



Oponentský posudek disertační práce

Nucleolar structure and the role of BYSL protein in ribosomopathies

Autor: **Mgr. Zuzana Macečková**, Institut molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

Studium: Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, obor: Pediatrie

Oponent: prof. RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D., Středoevropský technologický institut (CEITEC) a Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno

V rámci svojí disertační práce se autorka zabývala různými aspekty biologie jadérka. Zkoumala jeho strukturu, indukci ribozomálního stresu a jeho dopadů. Zabývala se také patogenezi Diamondovi-Blackfanovi anémie, vrozená anémie mající původ v aberacích ribozomálních proteinů a jejíž léčba je většinou založena na kortikosteroidech. Konkrétně studovala funkci proteinu Bystin v patogenezi tohoto onemocnění a jeho možné souvislosti s léčbou kortikosteroidy.

Práce o rozsahu 63 stran je členěná standardním způsobem, je doplněna 179 literárními odkazy, vesměs recentními. Publikační aktivitu související s tématem disertace představují 2 původní práce *in extenso* v časopise Blood Cells Molecules and Disease (IF=2,3, studentka je první autorkou) a Journal of Proteomics (IF=3,9, studentka je třetí autorkou). Dále je studentka první autorkou přehledové práce na dané téma v časopise International Journal of Molecular Sciences (IF=6,2). Kvalitu publikačních výstupů hodnotím jako velice dobrou. Všechny tři publikace jsou přílohami vlastní disertační práce.

Teoretický úvod o rozsahu 24 stran je přehledný, vystihuje podstatu disertační práce, je logicky členěn na část zaměřenou na biologii jadérka, podstatu ribozomálního stresu, funkce ribozomálních proteinů mimo jejich funkce ve vlastních ribosomech, a to především v patogenezi nádorů, samostatná kapitola je věnována proteinu Bystin, jehož

studium bylo jedním z hlavních cílů disertační práce. Následují cíle práce a popis experimentální části.

Experimentální část je členěná na tři samostatné studie, které jsou vždy členěny na metodiku, výsledky a diskuzi. První studie byla zaměřená na výzkum poškození struktury jadérka účinkem oxaliplatin, druhá studie byla zaměřena na dopad mutace V134F v genu pro ribozomální protein RPS7 na strukturu jadérka a zpracování rRNA. Ve třetím projektu studentka studovala protein Bysl jako jeden z driverů Diamondovi-Blackfanovi anemie, kterou tento protein naplňuje skrze regulaci onkogenu c-Myc. Jednotlivé kapitoly zaměřené na metodiku jsou zpracovány dostatečně detailně a umožňují bezproblémové opakování prováděných analýz včetně jejich vyhodnocení. Výsledky jsou uvedeny konkrétně, v souvislosti s jednotlivými cíli disertační práce a doplněny řadou originální obrazované dokumentace a přehledných schémat. Autorka vždy souhrnně popsala svoje pozorování, která učinila v souladu s plánovanými cíli, které všechny naplnila. Detailně jsou potom výsledky k dispozici v přílohách, kde jsou příslušné publikační výstupy.

V diskuzi jsou vždy postupně interpretovány a kriticky hodnoceny výsledky jednotlivých cílů disertace v souvislosti s nejnovějšími poznatky v dané oblasti.

Jednotlivé diskuzní části jsou dostatečně detailní a poskytují čtenáři možnost zařadit výsledky práce do kontextu současného stupně poznání. Je diskutován jak metodický přístup, tak konkrétní výsledky. Kromě originálních poznatků, autorka také potvrdila některá dřívější pozorování, což svědčí o správnosti používaných metodických přístupů.

Z formálního hlediska v práci nejsou žádné zásadní formální nedostatky. Za drobné nedostatky lze považovat občasný výskyt překlepů, místy nesjednocené používání formátu citací a zařazení části Introduction do popisu první studie s oxaliplatinou v rámci experimentální části práce.

Nové poznatky

Autorka dospěla k několika novým poznatkům rozšiřujícím poznání v dané oblasti, které jsou potenciálně dobře využitelné pro inovativní léčbu Diamondovi-Blackfanovi anemie:

- 1) Detailně popsala vliv oxaliplatiny a mutace V134F v genu RPS7 na strukturu jadérka, přičemž zjistila, že struktura jadérka je důležitým faktorem ribozomálního stresu a může být použita pro jeho hodnocení.
- 2) Zjistila, že protein Bystin hraje roli již ve velice časných fázích Diamondovi-Blackfanovi anemie a řídí patologii této choroby prostřednictvím regulace transkripčního faktoru c-Myc, se kterým přímo interaguje.
- 3) Dále prokázala, že protein Bystin je molekulárním cílem terapie Diamondovi-Blackfanovi anemie glukokortikoidy. Toto zjištění může vést k vývoji nové terapie pro pacienty eliminující závažné vedlejší účinky způsobované léčbou založenou na glukokortikoidech.

Význam pro společenskou praxi a další rozvoj vědy

Výsledky práce byly publikovány v časopisech s IF – lze tedy očekávat citovanost. Práce přispívá k poznání v oblasti a stane se jistě cenným zdrojem informací pro výzkumníky v daném oboru. Výzkum v oblasti role proteinu Bystin v léčbě glukokortikoidy má navíc i vysoký translační potenciál protože naznačuje možný směr pro vývoj inovativní terapie u Diamondovi-Blackfanovi anemie.

Otázky do diskuze

- 1) Jaké další protinádorová léčiva kromě oxaliplatiny mají schopnost indukovat ribozomální stres a narušovat strukturu jadérka a proč jste si vybrala pro svůj výzkum právě oxaliplatinu?
- 2) Ve Vašem výzkumu jste popsala nový mechanismus účinku glukokortikoidů u Diamondovi-Blackfanovi anemiem, který je založený na jejich interakci s proteinem Bystin. Naznačujete možnost použití nízkomolekulárních inhibitorů interakce proteinů Bystin a c-Mys jako novou léčebnou strategii u této nemoci, která by umožnila ochránit pacienty před vedlejšími účinky léčby

Masarykova univerzita, Středoevropský technologický institut

Kamenice 735/5, 625 00 Brno, Česká republika

T: +420 549 49 2911, 6639, E: info@ceitec.muni.cz, www.ceitec.muni.cz

Bankovní spojení: KB Brno-město, ČÚ: 85636621/0100, IČ: 00216224, DIČ: CZ00216224

V odpovědi prosím uvádějte naše číslo jednací.



glukokortikoidy. Plánujete v tomto výzkumu pokračovat a jak by vypadaly další kroky směrem k vývoji a preklinickému testování těchto inhibitorů?

Závěr

V závěru svého hodnocení konstatuji, že disertační práce splňuje požadavky na ni kladené v daném oboru, po stránce obsahové má velmi dobrou úroveň a předkládá nové originální vědecké poznatky v oblasti studia biologie jadérka, ribozomálního stresu a patogeneze Diamondovi-Blackfanovi anemie. Mgr. Zuzana Macečková prokázala tvůrčí schopnosti a její dizertační práci proto doporučuji k obhajobě, a na základě úspěšné obhajoby, k udělení akademického titulu doktor ve zkratce Ph.D. dle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

V Brně 05/10/2022

prof. RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.

Lékařská fakulta a CEITEC

Masarykova univerzita

Masarykova univerzita, Středoevropský technologický institut

Kamenice 735/5, 625 00 Brno, Česká republika
T: +420 549 49 2911, 6639, E: info@ceitec.muni.cz, www.ceitec.muni.cz
Bankovní spojení: KB Brno-město, ČÚ: 85636621/0100, IČ: 00216224, DIČ: CZ00216224
V odpovědi prosím uvádějte naše číslo jednací.





Lékařská fakulta
Univerzity Palackého
v Olomouci

Posudek disertační práce

Student: Mgr. Zuzana Macečková

Disertační práce: **NUCLEOLAR STRUCTURE AND THE ROLE OF BYSL PROTEIN IN RIBOSOMOPATHIES**

Školitel: Doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.

Školící pracoviště: Ústav molekulární a translační medicíny
Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

Předložená práce Mgr. Zuzany Macečkové „**Nucleolar structure and the role of BYSL protein in ribosomopathies**“ se věnuje studiu Diamondovy-Blackfanovy anémie (DBA), která je modelem pro ribozomální onemocnění související s heterozygotní alelickou variací v 1 z 20 ribozomálních proteinových genů ribozomální podjednotky. Navzdory významnému pokroku v definování molekulárního základu DBA a zvýšenému porozumění patofyziologie DBA je mechanismus, kterým tato porucha vede ke specifickému fenotypu nejasný. Stejně nejasný je i důvod, proč jsou glukokortikosteroidy (GC) účinnou terapií DBA. Zatímco přibližně 80 % pacientů reaguje na počáteční léčbu GC, přesný mechanismus, kterým vykazují pozitivní klinický účinek, stále není dobře znám.

Ve svém publikovaném přehledu autorka diskutuje o účinku GC na erytropoézu a shrnuje dopad GC na klíčové dráhy deregulované u DBA. Ve svém závěru konstatuje, že GC neregulují erytropoézu DBA prostřednictvím jediného mechanismu, ale prostřednictvím několika vzájemně závislých drah. Jsou zapotřebí další studie, aby se zjistila úloha výše uvedených drah závislých na GC v regulaci a patologii DBA, s konečným cílem vyvinout nové, účinnější a méně toxickou terapii pro děti trpící tímto onemocněním.

Druhým cílem disertační práce bylo studium patogenity nové mutace RPS7 p.V134F, která byla popsána již dříve u jedné pacientky a dvou asymptomatických rodinných příslušníků, u kterých byla detekována mírná anémie a zvýšená aktivita e-ADA. Autorka potvrdila, že právě změněný metabolismus erytrocytů a oxidační stres, který negativně ovlivňuje životnost erytrocytů, odlišuje pacientku od jejích asymptomatických („silentních“) rodinných příslušníků. Patogenita mutace RPS7 p.V134F byla laboratorně ověřena včetně molekulárních defektů v translační aktivitě proteinu a aktivaci ribozomálního stresu v buněčném modelu této varianty. Pokrok v molekulární diagnostice tak umožňuje diagnostiku DBA u více pacientů s neobvyklým klinickým obrazem.



V třetí experimentální části dizertace, Mgr. Z. Macečková se zaměřila na roli jadérka v buňce. Prozkoumala jeho strukturu, indukci jaderného stresu a ribozomální poruchy, o nichž je známo, že ovlivňují strukturu a funkci jadérka. Zhodnotila vliv oxaliplatiny (L-OHP) a mutace V134F RPS7 na strukturu jadérka. Odhalila, že obě podmínky ovlivňují strukturu, produkci nebo zpracování rRNA a biogeneze ribosomů. Dále prokázala, že vrozená varianta V134F v genu RPS7 ovlivňuje zpracování prekurzorů 18S rRNA. Ačkoli je role RPS7 v biogenezi ribosomů dobře prokázána, zajímalo ji, zda změna pouze v jedné aminokyselině může vést k významným změnám ve struktuře jadérek. Výsledky, které byly dosaženy, tuto hypotézu skutečně podporují. *In situ* hybridizace rRNA je navíc levná, rychlá a nese méně kritických bodů než standardně používané Northern bloty a lze ji snadno použít pro diagnostiku ribozomálních poruch.

Posledním cílem disertační práce byla sekvenace celého exomu (WES) pacienta s delecí jediné RPL11 alely a objev zajímavé mutaci nonsense struktury **jadéřkového proteinu BYSL**. Následné studie odhalily, že mutovaný BYSL normalizuje aktivitu c-Myc deregulovanou RPL11. Ještě zajímavější je, že GCs byly použity k léčbě mnoha nádorových onemocnění, z nichž mnohé jsou řízeny c-Myc. Ačkoli některé poznatky naznačují, že GCs mohou regulovat hladiny mRNA c-Myc u leukémií, v této práci autorka se svými kolegy navrhuje, že GCs mohou také regulovat hladiny proteinu c-Myc prostřednictvím interakce BYSL s GCs. V této studii prozkoumala BYSL jako potenciální **nový slibný cíl pro DBA a c-Myc řízené nádory** širokou škálou experimentálních technik. Kromě identifikace proteinu c-Myc jako přímého partnera BYSL také identifikovala a experimentálně potvrdila vazbu **dexamethasonu** (lék na DBA) na **BYSL**, čímž bylo zabráněno interakci BYSL-c-Myc co umožnilo degradaci proteinu c-Myc prostřednictvím mechanismů nezávislých na ubiquitinu. Bystin byl tak **poprvé identifikován** jako nemoc modifikující gen na c-Myc závislé patologické stavy a potenciální cíl pro nové terapie vyhýbající se vedlejším účinkům GCs.

Struktura předložené práce je zpracována na 99 stranách. Samotná práce obsahuje teoretickou část zaměřenou na strukturu jadérka, ribozomálního stresu, ribozomálních proteinů a jejich aberací v molekulární patologii Diamondovy-Blackfanovy anémie. V diskuzi jsou komentovány a shrnuty výsledky vybraných prací, ve kterých je dizertant jednou první autorkou a ve dvou případech spoluautorkou. Práce byly publikovány v prestižních zahraničních časopisech s IF a prošly přísnou odbornou recenzí odborných recenzentů. Výsledky vědecké práce byly rovněž prezentovány na konferencích formou přednášek či plakátových sdělení. Téma disertační práce je aktuální a výsledky jsou velmi zajímavé pro hematologickou, pediatriickou, ale i onkologickou veřejnost. Celkově hodnotím práci jako velmi kvalitní, svědčící nejen o dlouhodobé práci autorky v oblasti cytogenetických a molekulárně-genetických změn pacientů s DBA, ale i o velmi dobré znalosti problematiky. Její výsledky jasně prokazují schopnosti samostatné vědecké práce. O kvalitě práce svědčí i přijetí 3 článků do časopisů s IF a spolupráce na přípravě dalšího.



Lékařská fakulta
Univerzity Palackého
v Olomouci

Na základě výše uvedených skutečností doporučuji, aby byla práce přijata k obhajobě a na základě úspěšné obhajoby udělen akademický titul PhD dle §47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

Dotazy k diskuzi:

1) Z veřejně dostupné databáze je známo, že hladiny mRNA bystinu jsou relativně nízké v normálních lidských tkáních, na rozdíl od jeho vysoké exprese v různých nádorových buňkách. Lze léčebně využít Vámi popsanou specifickou vazbu dexamethasonu na BYSL u některých nádorových onemocnění?

2) Zkoušeli jste místo specifické vazby dexamethasonu na BYSL i podobnou vazbu jiných derivátů kortikosteroidů (prednison, metylprednisolon)?

3) Můžeme v budoucnu popsanou vzájemnou kompetici vazby M-myc a dexamethasonu na BYSL využít ke snížení vyšší incidence nádorových onemocnění u dětských pacientů s DBA?

V Olomouci dne 4. října 2022

Prof. MUDr. Vladimír Mihál, CSc.

Prof. MUDr. Vladimír MIHÁL, CSc., Dětská klinika
Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
tř. Svobody 8 | 771 26 Olomouc | T: 585 854401
vladimir.mihali@upol.cz | www.lf.upol.cz