

## Abstrakt

Angelmanův syndrom (AS) je neurovývojové onemocnění s celosvětovou incidencí 1:10 000, vyskytuje se tedy u 40 000 porodů ročně, poměr mezi pohlavími je stejný. Mezi klíčové charakteristiky onemocnění patří ataktická chůze s třesem, těžká mentální retardace, těžké poruchy řeči a záchvaty. U postižených jedinců se také vyskytují behaviorální deficity, jako je zvýšená úzkost a poruchy autistického spektra. Onemocnění pochází z imprintované oblasti 15q11.2-13q, kde jsou geny exprimovány buď maternálně, nebo paternálně jako výsledek exprese alel specifické pro rodiče. Existují čtyři hlavní genetické mutace způsobující AS, a to i) velká delece v rozsahu 4-6 Mb na alele zděděné maternálně včetně imprintovaných a bialelicky exprimovaných genů, ii) delece maternálního původu v genu Ubiquitin ligázy E3 (*UBE3A*), iii) paternální uniparentální disomie a iv) defekt imprintingu vedoucí k nevhodné metylaci lokusu. Dosud neexistuje žádný lék na AS, spíše se symptomy zmírňují pomocí multidisciplinárního přístupu. Cílem doktorského studia bylo dále dešifrovat roli *UBE3A* a *GABRA5* pomocí dvou myších modelů s cílem získat více znalostí o zapojení těchto dvou genů do generování modelů pro budoucí terapeutické intervence.

Jedním vytvořeným modelem byla úplná genová delece *Ube3a* z 5'UTR do 3'UTR zahrnující přibližně 76 Kb s vyloučením všech kódujících a nekódujících prvků. Ačkoli je k dispozici mnoho myších modelů zaměřujících se na gen *Ube3a* různými způsoby, neexistuje žádný model s chybějícím celým genem, který by nabízel větší genetickou podobnost se situací pacientů, protože většina z nich má velkou delecii. Také byla zjištěna velká variabilita fenotypů v jiných AS modelech v závislosti na experimentátorovi, kmeni a věku zvířat, což jasně představuje bariéru pro vývoj terapeutik. Abychom posoudili vhodnost modelu pro výzkum AS, podrobili jsme jej sérii testů zaměřených zejména na patologii AS, včetně hodnocení motorických dovedností a behaviorálních paradigmat. Zjistili jsme, že nový model AS opakoval deficity motorických dovedností pozorované v testech DigiGait a rotarod. Kromě toho byly potvrzeny odchylky chování při stavbě hnízda a testu zavěšení ocasu, na jejichž základě jsme výkonnost modelu vyhodnotili jako nedostatečnou. Model však nevykazoval nedostatečnou výkonnost v testech závislých na paměti, jako je Barnesovo bludiště a nové rozpoznávání objektů. Když však byly podrobeny obtížnější úloze obrácení místa v nastavení IntelliCage, ukázalo se, že výkon skutečně nepodávaly. Pozorovali jsme také rozdíly v aktivitě cirkadiálního rytmu a hypoaktivitě. Získané výsledky se dobře shodují s

fenotypy uváděnými v jiných AS modelech a námi provedené testy neposkytly žádnou jasnou výhodu z hlediska studia AS. Mělo by však být provedeno více testů zaměřených na fenotypy, jako jsou poruchy autistického spektra, elektrofyziologie a EEG, které mohou být základem pro budoucí publikace.

Dále jsme se zaměřili na gen receptoru alfa 5 kyseliny gama-aminomáselné (*Gabra5*). Tento gen je často deletován na mateřské alele u pacientů s velkou delecí. Shluk subreceptorových genů beta 3, gama 3 a samozřejmě alfa 5 kyseliny gama-aminomáselné (GABA) je považován za důležitého přispěvatele k elektrofyziologickým fenotypům, ale je také spojován s panickou poruchou a úzkostí, fenotypy konzistentními u pacientů s AS. Rozhodli jsme se studovat chování podobné úzkosti u myši s deficitem *Gabra5* pomocí behaviorálních testů, ale také hodnocením hladin kortikosteronu, protože dysregulace osy hypotalamus – hypofýza – nadledviny (HPA) byla spojena s úzkostnými poruchami. Kromě toho je osa HPA pod GABAergní regulací, exprese subreceptorů a jejich příspěvek k regulaci osy HPA však stále nejsou objasněny, což představuje mezeru ve znalostech. Zjistili jsme, že myši *Gabra5*<sup>-/-</sup> měly nižší hladiny kortikosteronu, což bylo poměrně překvapivé, protože bylo popsáno, že dezinhibice GABAergické signalizace vede ke zvýšené excitabilitě. Navíc se myši *Gabra5*<sup>-/-</sup> nezdály úzkostnější v testech v otevřeném poli a ve vyvýšeném křížovém bludišti. Současně „rearing behaviour“ byla snížena, což naznačuje nižší úroveň prožívané úzkosti. Nakonec jsme provedli funkční analýzu hipokampálních řezů, oblasti mozku, o které je známo, že přispívá k regulaci úzkosti. Experimenty pakt-clamp odhalily, že neurony odvozené z *Gabra5*<sup>-/-</sup> byly hyperpolarizovány v několika testovaných parametrech. Na základě toho se domníváme, že k vysvětlení našich pozorování musí existovat funkční kompenzace pravděpodobně vápníkových nebo chloridových kanálů. Přestože jsme nebyli schopni přiřadit fenotypy alfa 5 kanálu, mohli jsme jasně ukázat důležitost zkoumání funkční kompenzace v konstitutivních modelech.

Nakonec jsme provedli několik analýz genové exprese detekující expresi genů patřících do lokusu AS pomocí RT-qPCR. Vytvořili jsme dvě knock-out buněčné linie pomocí CRISPR/Cas9 cílení, což vedlo k *Ube3a* deficientní linii a další linii s vyřazeným domnělým enhancerem sídlícím v intronu 4-5 uvedeného genu.

Hodnotili jsme expresi genů v buněčné linii teratokarcinomu P19 jak v jejím pluripotentním stavu, tak diferencované na neurony. Zjistili jsme signifikantní pokles u všech paternálně exprimovaných

genů. V záchranných experimentech s nadměrnou expresí UBE3A chyběla obnova genové exprese. Přistoupili jsme ke stejnému hodnocení, ale v linii s vyřazeným domnělým enhancerem, a zjistili jsme, že se pozorování provedená v knock-out buňkách *Ube3a* shodují. Výsledky RT-qPCR generovaly experimentální data ukazující na možnou funkci enhanceru, jsou však zapotřebí další testy a případně testy prováděné v myším organismu.