

Téza doktorského projektu pre štátnu záverečnú skúšku

Názov dizertačnej práce: Úloha duálne špecifických fosfatáz v kardiomyogeneze

Meno: Mgr. Stanislava Sladeček

Ročník: 6

Vedúci: Mgr. Jiří Pacherník Ph.D.

Predpokladaný dátum ukončenia a obhajoby disertačnej práce: leto 2021

Rodina duálne špecifických fosfatáz (DUSP) je pomerne veľkou fosfatázovou rodinou, ktorá sa vyznačuje schopnosťou odstrániť fosfátovú skupiny z tyrozinových, serínových a treoninových aminokyselinových zvyškov na jednom proteíne. V bunkovej signalizácii má významnú rolu, lebo veľká časť DUSP-ov defosforyluje rodinu proteín kináz aktivovaných mitogénami (MAPK). MAPK signálna dráha je jednou z veľmi významných signálnych dráh, ktorá sa účastní celej rady procesov a často býva skúmaná pri rôznych ochoreniach, vrátane nádorových ochorení a vývojových defektov. Vzhľadom, k tomu, že MAPK signálna dráha má významnú úlohu pri kardiomyogeneze a DUSP-y sa do tejto dráhy zapojujú, defosforylujú a tým ju inaktivujú, mojou úlohou je preskúmať, aký význam zohrávajú pri diferenciácii myších kmeňových buniek.

Keďže rodina DUSP-ov počíta cez 20 členov, prvým krokom bol výber niekoľkých fosfatáz, ktorým sme sa ďalej experimentálne venovali. Tie boli vybrané na základe dostupnej literatúry, toho či sme boli schopní pozorovať u nich nejaké zmeny po aplikácii stresu alebo rastových faktorov a nakoniec na základe fylogenetickej analýzy. Takto boli vybrané fosfatázy DUSP6, DUSP7 a DUSP9. Následne boli pomocou metódy CRISPR/Cas9 vytvorené bunkové línie myších embryonálnych kmeňových buniek, ktoré neexprimovali tieto jednotlivé fosfatázy a línie, ktoré neexprimovali *Dusp6* a *Dusp9* zároveň. Líniu, ktorá by neexprimovala *Dusp7* v kombinácii s inou fosfatázou sa nám doteraz touto metódou nepodarilo vytvoriť, čo môže nasvedčovať že bunky s takouto modifikáciou nie sú viabilné.

Keďže ide o myšie embryonálne kmeňové bunky, podstatné bolo zistiť či si zachovali po zásahu do genómu svoje základné vlastnosti a schopnosť diferencovať. Pozerali sme sa teda na schopnosť línie proliferovať, zachovanie markerov pluripotencie a jej schopnosť tvoriť embryonálne telieska. Následne sme sa pozreli aký efekt malo vypnutie génov pre tieto fosfatázy na kinázy, ktoré by mali defosforylovať, či už v nestimulovanej forme, alebo po vystavení buniek nejakému stimulansu akým je hypoxia. Keďže sme nepozorovali výrazné rozdiely medzi jednotlivými líniami vzhľadom ku kontrolným bunkám, pristúpili sme k ďalšej fázy experimentov a to k sledovaniu efektu na diferenciáciu.

Z predošlých experimentov, sme vedeli, že aktivácia MAPK signálnej dráha má pozitívny efekt na diferenciáciu buniek do kardiomyocytov. Získané bunkové línie sme diferencovali v podmienkach *in vitro* a sledovali sme aké sú zmeny v expresii markerov pre jednotlivé zárodočné listy v časných fázach diferenciácie alebo markerov pre rozličné typy buniek v neskorších fázach, pričom sme sa predovšetkým zamerali na markery označujúce kardiomyocyty. Pomocou metód RT-PCR, western blotting a imunohistochemických metód sme u línií bez expresie *Dusp6* pozorovali veľmi malé zmeny v počte kardiomyocytov, kým pri nedostatku proteínu DUSP7 a DUSP9 bol počet kardiomyocytov v porovnaní s kontrolnou líniou v priemere menší a línie preferenčne diferencovali do ektodermu, prípadne pozdejšie mali zvýšené markery pre neurálne typy buniek.

Celkovo sa nám podarilo získať niekoľko bunkových línií ktoré neexprimujú *Dusp6*, *Dusp7*, *Dusp9* alebo zároveň *Dusp6* a *Dusp9*. Tieto bunkové línie sa od kontrolnej línie významne nelíšili vo svojich základných fyziologických a biochemických vlastnostiach, ale pri diferenciácii v podmienkach *in vitro* preferovali ektoderm pred mezodermom.