

Praha, 19.8. 2022

Posudek oponenta na diplomovou práci **Bc. Markéty Holečkové**:

### **Poruchy kmenových buněk v myším modelu Diamondovy-Blackfanovy anémie.**

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, např. v RPS19. Mechanismus vzniku patologie této nemoci není dosud přesně znám. Pro lepší porozumění vztahu genotypu a fenotypu u DBA byl laboratoří diplomantky vytvořen myší model s homozygotní mutací vysoce konzervovaného argininu 67 u RPS19 ( $Rps19^{R67\Delta/R67\Delta}$ ), který vykazuje mnoho fenotypových příznaků odpovídajících těm, kterými trpí pacienti s DBA. V této diplomové práci se diplomantka zaměřila na charakterizaci hematopoetických a erytropoetických vlastností tohoto myšího modelu.

Konkrétní cíle této práce v klasickém členění spočívaly v:

- popisu změn v erytropoéze u myšího modelu Diamondovy-Blackfanovy anémie  $Rps19R67\Delta/R67\Delta$
- zjištění vlastností hematopoetických kmenových buněk myšího modelu  $Rps19R67\Delta/R67\Delta$  a popis změn v hematopoetických a progenitorových buňkách
- sledování vlivu mutace v *Trp53* na myší model  $Rps19R67\Delta/R67\Delta$  a popis vlastností myšího modelu  $Rps19R67\Delta/R67\Delta Trp53^{-/-}$

Z mého pohledu se autorce cíle podařilo splnit, beze sporu prokázala schopnost experimentální práce, analýzy dat, vyvozování důsledků z těchto dat i schopnost jejich diskuze, tedy zasazení dosažených výsledků do širšího kontextu všeho, co je v dané problematice již známo.

Následují poznámky, připomínky a dotazy k jednotlivým pasážím (u těch tučně vyznačených poprosím autorku o reakci):

### **1-2. Abstrakt, úvod a literární přehled**

- práci by určitě lépe slušela angličtina než mnohdy složitý překlad zaběhlých termínů a frází do češtiny, nicméně překlepů či šroubovaných českých formulací je poměrně málo, takže autorka to zvládla se ctí; v nadsázce a se vší úctou řečeno, pobavili mě phenotypical trades v abstraktu – to je hudba budoucnosti, zatím zůstáváme jen u „traits“ :)
- vzhledem k náplni celé práce mohla autorka více popsat maturaci pre-40S v cytoplasmě (20S rRNA processing na 18S rRNA) **a vůbec konkrétní roli RPS19 ve 40S biogenezi**
- kapitola 3.3.1. - propojení mezi EPO-EpoR-JAK2 s GATA1 by bylo vhodné zmínit dříve než až na straně 12; de facto by takto měl být GATA1 uveden do problematiky hned při jeho 1. zmínce na str. 11
- **jsou nějaké studie komplexně popisující změnu translatomu u DBA pacientů?** Očekával bych, že kromě hojně zmiňovaného GATA1 „regulonu“ bude translace narušena u mnoha dalších proteinů z celé škály dalších drah a procesů...
- str. 17 – zmíněno snížení BACH1 bez dalších souvislostí
- posl. odstavec na str. 17 je matoucí
- **jaký je mechanismu účinku L-leucinu?**
- **proč se obor zaměřuje na potlačení DBA fenotypu pomocí vyřazení fce p53, když to pak následně vede k robustní tumorogenezi... není to náhodou ta pověstná, Cimrmanovská slepá ulička?**
- na konec literárního úvodu by se hodilo vše stručně shrnout

### **3. Materiál a Metody**

- upřímně řečeno jsem této pasáži nevěnoval příliš velkou pozornost, co jsem si ale všiml, je nedostatečný popis metody qPCR, viz. níže

### **4. Výsledky**

- na úvod mám otázku zřejmě spíše na školitele; **proč byl vybrán sice konzervovaný nicméně v incidenci DBA zatím neprokázaný Arg67? Blízkost „hot spotu“ ani potenc. kontakty s 18S rRNA nemusí vůbec nic znamenat...**
- kap. 7.1. – tomuto experimentu by slušela analýza nějaké kontrolní, nehematopoet. tkáně; **jakým jiným způsobem/technikou by šlo popisované rozdíly zdokumentovat?**
- Obr. 10 je velmi nepřehledný a celému experimentu spíše ubírá na důvěryhodnosti než naopak

- kap. 7.2.2. – **změna bílých krvinek u females (obr. 12) je také nesignif.? Upřímně řečeno, text v kap. 7.2.2 a 3 si ve vztahu k white blood cells až protiřečí....**
- kap. 7.5 – z technického hlediska je tato kapitola zdaleka nejhůře popsána a nepomáhá ani popis qPCR metody v Mat&Met ... **např. byly výsledky normalizovány na nějaký relativně se neměnicí „house-keeping“ gene?; v dnešní době je způsob provedení qPCR poměrně přísně střežen – existuje něco jako MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments; **obstála by Vaše analýza ve světle těchto požadavků?****

### **5. Diskuse**

- velmi mě potěšilo, že diskuze je skutečně diskuzí, nikoliv jen mírně modifikovaným přepisem výsledků, jak to často bývá, takže velké plus
- dle diskuze Jaako et al. 2011 popisuje snížení 40S u myší s mut. RPS19; autorka uvádí, že pozorovala totéž, ale jen v játrech, nikoliv v kostní dřeni ... **jak tomu bylo u Jaako et al. 2011, rovněž tkáňově specif. změny? Lze tyto dvě studie vzájemně lépe porovnat? Vysvětlení proč v játrech ano ale v kost. dřeni ne jsem ne zcela pochopil. Šlo by to ještě trochu lépe rozvinout?**

### **6. Seznam literatury**

Seznam literatury je dle mého aktuální, citace vhodně pokrývají celé spektrum dané problematiky.

Závěrem tedy jen zopakuji, že se z mého pohledu autorce vytýčené cíle podařilo splnit, beze sporu prokázala schopnost experimentální práce, analýzy dat, vyvozování důsledků z těchto dat i schopnost jejich diskuze. S potěšením tuto práci tedy, po její ústní obhajobě, doporučuji ke schválení.

S pozdravem,



Dr. rer. Nat. Leoš Valášek, D.Sc.  
 Laboratoř regulace genové exprese  
 Mikrobiologický Ústav AV ČR  
 Vídeňská 1083  
 142 20, Praha 4