoézy a hematopoézy v myším modelu Diamondovy-Blackfanovy anémie  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$  a určení vlivu proteinu p53 na pozorované fenotypové projevy.

- potvrdili jsme anémii u tohoto myšího modelu a stanovili jsme, že k poruchám v erythropoéza dochází ve stádiu proerytroblastů
- ukázali jsme, že ke změnám dochází již v embryonálním stádiu vývoje – embrya jsou významně menší a ve fetálních játrech jsme pozorovali změnu exprese stejných genů jako u dospělých myší
- v hematopoetických kmenových buňkách nejsou viditelné změny, ale již ve stádiu multipotentních progenitorů lze pozorovat výrazný vliv mutace na průběh hematopoézy a posléze erythropoézy
- změřili jsme zvýšenou expresi genů *Phlda3*, *Zmat3*, *Eda2r*, *Psrc1*, *Ccng1* a *Cdkn1a* v našem myším modelu a potvrdili tak významnou roli proteinu p53 v patogenezi DBA – všechny tyto geny jsou ovlivňovány pomocí p53
- na myším modelu  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}Trp53^{-/-}$  jsme ověřili roli p53 – při mutaci v *Trp53* dochází k záchraně fenotypu myšího modelu
- potvrdili jsme, že myší model  $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$  by mohl sloužit pro studium patogeneze DBA, zejména pro studium vzájemného ovlivňování RPS19 a p53 signální dráhy

## 10 Literatura

- Abdulhay, N.J., Fiorini, C., Verboon, J.M., Ludwig, L.S., Ulirsch, J.C., Zieger, B., Lareau, C.A., Mi, X., Roy, A., Obeng, E.A., Erlacher, M., Gupta, N., Gabriel, S.B., Ebert, B.L., Niemeyer, C.M., Khoriaty, R.N., Ancliff, P., Gazda, H.T., Wlodarski, M.W., Sankaran, V.G., 2019. Impaired human hematopoiesis due to a cryptic intronic GATA1 splicing mutation. *J Exp Med* 216, 1050-1060.
- Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., Weissman, I.L., 2000. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404, 193-197.
- Aspesi, A., Monteleone, V., Betti, M., Actis, C., Morleo, G., Sculco, M., Guarrera, S., Wlodarski, M.W., Ramenghi, U., Santoro, C., Ellis, S.R., Loreni, F., Follenzi, A., Dianzani, I., 2017. Lymphoblastoid cell lines from Diamond Blackfan anaemia patients exhibit a full ribosomal stress phenotype that is rescued by gene therapy. *Sci Rep* 7, 12010.
- Barlow, J.L., Drynan, L.F., Hewett, D.R., Holmes, L.R., Lorenzo-Abalde, S., Lane, A.L., Jolin, H.E., Pannell, R., Middleton, A.J., Wong, S.H., Warren, A.J., Wainscoat, J.S., Boulwood, J., McKenzie, A.N., 2010. A p53-dependent mechanism underlies macrocytic anemia in a mouse model of human 5q- syndrome. *Nat Med* 16, 59-66.
- Bartels, M., Bierings, M., 2019. How I manage children with Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol* 184, 123-133.
- Bates, S., Rowan, S., Vousden, K.H., 1996. Characterisation of human cyclin G1 and G2: DNA damage inducible genes. *Oncogene* 13, 1103-1109.
- Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G., Yusupov, M., 2011. The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science* 334, 1524-1529.
- Bhat, K.P., Itahana, K., Jin, A., Zhang, Y., 2004. Essential role of ribosomal protein L11 in mediating growth inhibition-induced p53 activation. *EMBO J* 23, 2402-2412.
- Biegging-Rolett, K.T., Kaiser, A.M., Morgens, D.W., Boutelle, A.M., Seoane, J.A., Van Nostrand, E.L., Zhu, C., Houlihan, S.L., Mello, S.S., Yee, B.A., McClendon, J., Pierce, S.E., Winters, I.P., Wang, M., Connolly, A.J., Lowe, S.W., Curtis, C., Yeo, G.W., Winslow, M.M., Bassik, M.C., Attardi, L.D., 2020. Zmat3 Is a Key Splicing Regulator in the p53 Tumor Suppression Program. *Mol Cell* 80, 452-469 e459.
- Boulwood, J., Pellagatti, A., 2014. Reduced translation of GATA1 in Diamond-Blackfan anemia. *Nat Med* 20, 703-704.
- Brosh, R., Sarig, R., Natan, E.B., Molchadsky, A., Madar, S., Bornstein, C., Buganim, Y., Shapira, T., Goldfinger, N., Paus, R., Rotter, V., 2010. p53-dependent transcriptional regulation of EDA2R and its involvement in chemotherapy-induced hair loss. *FEBS Lett* 584, 2473-2477.
- Broudy, V.C., Lin, N., Brice, M., Nakamoto, B., Papayannopoulou, T., 1991. Erythropoietin receptor characteristics on primary human erythroid cells. *Blood* 77, 2583-2590.
- Cabezas-Wallscheid, N., Klimmeck, D., Hansson, J., Lipka, D.B., Reyes, A., Wang, Q., Weichenhan, D., Lier, A., von Paleske, L., Renders, S., Wunsche, P., Zeisberger, P., Brocks, D., Gu, L., Herrmann, C., Haas, S., Essers, M.A.G., Brors, B., Eils, R., Huber, W., Milsom, M.D., Plass, C., Krijgsveld, J., Trumpp, A., 2014. Identification of regulatory networks in HSCs and their immediate progeny via integrated proteome, transcriptome, and DNA methylome analysis. *Cell Stem Cell* 15, 507-522.
- Constantinescu, S.N., Ghaffari, S., Lodish, H.F., 1999. The Erythropoietin Receptor: Structure, Activation and Intracellular Signal Transduction. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 10, 18-23.
- Crispino, J.D., Horwitz, M.S., 2017. GATA factor mutations in hematologic disease. *Blood* 129, 2103-2110.

- Cui, D., Li, L., Lou, H., Sun, H., Ngai, S.M., Shao, G., Tang, J., 2014. The ribosomal protein S26 regulates p53 activity in response to DNA damage. *Oncogene* 33, 2225-2235.
- Da Costa, L., Leblanc, T., Mohandas, N., 2020. Diamond-Blackfan anemia. *Blood* 136, 1262-1273.
- Daftuar, L., Zhu, Y., Jacq, X., Prives, C., 2013. Ribosomal Proteins RPL37, RPS15 and RPS20 Regulate the Mdm2-p53-MdmX Network. *PLoS ONE* 8.
- Dai, M.S., Lu, H., 2004. Inhibition of MDM2-mediated p53 ubiquitination and degradation by ribosomal protein L5. *J Biol Chem* 279, 44475-44482.
- Dai, M.S., Shi, D., Jin, Y., Sun, X.X., Zhang, Y., Grossman, S.R., Lu, H., 2006. Regulation of the MDM2-p53 pathway by ribosomal protein L11 involves a post-ubiquitination mechanism. *J Biol Chem* 281, 24304-24313.
- Dai, M.S., Zeng, S.X., Jin, Y., Sun, X.X., David, L., Lu, H., 2004. Ribosomal protein L23 activates p53 by inhibiting MDM2 function in response to ribosomal perturbation but not to translation inhibition. *Mol Cell Biol* 24, 7654-7668.
- Danilova, N., Sakamoto, K.M., Lin, S., 2008. Ribosomal protein S19 deficiency in zebrafish leads to developmental abnormalities and defective erythropoiesis through activation of p53 protein family. *Blood* 112, 5228-5237.
- Danilova, N., Sakamoto, K.M., Lin, S., 2011. Ribosomal protein L11 mutation in zebrafish leads to haematopoietic and metabolic defects. *Br J Haematol* 152, 217-228.
- De Keersmaecker, K., Sulima, S.O., Dinman, J.D., 2015. Ribosomopathies and the paradox of cellular hypo- to hyperproliferation. *Blood* 125, 1377-1382.
- de la Cruz, J., Karbstein, K., Woolford, J.L., Jr., 2015. Functions of ribosomal proteins in assembly of eukaryotic ribosomes in vivo. *Annu Rev Biochem* 84, 93-129.
- Debnath, S., Jaako, P., Siva, K., Rothe, M., Chen, J., Dahl, M., Gaspar, H.B., Flygare, J., Schambach, A., Karlsson, S., 2017. Lentiviral Vectors with Cellular Promoters Correct Anemia and Lethal Bone Marrow Failure in a Mouse Model for Diamond-Blackfan Anemia. *Mol Ther* 25, 1805-1814.
- Dev, A., Asch, R., Jachimowicz, E., Rainville, N., Johnson, A., Greenfest-Allen, E., Wojchowski, D.M., 2017. Governing roles for Trib3 pseudokinase during stress erythropoiesis. *Exp Hematol* 49, 48-55 e45.
- Dev, A., Byrne, S.M., Verma, R., Ashton-Rickardt, P.G., Wojchowski, D.M., 2013. Erythropoietin-directed erythropoiesis depends on serpin inhibition of erythroblast lysosomal cathepsins. *J Exp Med* 210, 225-232.
- Devlin, E.E., Dacosta, L., Mohandas, N., Elliott, G., Bodine, D.M., 2010. A transgenic mouse model demonstrates a dominant negative effect of a point mutation in the RPS19 gene associated with Diamond-Blackfan anemia. *Blood* 116, 2826-2835.
- Diaz-de-Heredia, C., Bresters, D., Faulkner, L., Yesilipek, A., Strahm, B., Miano, M., Dalle, J.H., Peffault de Latour, R., Corbacioglu, S., 2021. Recommendations on hematopoietic stem cell transplantation for patients with Diamond-Blackfan anemia. On behalf of the Pediatric Diseases and Severe Aplastic Anemia Working Parties of the EBMT. *Bone Marrow Transplant*.
- Doerfler, P.A., Feng, R., Li, Y., Palmer, L.E., Porter, S.N., Bell, H.W., Crossley, M., Pruett-Miller, S.M., Cheng, Y., Weiss, M.J., 2021. Activation of gamma-globin gene expression by GATA1 and NF-Y in hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Nat Genet* 53, 1177-1186.
- Doty, R.T., Yan, X., Lausted, C., Munday, A.D., Yang, Z., Yi, D., Jabbari, N., Liu, L., Keel, S.B., Tian, Q., Abkowitz, J.L., 2019. Single-cell analyses demonstrate that a heme-GATA1 feedback loop regulates red cell differentiation. *Blood* 133, 457-469.

- Doty, R.T., Yan, X., Meng, C., Lausted, C., Tian, Q., Abkowitz, J.L., 2021. Single-cell analysis of erythropoiesis in Rpl11 haploinsufficient mice reveals insight into the pathogenesis of Diamond-Blackfan anemia. *Exp Hematol* 97, 66-78 e66.
- Draptchinskaia, N., Gustavsson, P., Andersson, B., Pettersson, M., Willig, T.N., Dianzani, I., Ball, S., Tchernia, G., Klar, J., Matsson, H., Tentler, D., Mohandas, N., Carlsson, B., Dahl, N., 1999. The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia. *Nat Genet* 21, 169-175.
- Dulic, V., Kaufmann, W.K., Wilson, S.J., Tlsty, T.D., Lees, E., Harper, J.W., Elledge, S.J., Reed, S.I., 1994. p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell* 76, 1013-1023.
- Dutt, S., Narla, A., Lin, K., Mullally, A., Abayasekara, N., Megerdichian, C., Wilson, F.H., Currie, T., Khanna-Gupta, A., Berliner, N., Kutok, J.L., Ebert, B.L., 2011. Haploinsufficiency for ribosomal protein genes causes selective activation of p53 in human erythroid progenitor cells. *Blood* 117, 2567-2576.
- Ebert, B.L., Bunn, H.F., 1999. Regulation of the Erythropoietin Gene. *Blood* 94, 1864-1877.
- el-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817-825.
- Fernandez-Morales, B., Pavon, L., Cales, C., 2012. CDC6 expression is regulated by lineage-specific transcription factor GATA1. *Cell Cycle* 11, 3055-3066.
- Ferreira-Cerca, S., Poll, G., Gleizes, P.E., Tschochner, H., Milkereit, P., 2005. Roles of eukaryotic ribosomal proteins in maturation and transport of pre-18S rRNA and ribosome function. *Mol Cell* 20, 263-275.
- Flygare, J., Aspesi, A., Bailey, J.C., Miyake, K., Caffrey, J.M., Karlsson, S., Ellis, S.R., 2007. Human RPS19, the gene mutated in Diamond-Blackfan anemia, encodes a ribosomal protein required for the maturation of 40S ribosomal subunits. *Blood* 109, 980-986.
- Frisan, E., Vandekerckhove, J., de Thonel, A., Pierre-Eugene, C., Sternberg, A., Arlet, J.B., Floquet, C., Gyan, E., Kosmider, O., Dreyfus, F., Gabet, A.S., Courtois, G., Vyas, P., Ribeil, J.A., Zermati, Y., Lacombe, C., Mayeux, P., Solary, E., Garrido, C., Hermine, O., Fontenay, M., 2012. Defective nuclear localization of Hsp70 is associated with dyserythropoiesis and GATA-1 cleavage in myelodysplastic syndromes. *Blood* 119, 1532-1542.
- Fumagalli, S., Di Cara, A., Neb-Gulati, A., Natt, F., Schwemberger, S., Hall, J., Babcock, G.F., Bernardi, R., Pandolfi, P.P., Thomas, G., 2009. Absence of nucleolar disruption after impairment of 40S ribosome biogenesis reveals an rpL11-translation-dependent mechanism of p53 induction. *Nat Cell Biol* 11, 501-508.
- Fumagalli, S., Ivanenkov, V.V., Teng, T., Thomas, G., 2012. Suprainduction of p53 by disruption of 40S and 60S ribosome biogenesis leads to the activation of a novel G2/M checkpoint. *Genes Dev* 26, 1028-1040.
- Gastou, M., Rio, S., Dussiot, M., Karboul, N., Moniz, H., Leblanc, T., Sevin, M., Gonin, P., Larghero, J., Garrido, C., Narla, A., Mohandas, N., Vainchenker, W., Hermine, O., Solary, E., Da Costa, L., French Society of, H., French Society of, I., Hematology, 2017. The severe phenotype of Diamond-Blackfan anemia is modulated by heat shock protein 70. *Blood Adv* 1, 1959-1976.
- Gazda, H.T., Kho, A.T., Sanoudou, D., Zaucha, J.M., Kohane, I.S., Sieff, C.A., Beggs, A.H., 2006. Defective ribosomal protein gene expression alters transcription, translation, apoptosis, and oncogenic pathways in Diamond-Blackfan anemia. *Stem Cells* 24, 2034-2044.

- Gazda, H.T., Sheen, M.R., Vlachos, A., Choemmel, V., O'Donohue, M.F., Schneider, H., Darras, N., Hasman, C., Sieff, C.A., Newburger, P.E., Ball, S.E., Niewiadomska, E., Matysiak, M., Zaucha, J.M., Glader, B., Niemeyer, C., Meerpohl, J.J., Atsidaftos, E., Lipton, J.M., Gleizes, P.E., Beggs, A.H., 2008. Ribosomal protein L5 and L11 mutations are associated with cleft palate and abnormal thumbs in Diamond-Blackfan anemia patients. *Am J Hum Genet* 83, 769-780.
- Gazda, H.T., Zhong, R., Long, L., Niewiadomska, E., Lipton, J.M., Ploszynska, A., Zaucha, J.M., Vlachos, A., Atsidaftos, E., Viskochil, D.H., Niemeyer, C.M., Meerpohl, J.J., Rokicka-Milewska, R., Pospisilova, D., Wiktor-Jedrzejczak, W., Nathan, D.G., Beggs, A.H., Sieff, C.A., 2004. RNA and protein evidence for haplo-insufficiency in Diamond-Blackfan anaemia patients with RPS19 mutations. *Br J Haematol* 127, 105-113.
- Gillinder, K.R., Tuckey, H., Bell, C.C., Magor, G.W., Huang, S., Ilesley, M.D., Perkins, A.C., 2017. Direct targets of pSTAT5 signalling in erythropoiesis. *PLoS One* 12, e0180922.
- Giri, N., Alter, B.P., Penrose, K., Falk, R.T., Pan, Y., Savage, S.A., Williams, M., Kemp, T.J., Pinto, L.A., 2015. Immune status of patients with inherited bone marrow failure syndromes. *Am J Hematol* 90, 702-708.
- Gregory, L.A., Aguisa-Toure, A.H., Pinaud, N., Legrand, P., Gleizes, P.E., Fribourg, S., 2007. Molecular basis of Diamond-Blackfan anemia: structure and function analysis of RPS19. *Nucleic Acids Res* 35, 5913-5921.
- Gripp, K.W., Curry, C., Olney, A.H., Sandoval, C., Fisher, J., Chong, J.X., Genomics, U.W.C.f.M., Pilchman, L., Sahraoui, R., Stabley, D.L., Sol-Church, K., 2014. Diamond-Blackfan anemia with mandibulofacial dystostosis is heterogeneous, including the novel DBA genes TSR2 and RPS28. *Am J Med Genet A* 164A, 2240-2249.
- Gutierrez, L., Tsukamoto, S., Suzuki, M., Yamamoto-Mukai, H., Yamamoto, M., Philipsen, S., Ohneda, K., 2008. Ablation of Gata1 in adult mice results in aplastic crisis, revealing its essential role in steady-state and stress erythropoiesis. *Blood* 111, 4375-4385.
- Hasegawa, A., Shimizu, R., Mohandas, N., Yamamoto, M., 2012. Mature erythrocyte membrane homeostasis is compromised by loss of the GATA1-FOG1 interaction. *Blood* 119, 2615-2623.
- Hernandez, A., Villegas, A., Anguita, E., 2010. Human promoter mutations unveil Oct-1 and GATA-1 opposite action on Gfi1b regulation. *Ann Hematol* 89, 759-765.
- Hiregange, D.G., Rivalta, A., Yonath, A., Zimmerman, E., Bashan, A., Yonath, H., 2022. Mutations in RPS19 may affect ribosome function and biogenesis in Diamond Blackfan anemia. *FEBS Open Bio*.
- Hsieh, P.C., Chang, J.C., Sun, W.T., Hsieh, S.C., Wang, M.C., Wang, F.F., 2007. p53 downstream target DDA3 is a novel microtubule-associated protein that interacts with end-binding protein EB3 and activates beta-catenin pathway. *Oncogene* 26, 4928-4940.
- Hsieh, W.J., Hsieh, S.C., Chen, C.C., Wang, F.F., 2008. Human DDA3 is an oncoprotein down-regulated by p53 and DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun* 369, 567-572.
- Huang, D.Y., Kuo, Y.Y., Lai, J.S., Suzuki, Y., Sugano, S., Chang, Z.F., 2004. GATA-1 and NF-Y cooperate to mediate erythroid-specific transcription of Gfi-1B gene. *Nucleic Acids Res* 32, 3935-3946.
- Challen, G.A., Boles, N., Lin, K.K., Goodell, M.A., 2009. Mouse hematopoietic stem cell identification and analysis. *Cytometry A* 75, 14-24.
- Chen, D., Zhang, Z., Li, M., Wang, W., Li, Y., Rayburn, E.R., Hill, D.L., Wang, H., Zhang, R., 2007. Ribosomal protein S7 as a novel modulator of p53-MDM2 interaction: binding to MDM2, stabilization of p53 protein, and activation of p53 function. *Oncogene* 26, 5029-5037.



- Chen, S., Warszawski, J., Bader-Meunier, B., Tchernia, G., Da Costa, L., Marie, I., Dommergues, J.P., Societe Francaise d'Hematologie et d'Immunologie, P., 2005. Diamond-blackfan anemia and growth status: the French registry. *J Pediatr* 147, 669-673.
- Cheng, J., Lau, B., La Venuta, G., Ameismeier, M., Berninghausen, O., Hurt, E., Beckmann, R., 2020. 90S pre-ribosome transformation into the primordial 40S subunit. *Science* 369, 1470-1476.
- Choesmel, V., Bacqueville, D., Rouquette, J., Noaillac-Depeyre, J., Fribourg, S., Cretien, A., Leblanc, T., Tchernia, G., Da Costa, L., Gleizes, P.E., 2007. Impaired ribosome biogenesis in Diamond-Blackfan anemia. *Blood* 109, 1275-1283.
- Iskander, D., Roberts, I., Rees, C., Szydlo, R., Alikian, M., Neale, M., Harrington, Y., Kelleher, P., Karadimitris, A., de la Fuente, J., 2019. Impaired cellular and humoral immunity is a feature of Diamond-Blackfan anaemia; experience of 107 unselected cases in the United Kingdom. *Br J Haematol* 186, 321-326.
- Iskander, D., Wang, G., Heuston, E.F., Christodoulidou, C., Psaila, B., Ponnusamy, K., Ren, H., Mokhtari, Z., Robinson, M., Chaidos, A., Trivedi, P., Trasanidis, N., Katsarou, A., Szydlo, R., Pali, C.G., Zaidi, M.H., Al-Oqaily, Q., Caputo, V.S., Roy, A., Harrington, Y., Karnik, L., Naresh, K., Mead, A.J., Thongjuea, S., Brand, M., de la Fuente, J., Bodine, D.M., Roberts, I., Karadimitris, A., 2021. Single-cell profiling of human bone marrow progenitors reveals mechanisms of failing erythropoiesis in Diamond-Blackfan anemia. *Sci Transl Med* 13, eabf0113.
- Jaako, P., Debnath, S., Olsson, K., Modlich, U., Rothe, M., Schambach, A., Flygare, J., Karlsson, S., 2014. Gene therapy cures the anemia and lethal bone marrow failure in a mouse model of RPS19-deficient Diamond-Blackfan anemia. *Haematologica* 99, 1792-1798.
- Jaako, P., Flygare, J., Olsson, K., Quere, R., Ehinger, M., Henson, A., Ellis, S., Schambach, A., Baum, C., Richter, J., Larsson, J., Bryder, D., Karlsson, S., 2011. Mice with ribosomal protein S19 deficiency develop bone marrow failure and symptoms like patients with Diamond-Blackfan anemia. *Blood* 118, 6087-6096.
- Jin, A., Itahana, K., O'Keefe, K., Zhang, Y., 2004. Inhibition of HDM2 and activation of p53 by ribosomal protein L23. *Mol Cell Biol* 24, 7669-7680.
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Zidek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S.A.A., Ballard, A.J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., Silver, D., Vinyals, O., Senior, A.W., Kavukcuoglu, K., Kohli, P., Hassabis, D., 2021. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596, 583-589.
- Kang, Y.A., Sanalkumar, R., O'Geen, H., Linnemann, A.K., Chang, C.J., Bouhassira, E.E., Farnham, P.J., Keles, S., Bresnick, E.H., 2012. Autophagy driven by a master regulator of hematopoiesis. *Mol Cell Biol* 32, 226-239.
- Karaosmanoglu, B., Kursunel, M.A., Uckan Cetinkaya, D., Gumruk, F., Esendagli, G., Unal, S., Taskiran, E.Z., 2021. Proerythroblast Cells of Diamond-Blackfan Anemia Patients With RPS19 and CECR1 Mutations Have Similar Transcriptomic Signature. *Front Physiol* 12, 679919.
- Kawase, T., Ohki, R., Shibata, T., Tsutsumi, S., Kamimura, N., Inazawa, J., Ohta, T., Ichikawa, H., Aburatani, H., Tashiro, F., Taya, Y., 2009. PH domain-only protein PHLDA3 is a p53-regulated repressor of Akt. *Cell* 136, 535-550.
- Kazerounian, S., Yuan, D., Alexander, M.S., Beggs, A.H., Gazda, H.T., 2019. Rpl5-Inducible Mouse Model for Studying Diamond-Blackfan Anemia. *Discoveries (Craiova)* 7, e96.

- Keel, S.B., Doty, R.T., Yang, Z., Quigley, J.G., Chen, J., Knoblauch, S., Kingsley, P.D., De Domenico, I., Vaughn, M.B., Kaplan, J., Palis, J., Abkowitz, J.L., 2008. A heme export protein is required for red blood cell differentiation and iron homeostasis. *Science* 319, 825-828.
- Kerenyi, M.A., Grebien, F., Gehart, H., Schiffrer, M., Artaker, M., Kovacic, B., Beug, H., Moriggl, R., Mullner, E.W., 2008. Stat5 regulates cellular iron uptake of erythroid cells via IRP-2 and TfR-1. *Blood* 112, 3878-3888.
- Khajuria, R.K., Munschauer, M., Ulirsch, J.C., Fiorini, C., Ludwig, L.S., McFarland, S.K., Abdulhay, N.J., Specht, H., Keshishian, H., Mani, D.R., Jovanovic, M., Ellis, S.R., Fulco, C.P., Engreitz, J.M., Schutz, S., Lian, J., Gripp, K.W., Weinberg, O.K., Pinkus, G.S., Gehrke, L., Regev, A., Lander, E.S., Gazda, H.T., Lee, W.Y., Panse, V.G., Carr, S.A., Sankaran, V.G., 2018. Ribosome Levels Selectively Regulate Translation and Lineage Commitment in Human Hematopoiesis. *Cell* 173, 90-103 e119.
- Kim, A.R., Ulirsch, J.C., Wilmes, S., Unal, E., Moraga, I., Karakukcu, M., Yuan, D., Kazerounian, S., Abdulhay, N.J., King, D.S., Gupta, N., Gabriel, S.B., Lander, E.S., Patiroglu, T., Ozcan, A., Ozdemir, M.A., Garcia, K.C., Piehler, J., Gazda, H.T., Klein, D.E., Sankaran, V.G., 2017. Functional Selectivity in Cytokine Signaling Revealed Through a Pathogenic EPO Mutation. *Cell* 168, 1053-1064 e1015.
- Kimura, S.H., Nojima, H., 2002. Cyclin G1 associates with MDM2 and regulates accumulation and degradation of p53 protein. *Genes Cells* 7, 869-880.
- Klinge, S., Woolford, J.L., Jr., 2019. Ribosome assembly coming into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20, 116-131.
- Kobayashi, M., Yamamoto, M., 2007. Regulation of GATA1 gene expression. *J Biochem* 142, 1-10.
- Konikkat, S., Woolford, J.L., Jr., 2017. Principles of 60S ribosomal subunit assembly emerging from recent studies in yeast. *Biochem J* 474, 195-214.
- Kreis, N.N., Louwen, F., Yuan, J., 2019. The Multifaceted p21 (Cip1/Waf1/CDKN1A) in Cell Differentiation, Migration and Cancer Therapy. *Cancers (Basel)* 11.
- Kressler, D., Hurt, E., Bassler, J., 2017. A Puzzle of Life: Crafting Ribosomal Subunits. *Trends Biochem Sci* 42, 640-654.
- Lin, C.S., Lim, S.K., D'Agati, V., Costantini, F., 1996. Differential effects of an erythropoietin receptor gene disruption on primitive and definitive erythropoiesis. *Genes Dev* 10, 154-164.
- Lipton, J.M., Atsidaftos, E., Zyskind, I., Vlachos, A., 2006. Improving clinical care and elucidating the pathophysiology of Diamond Blackfan anemia: an update from the Diamond Blackfan Anemia Registry. *Pediatr Blood Cancer* 46, 558-564.
- Lipton, J.M., Ellis, S.R., 2009. Diamond-Blackfan anemia: diagnosis, treatment, and molecular pathogenesis. *Hematol Oncol Clin North Am* 23, 261-282.
- Liu, Y., Pop, R., Sadegh, C., Brugnara, C., Haase, V.H., Socolovsky, M., 2006. Suppression of Fas-FasL coexpression by erythropoietin mediates erythroblast expansion during the erythropoietic stress response in vivo. *Blood* 108, 123-133.
- Lohrum, M.A.E., Ludwig, R.L., Kubbutat, M.H.G., Hanlon, M., Vousden, K.H., 2003. Regulation of MDM2 activity by the ribosomal protein L11. *Cancer Cell* 3, 577-587.
- Ludwig, L.S., Gazda, H.T., Eng, J.C., Eichhorn, S.W., Thiru, P., Ghazvinian, R., George, T.I., Gotlib, J.R., Beggs, A.H., Sieff, C.A., Lodish, H.F., Lander, E.S., Sankaran, V.G., 2014. Altered translation of GATA1 in Diamond-Blackfan anemia. *Nat Med* 20, 748-753.

- Matsson, H., Davey, E.J., Draptchinskaia, N., Hamaguchi, I., Ooka, A., Leveen, P., Forsberg, E., Karlsson, S., Dahl, N., 2004. Targeted disruption of the ribosomal protein S19 gene is lethal prior to implantation. *Mol Cell Biol* 24, 4032-4037.
- Matsson, H., Davey, E.J., Frojmark, A.S., Miyake, K., Utsugisawa, T., Flygare, J., Zahou, E., Byman, I., Landin, B., Ronquist, G., Karlsson, S., Dahl, N., 2006. Erythropoiesis in the Rps19 disrupted mouse: Analysis of erythropoietin response and biochemical markers for Diamond-Blackfan anemia. *Blood Cells Mol Dis* 36, 259-264.
- McGowan, K.A., Li, J.Z., Park, C.Y., Beaudry, V., Tabor, H.K., Sabnis, A.J., Zhang, W., Fuchs, H., de Angelis, M.H., Myers, R.M., Attardi, L.D., Barsh, G.S., 2008. Ribosomal mutations cause p53-mediated dark skin and pleiotropic effects. *Nat Genet* 40, 963-970.
- Miano, M., Eikema, D.J., de la Fuente, J., Bosman, P., Ghavamzadeh, A., Smiers, F., Sengelov, H., Yesilipek, A., Formankova, R., Bader, P., Diaz Perez, M.A., Bertrand, Y., Niemeyer, C., Diallo, S., Ansari, M., Bykova, T.A., Faraci, M., Bonanomi, S., Gozdzik, J., Satti, T.M., Bodova, I., Wolfl, M., Rocha, V.G., Mellgren, K., Rascon, J., Holter, W., Lange, A., Meisel, R., Beguin, Y., Mozo, Y., Krivan, G., Sirvent, A., Bruno, B., Dalle, J.H., Onofrillo, D., Giardino, S., Risitano, A.M., de Latour, R.P., Dufour, C., 2021. Stem Cell Transplantation for Diamond-Blackfan Anemia. A Retrospective Study on Behalf of the Severe Aplastic Anemia Working Party of the European Blood and Marrow Transplantation Group (EBMT). *Transplant Cell Ther* 27, 274 e271-274 e275.
- Moraga, I., Wernig, G., Wilmes, S., Gryshkova, V., Richter, C.P., Hong, W.J., Sinha, R., Guo, F., Fabionar, H., Wehrman, T.S., Krutzik, P., Demharter, S., Plo, I., Weissman, I.L., Minary, P., Majeti, R., Constantinescu, S.N., Piehler, J., Garcia, K.C., 2015. Tuning cytokine receptor signaling by re-orienting dimer geometry with surrogate ligands. *Cell* 160, 1196-1208.
- Morgado-Palacin, L., Varetto, G., Llanos, S., Gomez-Lopez, G., Martinez, D., Serrano, M., 2015. Partial Loss of Rpl11 in Adult Mice Recapitulates Diamond-Blackfan Anemia and Promotes Lymphomagenesis. *Cell Rep* 13, 712-722.
- Nandakumar, S.K., Ulirsch, J.C., Sankaran, V.G., 2016. Advances in understanding erythropoiesis: evolving perspectives. *Br J Haematol* 173, 206-218.
- Narla, A., Ebert, B.L., 2010. Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction. *Blood* 115, 3196-3205.
- Narla, A., Payne, E.M., Abayasekara, N., Hurst, S.N., Raiser, D.M., Look, A.T., Berliner, N., Ebert, B.L., Khanna-Gupta, A., 2014. L-Leucine improves the anaemia in models of Diamond Blackfan anaemia and the 5q- syndrome in a TP53-independent way. *Br J Haematol* 167, 524-528.
- Natchiar, S.K., Myasnikov, A.G., Kratzat, H., Hazemann, I., Klaholz, B.P., 2017. Visualization of chemical modifications in the human 80S ribosome structure. *Nature* 551, 472-477.
- Neubauer, H., Cumano, A., Müller, M., Wu, H., Huffstadt, U., Pfeffer, K., 1998. Jak2 Deficiency Defines an Essential Developmental Checkpoint in Definitive Hematopoiesis. *Cell* 93, 397-409.
- Nicolas, E., Parisot, P., Pinto-Monteiro, C., de Walque, R., De Vleeschouwer, C., Lafontaine, D.L., 2016. Involvement of human ribosomal proteins in nucleolar structure and p53-dependent nucleolar stress. *Nat Commun* 7, 11390.
- O'Donohue, M.F., Da Costa, L., Lezzerini, M., Unal, S., Joret, C., Bartels, M., Brilstra, E., Scheijde-Vermeulen, M., Wacheul, L., De Keersmaecker, K., Vereecke, S., Labarque, V., Saby, M., Lefevre, S.D., Platon, J., Montel-Lehry, N., Laugero, N., Lacazette, E., van Gassen, K., Houtkooper, R.H., Simsek-Kiper, P.O., Leblanc, T., Yarali, N., Cetinkaya, A., Akarsu, N.A., Gleizes, P.E., Lafontaine, D.L.J., MacInnes, A.W., 2022. HEATR3 variants impair nuclear import of uL18 (RPL5) and drive Diamond-Blackfan anemia. *Blood* 139, 3111-3126.

- Ofir-Rosenfeld, Y., Boggs, K., Michael, D., Kastan, M.B., Oren, M., 2008. Mdm2 Regulates p53 mRNA Translation through Inhibitory Interactions with Ribosomal Protein L26. *Molecular Cell* 32, 180-189.
- Okamoto, K., Beach, D., 1994. Cyclin G is a transcriptional target of the p53 tumor suppressor protein. *The EMBO Journal* 13, 4816-4822.
- Okamoto, K., Li, H., Jensen, M.R., Zhang, T., Taya, Y., Thorgeirsson, S.S., Prives, C., 2002. Cyclin G recruits PP2A to dephosphorylate Mdm2. *Mol Cell* 9, 761-771.
- Oliver, E.R., Saunders, T.L., Tarle, S.A., Glaser, T., 2004. Ribosomal protein L24 defect in belly spot and tail (Bst), a mouse Minute. *Development* 131, 3907-3920.
- Olivier, M., Hollstein, M., Hainaut, P., 2010. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a001008.
- Orfali, K.A., Ohene-Abuakwa, Y., Ball, S.E., 2004. Diamond Blackfan anaemia in the UK: clinical and genetic heterogeneity. *Br J Haematol* 125, 243-252.
- Pant, V., Quintas-Cardama, A., Lozano, G., 2012. The p53 pathway in hematopoiesis: lessons from mouse models, implications for humans. *Blood* 120, 5118-5127.
- Papetti, M., Wontakal, S.N., Stopka, T., Skoultchi, A.I., 2010. GATA-1 directly regulates p21 gene expression during erythroid differentiation. *Cell Cycle* 9, 1972-1980.
- Parganas, E., Wang, D., Stravopodis, D., Topham, D.J., Marine, J.-C., Teglund, S., Vanin, E.F., Bodner, S., Colamonici, O.R., van Deursen, J.M., Grosveld, G., Ihle, J.N., 1998. Jak2 Is Essential for Signaling through a Variety of Cytokine Receptors. *Cell* 93, 385-395.
- Parrella, S., Aspesi, A., Quarello, P., Garelli, E., Pavesi, E., Carando, A., Nardi, M., Ellis, S.R., Ramenghi, U., Dianzani, I., 2014. Loss of GATA-1 full length as a cause of Diamond-Blackfan anemia phenotype. *Pediatr Blood Cancer* 61, 1319-1321.
- Payne, E.M., Virgilio, M., Narla, A., Sun, H., Levine, M., Paw, B.H., Berliner, N., Look, A.T., Ebert, B.L., Khanna-Gupta, A., 2012. L-Leucine improves the anemia and developmental defects associated with Diamond-Blackfan anemia and del(5q) MDS by activating the mTOR pathway. *Blood* 120, 2214-2224.
- Pestov, D.G., Strezoska, Z., Lau, L.F., 2001. Evidence of p53-dependent cross-talk between ribosome biogenesis and the cell cycle: effects of nucleolar protein Bop1 on G(1)/S transition. *Mol Cell Biol* 21, 4246-4255.
- Pevny, L., Simon, M.C., Robertson, E., Klein, W.H., Tsai, S.F., D'Agati, V., Orkin, S.H., Costantini, F., 1991. Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* 349, 257-260.
- Phipps, K.R., Charette, J., Baserga, S.J., 2011. The small subunit processome in ribosome biogenesis-progress and prospects. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2, 1-21.
- Pop, R., Shearstone, J.R., Shen, Q., Liu, Y., Hallstrom, K., Koulunis, M., Gribnau, J., Socolovsky, M., 2010. A key commitment step in erythropoiesis is synchronized with the cell cycle clock through mutual inhibition between PU.1 and S-phase progression. *PLoS Biol* 8.
- Pospisilova, D., Cmejlova, J., Hak, J., Adam, T., Cmejla, R., 2007. Successful treatment of a Diamond-Blackfan anemia patient with amino acid leucine. *Haematologica* 92, e66-67.
- Quarello, P., Garelli, E., Carando, A., Mancini, C., Foglia, L., Botto, C., Farruggia, P., De Keersmaecker, K., Aspesi, A., Ellis, S.R., Dianzani, I., Ramenghi, U., 2016. Ribosomal RNA analysis in the diagnosis of Diamond-Blackfan Anaemia. *Br J Haematol* 172, 782-785.

- Rey, M.A., Duffy, S.P., Brown, J.K., Kennedy, J.A., Dick, J.E., Dror, Y., Taylor, C.S., 2008. Enhanced alternative splicing of the FLVCR1 gene in Diamond Blackfan anemia disrupts FLVCR1 expression and function that are critical for erythropoiesis. *Haematologica* 93, 1617-1626.
- Rhodes, M.M., Kopsombut, P., Bondurant, M.C., Price, J.O., Koury, M.J., 2005. Bcl-x(L) prevents apoptosis of late-stage erythroblasts but does not mediate the antiapoptotic effect of erythropoietin. *Blood* 106, 1857-1863.
- Ribeil, J.A., Zermati, Y., Vandekerckhove, J., Cathelin, S., Kersual, J., Dussiot, M., Coulon, S., Moura, I.C., Zeuner, A., Kirkegaard-Sorensen, T., Varet, B., Solary, E., Garrido, C., Hermine, O., 2007. Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. *Nature* 445, 102-105.
- Rio, S., Gastou, M., Karboul, N., Derman, R., Suriyun, T., Manceau, H., Leblanc, T., El Benna, J., Schmitt, C., Azouzi, S., Larghero, J., Karim, Z., Macias-Garcia, A., Chen, J.J., Hermine, O., Courtois, G., Puy, H., Gouya, L., Mohandas, N., Da Costa, L., 2019. Regulation of globin-heme balance in Diamond-Blackfan anemia by HSP70/GATA1. *Blood* 133, 1358-1370.
- Roggero, S., Quarello, P., Vinciguerra, T., Longo, F., Piga, A., Ramenghi, U., 2009. Severe iron overload in Blackfan-Diamond anemia: a case-control study. *Am J Hematol* 84, 729-732.
- Rubbi, C.P., Milner, J., 2003. Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses. *EMBO J* 22, 6068-6077.
- Sankaran, V.G., Ghazvinian, R., Do, R., Thiru, P., Vergilio, J.A., Beggs, A.H., Sieff, C.A., Orkin, S.H., Nathan, D.G., Lander, E.S., Gazda, H.T., 2012. Exome sequencing identifies GATA1 mutations resulting in Diamond-Blackfan anemia. *J Clin Invest* 122, 2439-2443.
- Scull, C.E., Schneider, D.A., 2019. Coordinated Control of rRNA Processing by RNA Polymerase I. *Trends Genet* 35, 724-733.
- Signer, R.A., Magee, J.A., Salic, A., Morrison, S.J., 2014. Haematopoietic stem cells require a highly regulated protein synthesis rate. *Nature* 509, 49-54.
- Singh, S.A., Goldberg, T.A., Henson, A.L., Husain-Krautter, S., Nihrane, A., Blanc, L., Ellis, S.R., Lipton, J.M., Liu, J.M., 2014. p53-Independent cell cycle and erythroid differentiation defects in murine embryonic stem cells haploinsufficient for Diamond Blackfan anemia-proteins: RPS19 versus RPL5. *PLoS One* 9, e89098.
- Singh, V.K., Saini, A., Kalsan, M., Kumar, N., Chandra, R., 2016. Stage-Specific Regulation of Erythropoiesis and Its Implications in Ex-Vivo RBCs Generation. *J Stem Cells* 11, 149-169.
- Sjogren, S.E., Siva, K., Soneji, S., George, A.J., Winkler, M., Jaako, P., Wlodarski, M., Karlsson, S., Hannan, R.D., Flygare, J., 2015. Glucocorticoids improve erythroid progenitor maintenance and dampen Trp53 response in a mouse model of Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol* 171, 517-529.
- Socolovsky, M., Fallon, A.E.J., Wang, S., Brugnara, C., Lodish, H.F., 1999. Fetal Anemia and Apoptosis of Red Cell Progenitors in Stat5a<sup>-/-</sup>5b<sup>-/-</sup> Mice. *Cell* 98, 181-191.
- Socolovsky, M., Nam, H., Fleming, M.D., Haase, V.H., Brugnara, C., Lodish, H.F., 2001. Ineffective erythropoiesis in Stat5a<sup>(-/-)</sup>5b<sup>(-/-)</sup> mice due to decreased survival of early erythroblasts. *Blood* 98, 3261-3273.
- Spevak, C.C., Elias, H.K., Kannan, L., Ali, M.A.E., Martin, G.H., Selvaraj, S., Eng, W.S., Ernlund, A., Rajasekhar, V.K., Woolthuis, C.M., Zhao, G., Ha, C.J., Schneider, R.J., Park, C.Y., 2020. Hematopoietic Stem and Progenitor Cells Exhibit Stage-Specific Translational Programs via mTOR- and CDK1-Dependent Mechanisms. *Cell Stem Cell* 26, 755-765 e757.

- Strahm, B., Loewecke, F., Niemeyer, C.M., Albert, M., Ansari, M., Bader, P., Bertrand, Y., Burkhardt, B., Da Costa, L.M., Ferster, A., Fischer, A., Gungor, T., Gruhn, B., Hainmann, I., Kapp, F., Lang, P., Muller, I., Schulz, A., Szvetnik, A., Wlodarski, M., Noellke, P., Leblanc, T., Dalle, J.H., 2020. Favorable outcomes of hematopoietic stem cell transplantation in children and adolescents with Diamond-Blackfan anemia. *Blood Adv* 4, 1760-1769.
- Strunk, B.S., Loucks, C.R., Su, M., Vashisth, H., Cheng, S., Schilling, J., Brooks, C.L., 3rd, Karbstein, K., Skinnotis, G., 2011. Ribosome assembly factors prevent premature translation initiation by 40S assembly intermediates. *Science* 333, 1449-1453.
- Sulima, S.O., Kampen, K.R., De Keersmaecker, K., 2019. Cancer Biogenesis in Ribosomopathies. *Cells* 8.
- Suzuki, A., Kogo, R., Kawahara, K., Sasaki, M., Nishio, M., Maehama, T., Sasaki, T., Mimori, K., Mori, M., 2012. A new PICTURE of nucleolar stress. *Cancer Sci* 103, 632-637.
- Tanikawa, C., Ri, C., Kumar, V., Nakamura, Y., Matsuda, K., 2010. Crosstalk of EDA-A2/XEDAR in the p53 signaling pathway. *Mol Cancer Res* 8, 855-863.
- Teng, T., Mercer, C.A., Hexley, P., Thomas, G., Fumagalli, S., 2013. Loss of tumor suppressor RPL5/RPL11 does not induce cell cycle arrest but impedes proliferation due to reduced ribosome content and translation capacity. *Mol Cell Biol* 33, 4660-4671.
- Torihara, H., Uechi, T., Chakraborty, A., Shinya, M., Sakai, N., Kenmochi, N., 2011. Erythropoiesis failure due to RPS19 deficiency is independent of an activated Tp53 response in a zebrafish model of Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol* 152, 648-654.
- Trainor, C.D., Mas, C., Archambault, P., Di Lello, P., Omichinski, J.G., 2009. GATA-1 associates with and inhibits p53. *Blood* 114, 165-173.
- Uechi, T., Nakajima, Y., Chakraborty, A., Torihara, H., Higa, S., Kenmochi, N., 2008. Deficiency of ribosomal protein S19 during early embryogenesis leads to reduction of erythrocytes in a zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia. *Hum Mol Genet* 17, 3204-3211.
- Ulirsch, J.C., Verboon, J.M., Kazerounian, S., Guo, M.H., Yuan, D., Ludwig, L.S., Handsaker, R.E., Abdulhay, N.J., Fiorini, C., Genovese, G., Lim, E.T., Cheng, A., Cummings, B.B., Chao, K.R., Beggs, A.H., Genetti, C.A., Sieff, C.A., Newburger, P.E., Niewiadomska, E., Matysiak, M., Vlachos, A., Lipton, J.M., Atsidaftos, E., Glader, B., Narla, A., Gleizes, P.E., O'Donohue, M.F., Montel-Lehry, N., Amor, D.J., McCarroll, S.A., O'Donnell-Luria, A.H., Gupta, N., Gabriel, S.B., MacArthur, D.G., Lander, E.S., Lek, M., Da Costa, L., Nathan, D.G., Korostelev, A.A., Do, R., Sankaran, V.G., Gazda, H.T., 2018. The Genetic Landscape of Diamond-Blackfan Anemia. *Am J Hum Genet* 103, 930-947.
- Vilaboa, N., Bermejo, R., Martinez, P., Bornstein, R., Cales, C., 2004. A novel E2 box-GATA element modulates Cdc6 transcription during human cells polyploidization. *Nucleic Acids Res* 32, 6454-6467.
- Vilborg, A., Glahder, J.A., Wilhelm, M.T., Bersani, C., Corcoran, M., Mahmoudi, S., Rosenstierne, M., Grander, D., Farnebo, M., Norrild, B., Wiman, K.G., 2009. The p53 target Wig-1 regulates p53 mRNA stability through an AU-rich element. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 15756-15761.
- Vlachos, A., Atsidaftos, E., Lababidi, M.L., Muir, E., Rogers, Z.R., Alhushki, W., Bernstein, J., Glader, B., Gruner, B., Hartung, H., Knoll, C., Loew, T., Nalepa, G., Narla, A., Panigrahi, A.R., Sieff, C.A., Walkovich, K., Farrar, J.E., Lipton, J.M., 2020. L-leucine improves anemia and growth in patients with transfusion-dependent Diamond-Blackfan anemia: Results from a multicenter pilot phase I/II study from the Diamond-Blackfan Anemia Registry. *Pediatr Blood Cancer* 67, e28748.
- Vlachos, A., Atsidaftos, E., Muir, E., Rogers, Z.R., Lababidi, M.L., Alhushki, W., Farrar, J.E., Glader, B., Gruner, B., Hartung, H., Knoll, C.M., Nalepa, G., Narla, A., Panigrahi, A.R., Sieff, C.A., Walkovich,

- K.J., Lipton, J.M., 2018a. Leucine for the Treatment of Transfusion Dependence in Patients with Diamond Blackfan Anemia. *Blood* 132, 755-755.
- Vlachos, A., Ball, S., Dahl, N., Alter, B.P., Sheth, S., Ramenghi, U., Meerpohl, J., Karlsson, S., Liu, J.M., Leblanc, T., Paley, C., Kang, E.M., Leder, E.J., Atsidaftos, E., Shimamura, A., Bessler, M., Glader, B., Lipton, J.M., Participants of Sixth Annual Daniella Maria Arturi International Consensus, C., 2008. Diagnosing and treating Diamond Blackfan anaemia: results of an international clinical consensus conference. *Br J Haematol* 142, 859-876.
- Vlachos, A., Muir, E., 2010. How I treat Diamond-Blackfan anemia. *Blood* 116, 3715-3723.
- Vlachos, A., Osorio, D.S., Atsidaftos, E., Kang, J., Lababidi, M.L., Seiden, H.S., Gruber, D., Glader, B.E., Onel, K., Farrar, J.E., Bodine, D.M., Aspesi, A., Dianzani, I., Ramenghi, U., Ellis, S.R., Lipton, J.M., 2018b. Increased Prevalence of Congenital Heart Disease in Children With Diamond Blackfan Anemia Suggests Unrecognized Diamond Blackfan Anemia as a Cause of Congenital Heart Disease in the General Population: A Report of the Diamond Blackfan Anemia Registry. *Circ Genom Precis Med* 11, e002044.
- Volarevic, S., Stewart, M.J., Ledermann, B., Zilberman, F., Terracciano, L., Montini, E., Grompe, M., Kozma, S.C., Thomas, G., 2000. Proliferation, but not growth, blocked by conditional deletion of 40S ribosomal protein S6. *Science* 288, 2045-2047.
- Watkins-Chow, D.E., Cooke, J., Pidsley, R., Edwards, A., Slotkin, R., Leeds, K.E., Mullen, R., Baxter, L.L., Campbell, T.G., Salzer, M.C., Biondini, L., Gibney, G., Phan Dinh Tuy, F., Chelly, J., Morris, H.D., Riegler, J., Lythgoe, M.F., Arkell, R.M., Loreni, F., Flint, J., Pavan, W.J., Keays, D.A., 2013. Mutation of the diamond-blackfan anemia gene *Rps7* in mouse results in morphological and neuroanatomical phenotypes. *PLoS Genet* 9, e1003094.
- Watkins, N.J., Bohnsack, M.T., 2012. The box C/D and H/ACA snoRNPs: key players in the modification, processing and the dynamic folding of ribosomal RNA. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 3, 397-414.
- Weiss, M.J., Orkin, S.H., 1995. Transcription factor GATA-1 permits survival and maturation of erythroid precursors by preventing apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9623-9627.
- Willig, T.N., Draptchinskaia, N., Dianzani, I., Ball, S., Niemeyer, C., Ramenghi, U., Orfali, K., Gustavsson, P., Garelli, E., Brusco, A., Tiemann, C., Perignon, J.L., Bouchier, C., Cicchiello, L., Dahl, N., Mohandas, N., Tchernia, G., 1999. Mutations in ribosomal protein S19 gene and diamond blackfan anemia: wide variations in phenotypic expression. *Blood* 94, 4294-4306.
- Wood, A.D., Chen, E., Donaldson, I.J., Hattangadi, S., Burke, K.A., Dawson, M.A., Miranda-Saavedra, D., Lodish, H.F., Green, A.R., Gottgens, B., 2009. ID1 promotes expansion and survival of primary erythroid cells and is a target of JAK2V617F-STAT5 signaling. *Blood* 114, 1820-1830.
- Woods, D.B., Vousden, K.H., 2001. Regulation of p53 function. *Exp Cell Res* 264, 56-66.
- Wu, H., Liu, X., Jaenisch, R., Lodish, H.F., 1995. Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* 83, 59-67.
- Xiong, X., Zhao, Y., He, H., Sun, Y., 2011. Ribosomal protein S27-like and S27 interplay with p53-MDM2 axis as a target, a substrate and a regulator. *Oncogene* 30, 1798-1811.
- Yadav, G.V., Chakraborty, A., Uechi, T., Kenmochi, N., 2014. Ribosomal protein deficiency causes Tp53-independent erythropoiesis failure in zebrafish. *Int J Biochem Cell Biol* 49, 1-7.
- Yadavilli, S., Mayo, L.D., Higgins, M., Lain, S., Hegde, V., Deutsch, W.A., 2009. Ribosomal protein S3: A multi-functional protein that interacts with both p53 and MDM2 through its KH domain. *DNA Repair* 8, 1215-1224.

- Yang, Z., Keel, S.B., Shimamura, A., Liu, L., Gerds, A.T., Li, H.Y., Wood, B.L., Scott, B.L., Abkowitz, J.L., 2016. Delayed globin synthesis leads to excess heme and the macrocytic anemia of Diamond Blackfan anemia and del(5q) myelodysplastic syndrome. *Sci Transl Med* 8, 338ra367.
- Yu, H., Sun, Z., Tan, T., Pan, H., Zhao, J., Zhang, L., Chen, J., Lei, A., Zhu, Y., Chen, L., Xu, Y., Liu, Y., Chen, M., Sheng, J., Xu, Z., Qian, P., Li, C., Gao, S., Daley, G.Q., Zhang, J., 2021a. rRNA biogenesis regulates mouse 2C-like state by 3D structure reorganization of peri-nucleolar heterochromatin. *Nat Commun* 12, 6365.
- Yu, L., Lemay, P., Ludlow, A., Guyot, M.C., Jones, M., Mohamed, F.F., Saroya, G.A., Panaretos, C., Schneider, E., Wang, Y., Myers, G., Khoriaty, R., Li, Q., Franceschi, R., Engel, J.D., Kaartinen, V., Rothstein, T.L., Justice, M.J., Kibar, Z., Singh, S.A., 2021b. A new murine Rpl5 (uL18) mutation provides a unique model of variably penetrant Diamond-Blackfan anemia. *Blood Adv* 5, 4167-4178.
- Yusupova, G., Yusupov, M., 2017. Crystal structure of eukaryotic ribosome and its complexes with inhibitors. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 372.
- Yusupova, G., Yusupov, M., 2021. A Path to the Atomic-Resolution Structures of Prokaryotic and Eukaryotic Ribosomes. *Biochemistry (Mosc)* 86, 926-941.
- Zhai, W., Comai, L., 2000. Repression of RNA polymerase I transcription by the tumor suppressor p53. *Mol Cell Biol* 20, 5930-5938.
- Zhang, J., Harnpicharnchai, P., Jakovljevic, J., Tang, L., Guo, Y., Oeffinger, M., Rout, M.P., Hiley, S.L., Hughes, T., Woolford, J.L., Jr., 2007. Assembly factors Rpf2 and Rrs1 recruit 5S rRNA and ribosomal proteins rpL5 and rpL11 into nascent ribosomes. *Genes Dev* 21, 2580-2592.
- Zhang, X., Wang, W., Wang, H., Wang, M.H., Xu, W., Zhang, R., 2013. Identification of ribosomal protein S25 (RPS25)-MDM2-p53 regulatory feedback loop. *Oncogene* 32, 2782-2791.
- Zhang, Y., Wang, J., Yuan, Y., Zhang, W., Guan, W., Wu, Z., Jin, C., Chen, H., Zhang, L., Yang, X., He, F., 2010. Negative regulation of HDM2 to attenuate p53 degradation by ribosomal protein L26. *Nucleic Acids Research* 38, 6544-6554.
- Zhang, Y., Wolf, G.W., Bhat, K., Jin, A., Allio, T., Burkhardt, W.A., Xiong, Y., 2003. Ribosomal protein L11 negatively regulates oncoprotein MDM2 and mediates a p53-dependent ribosomal-stress checkpoint pathway. *Mol Cell Biol* 23, 8902-8912.