

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Role genetických příčin neurovývojových poruch (NP)
v kognitivní (dys)funkci**

Diplomová práce

Bc. Alžběta Hejlková

Školitelka: Mgr. Michaela Fencková, Ph.D.

České Budějovice 2024

Hejlková, A., 2024: Role genetických příčin neurovývojových poruch (NP) v kognitivní (dys)funkci. [The role of genetic causes of neurodevelopmental disorders (ND) in cognitive (dys)function. Mgr. Thesis, in Czech] – 70 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Tato práce se zaměřuje na nové geny spojené s neurovývojovými poruchami, konkrétně s poruchami autistického spektra (PAS) a intelektu (PI). Studie zkoumá role genů *XPO1* a *USP34* a jejich vliv na habituaci, jednoduchou formu učení, jejíž deficit je spojen s PAS a PI. Manipulace s jejich expresí v nervové tkáni má za cíl ověřit, zda jsou tyto geny důležité pro kognitivní funkci. Dále se práce pokouší zjistit, zda geny, jejichž mutace zapříčiňují PAS/PI se zvýšeným výskytem obezity a s ní spojených imunitních problémů mohou ovlivnit kognitivní funkci v habituaci, pokud jsou manipulované pouze v imunitní tkáni, tedy mimo tkáň nervovou.

Annotation

This paper focuses on novel genes associated with neurodevelopmental disorders, specifically autism spectrum disorders (ASD) and intellectual disability (ID). The study examines the roles of the *XPO1* and *USP34* genes in habituation, a simple form of learning that is relevant for cognitive dysfunction in ASD and ID. Manipulation of their expression in neural tissue aims to test whether the genes are required for cognitive function. Furthermore, the work attempts to determine, if genes that are associated with high prevalence of obesity and associated immune problems in ID/ASD individuals, can affect cognitive function in habituation when manipulated in immune tissue, outside the nervous system.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval(a) pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

České Budějovice, 12.4.2024

.....

Bc. Alžběta Hejlková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce Mgr. Michaele Fenckové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, ochotu a čas, který mi věnovala během vedení a zpracování této diplomové práce. Zároveň bych chtěla velice poděkovat Mgr. Pavle Nedbalové za ochotu a pomoc při praktické práci v laboratoři. Mé poděkování patří také dalším členům laboratoře a také celé skupině laboratoře doc. Mgr. Tomáše Doležala, Ph.D. za cenné rady a ochotu s čímkoliv pomoci. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za podporu během studia a prarodičům za pravidelné kontroly a povzbuzení během sepisování diplomové práce.

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá geny spojenými s neurovývojovými poruchami (NP), konkrétně poruchami autistického spektra (PAS) a intelektu (PI). U těchto poruch je doprovázejícím fenoménem deficit v habituálním učení, nejjednodušším kognitivním procesu. Tato základní forma učení je zásadní pro správné fungování jedince v prostředí ve smyslu vnímání a vyhodnocování informací. Pokud je habituace porušena, jedinec není schopen odfiltrovat nepotřebné informace, což může vést až k přetížení organismu a neschopnosti soustředit se na zásadní činnosti.

Práce si klade za cíl potvrdit či vyvrátit roli v habituaci dvou kandidátních genů *XPO1* a *USP34*, jejichž mutace se vyskytují u jedinců s PI. Expresie příslušných drozofilích ortologů byla snížena pomocí RNAi v nervové tkáni. Takto upravené drozofily byly testovány v „light-off jump habituaci“, kde opakování stimulu (light-off = zhasnutí světla) vede ke snížení skokové reakce. Efektivita manipulace RNAi byla molekulárně ověřena pomocí qPCR. U obou genů byl potvrzen defekt v habituaci po manipulaci a byla potvrzena jejich významná role v kognitivní funkci.

U jedinců s PAS a PI se objevují doprovodné sekundární patologie, včetně obezity a s ní spojené aktivace imunitního systému. To vědci považují za významné faktory přispívající ke kognitivní dysfunkci. Přesto zůstává nejasné, jakým způsobem k tomu dochází. Dalším cílem bylo tedy zjistit, zda ortology vybraných genů, které jsou spojené s obezitou a imunitní dysfunkcí u jedinců s PI/PAS, mohou ovlivnit habituaci, pokud s jejich expresí manipulujeme pouze v imunitní tkáni. Nejprve byla připravená vhodná drozofilí linie pro manipulaci těchto genů. Tato linie byla úspěšně vytvořena a otestována, avšak došlo k její kontaminaci v inkubátoru. Z důvodu časové náročnosti a navázání na další experimenty byla použita jiná linie. Poskytnutá linie byla zkřížena s RNAi liniemi proti vybraným genům, avšak efekt jejich manipulace na habituaci se z důvodu špatných reakcí na light-off stimuly nepodařilo ověřit.

Seznam zkratek

ADHD – „attention deficit hyperactivity disorder“, porucha pozornosti s hyperaktivitou

BDSC – Bloomington Drosophila Stock Center

DGRC-Kyoto – Drosophila Genetic Resource Center, Kyoto

Elav – embryonální letální abnormální vize

ER – endoplazmatické retikulum

GABA – „Gamma-Aminobutyric Acid“, kyselina gama-aminomáselná

GAD – „glutamic acid decarboxylase“, glutamát dekarboxyláza

Gal4 – transkripční faktor

GD – P-Element RNAi knihovna

GFP – „green fluorescent protein“, zelený fluoreskující protein

GMR – Glass Multiple Reporter

Hml – hemolektin

IQ – inteligenční kvocient

KK – phiC31 RNAi knihovna

mCherry – červený fluoreskující protein

mRNA – messenger RNA

MSD – „mean square difference“, střední kvadratická odchylka

NIG-Fly – National Institute of Genetics – Fly Stock Center

ORF – „open reading frame“, otevřený čtecí rámeček

PAS – poruchy autistického spektra

PI – poruchy intelektu

piRNA – piwi-interacting RNA

p-value – „probability value“, hodnota pravděpodobnosti

qPCR – „quantitative polymerase chain reaction“, kvantitativní polymerázová řetězová reakce

Ras/MAPK – „Ras/mitogen-activated protein kinase“

RISC – „RNA-induced silencing complex“

RNA – ribonukleová kyselina

RNAi – RNA interference

RP49 – ribosomální protein 49

SEM – „standard error of the mean“, standardní chyba průměru

siRNA – „small interfering RNA“

TriP – Drosophila Transgenic RNAi Project

TTC – „trials to criterion“

UAS – „upstream activation sequence“

VDRC – Vienna Drosophila Resource Center

Obsah

1	Úvod	1
1.1	Kognitivní funkce	1
1.1.1	Habituace	1
1.1.1.1	Mechanismus habituace	1
1.2	Neurovývojové poruchy	3
1.2.1	Poruchy autistického spektra a intelektu	3
1.2.2	PI, PAS a habituace.....	5
1.2.3	Problémy s imunitou a obezitou u pacientů s PAS a PI.....	5
1.3	<i>Drosophila melanogaster</i>	6
1.3.1	Životní cyklus	7
1.3.2	Genetické nástroje pro práci s drozofilou.....	7
1.3.3	Drozofila a kognitivní funkce.....	11
2	Cíle	13
3	Materiál a metody	14
3.1	Drozofilí linie a péče o ně.....	14
3.2	Křížení linií.....	16
3.2.1	Křížení pro manipulaci s expresí genů <i>emb</i> a <i>puf</i> , ortologů <i>XPO1</i> a <i>USP34</i>	16
3.2.2	Vykřížení linie pro manipulaci s genovou expresí v imunitních buňkách..	18
3.3	Manipulace exprese vybraných genů v imunitní tkáni	19
3.4	Měření habituace – systém Zantiks	22
3.4.1	Vyhodnocení výsledků měření	24
3.5	Izolace RNA z larev.....	25
3.6	Reverzní transkripce	26
3.7	qPCR.....	26
4	Výsledky	29

4.1	<i>Embargoed – XPO1</i>	29
4.1.1	Měření habituace v nervové tkáni	29
4.1.2	Ověření efektivity manipulací – qPCR.....	33
4.2	<i>Puffeye – USP34</i>	35
4.2.1	Měření habituace v nervové tkáni	35
4.2.2	Ověření efektivity manipulací – qPCR.....	41
4.3	Manipulace a test habituace genů exprimovaných v imunitní tkáni	43
5	Diskuse	50
6	Závěr	57
7	Seznam literatury	58
8	Přílohy	66

1 Úvod

1.1 Kognitivní funkce

Kognitivní funkce jsou základní součástí lidské psychiky. Tyto funkce umožňují jedinci vnímat okolí, ve kterém se vyskytuje a díky nim dokáže řešit a reagovat na situace, které mu stále měnící se prostředí přináší. Centra kognitivních funkcí jsou uložena v mozku a starají se o procesy spojené s učením, řečí, pozorností, mluvením nebo pochopením a přizpůsobením se situaci.

1.1.1 Habituace

Habituace je základní formou učení, která vzniká již před narozením (Leader et al., 1982; Morokuma et al., 2004). Jde o nejjednodušší kognitivní proces, při němž dochází k snížení citlivosti na stále se opakující a nedůležité podněty. Projevuje se snížením reakce. V případě habituace se nejedná o únavu organismu nebo adaptaci smyslových receptorů. Jde o snížení aktivity příslušných neuronální drah, na základě jejich opakované stimulace. To vede k adaptaci behaviorální odpovědi (Rankin et al., 2009).

Tento kognitivní proces je významný pro správné fungování jedince v prostředí. Díky habituaci je jedinec schopný odfiltrovat nepodstatné informace nebo ty informace, jež organismus vyhodnotí jako nepotřebné pro přežití. Umožní nám soustředit se na informace podstatné pro právě probíhající situaci a nedojde díky ní k přetížení organismu velkým počtem podnětů. Příkladem může být tikot hodin, který přestaneme po chvíli strávené v místnosti vnímat. Další modelovou situací může být vnímání hluku z rušné ulice. Pokud se nacházíme teprve krátce v budově, která je blízko silnice, vnímáme každé auto, které projede kolem. Za pár minut jsme ale už schopni si na tuto zvukovou kulisu zvyknout a odfiltrovat ji. To nám umožňuje soustředit se například na čtení knížky nebo na práci.

1.1.1.1 Mechanismus habituace

Proces habituace je konzervovaným mechanismem (Schmid et al., 2010). První výzkumy položily základy pro pochopení tohoto mechanismu tím, že zvýraznily důležitost zapojení neuronálních drah, které se stávají méně citlivé na opakovaný podnět. Při hledání odpovědi na otázku, jakým způsobem funguje tento proces konkrétně, došli vědci k závěru, že nejde pouze o jeden obecně platný mechanismus (Schmid et al., 2015) a že molekul, které habituaci řídí, je celá řada (McDiarmid et al., 2019).

Prvním mechanismem, který byl popsán jako buněčný mechanismus pro krátkodobou habituaci byla homosynaptická deprese (Christoffersen, 1997). Projevem homosynaptické deprese je snížení množství uvolňovaného mediátoru během rychle za sebou jdoucích akčních potenciálů. Homosynaptická deprese, zkoumaná na měkkýši *Aplysia*, jako mechanismu habituace byla zpochybňována z důvodu nemožnosti zahrnout ji v dlouhotrvající habituaci a také kvůli koexistenci dalších mechanismů u krátkodobé habituace (Bristol & Carew, 2005; Fischer & Carew, 1993).

Ramaswami (2014) ve své práci popisuje podstatu jiného mechanismu, a to konceptu negativního obrazu neboli inhibiční potenciace. Ten vysvětluje, že schopnost organismu ignorovat podněty, které jsou jim známé a nepodstatné vychází ze schopnosti mozku vytvořit inhibiční vzor k excitačnímu podnětu, a to inhibicí na aktivních excitačních neuronech. Vytvořením inhibičního neboli negativního obrazu k známým podnětům umožní organismu přivyknout si a nereagovat na ně. Významnost tohoto mechanismu podporuje fakt, že je přítomen u různých druhů organismů i typů habituace (Ramaswami, 2014).

Blok a kol. (2022) se pokusili identifikovat molekulární dráhy, které se habituace účastní na základě současných genetických poznatků. V literatuře našli 278 genů, které prokazatelně vedou k deficitu v habituaci, ať už jde o ztrátu jejich funkce („loss of function“) nebo o aktivaci či posílení funkce („gain of function“), napříč různými organismy. Z těchto genů pak odvodili mechanismy, které ovlivňují proces habituace. Patří mezi ně centrální buněčné signální kaskády PI3K-AKT-mTOR, Ras-MAPK a cAMP-PKA, mechanismy neuronální plasticity a excitability a kontrola translace proteinů.

PI3K-AKT-mTOR je jedna z klíčových signálních kaskád v buňce. Komponenty této signální dráhy jsou lokalizované v jádru a regulují mnoho jaderných procesů, jako je replikace, transkripce a oprava DNA, stavba chromatinu nebo řízení buněčného cyklu (Gupta et al., 2022). Ras-MAPK kaskáda je zapojena v regulaci buněčné proliferace, diferenciaci či apoptóze a hraje roli v genové expresi a odpovědi na stres. Tato dráha je mezi eukaryoty vysoce zakonzervovaná a je terapeutickým cílem pro léčbu rakoviny (Tan, 1997). V „light-off jump“ habituaci drozofily (*Drosophily melanogaster*) má tato dráha protichůdné účinky podle typu neuronů, v kterých dochází k její manipulaci. Deficit v habituaci může být způsoben jak zvýšením Ras-MAPK aktivity v inhibičních, GABAergních neuronech, tak snížením Ras-MAPK aktivity v excitačních, cholinergních

neuronech (Fenckova et al., 2019). Ras-MAPK i PI3K-AKT-mTOR se účastní neuronálního vývoje a synaptické plasticity (Blok et al., 2022). Výzkumy ukázaly spojitost mezi mutacemi v PI3K-AKT-mTOR, Ras-MAPK, cAMP-PAK signálních drahách a poruchami autistického spektra a intelektu (Borrie et al., 2017; Chen et al., 2014; Sharma & Mehan, 2021; Thomas et al., 2023).

Kontrola translace a synaptická plasticita jsou dalšími mechanismy, které ve své studii Blok a kol. (2022) zmiňují jako mechanismy habituace. Pro synaptickou plasticitu signální dráhy regulují presynaptické uvolňování neurotransmiterů, recyklaci synaptických váčků a funkci postsynaptických receptorů.

Habituace je označována jako nejjednodušší kognitivní proces, avšak závisí na celé řadě mechanismů, které jsou důležité pro přežití jedince, ale i pro paměť a vyšší formy učení (McDiarmid et al., 2019). Pochopení principů řízení habituace může vést k potencionální léčbě jejích deficitů u jedinců s neurovývojovými poruchami (NP).

1.2 Neurovývojové poruchy

Neurovývojové poruchy (NP) postihují vývoj a funkci mozku a nervového systému. Jejich podstatou je široká škála genetických a klinických příčin, které znemožňují kognitivní, motorický a emoční vývoj jedince. Mezi takové poruchy řadíme poruchu pozornosti a hyperaktivitu (ADHD), poruchu autistického spektra (PAS), poruchu učení, poruchu intelektu (PI), poruchy chování, zraku a sluchu, dětskou mozkovou obrnu či epilepsii (Cobb & Davies 2013, Niemi et al., 2018). Pacienti s NP mohou trpět potížemi s motorikou, řečí, chováním, pamětí nebo učením. Nejčastěji diagnostikované NP jsou poruchy učení u 8 % diagnostikovaných, následovanými poruchami řeči u 7 % lidské populace. ADHD se vyskytuje s frekvencí 2 %, PAS s frekvencí 1-2 % a PI postihuje 0,9 – 3,7 % celosvětové populace (Frueh et al., 2021). Takto široké procentuální rozpětí v diagnostice PI je dáno více faktory včetně komorbidních onemocnění jako je dětská mozková obrna, epilepsie a PAS. Dále je ovlivněno změnami v postupech diagnostiky, ale je také dáno inbreedingem, reprodukcí mezi příbuznými jedinci. Ten je v některých regionech častější než v jiných a zvyšuje riziko především recesivně dědičných PI (Kahrizi et al., 2019; López-Pisón et al., 2014; McKenzie et al., 2016).

1.2.1 Poruchy autistického spektra a intelektu

Poruchy autistického spektra (PAS) jsou souhrnným názvem pro NP, které vedou k deficitům v komunikaci a sociální sféře. Vyznačují se přítomností omezených zájmů a

repetitivním chováním (Hodges et al., 2020). PAS se pojí s širokou škálou fenotypových variant, avšak pojícím znakem u většiny těchto pacientů je porucha sensorického zpracování, které vede k přehnanému nebo naopak nedostatečnému reagování na podněty přispívající k široké škále behaviorálních deficitů (Sinclair et al., 2017).

Poruchy intelektu (PI) neboli mentální postižení jsou charakteristické poruchami adaptivních funkcí a učení (Simonoff, 2018). Jako hraniční hodnota pro diagnostiku se uvádí IQ <70. Kolem 70-75 % pacientů trpících PAS se vyznačuje i PI (Lecavalier et al., 2011). Jedinci trpící závažnější formou PI mají zvýšenou pravděpodobnost výskytu PAS. Jedinci, u kterých se PI vyskytuje společně s PAS mají závažnější obtíže se sociálním a adaptivním chováním oproti jedincům diagnostikovaným pouze s PAS (Matson & Shoemaker, 2009; Spencer et al., 2006, Etyemez et al., 2022).

Diagnostika a léčba PI a PAS je často velmi komplikovaná a skládá se z komplexního přístupu ve formě odborných terapií a podávání léků, které ale slouží k léčbě sekundárních symptomů nikoli přímo kognitivní dysfunkce. K složitosti léčby přispívá fakt, že jen obtížně lze spojit konkrétní fenotyp s genotypem. Fenotyp je ovlivněn řadou dalších genetických a negenetických faktorů. Genetickou podstatou PI (s anebo bez PAS) jsou chromozomální přestavby, změny počtu kopií větších úseků DNA, bodové mutace, či inserce a delece v jednotlivých genech (Parenti et al., 2020). Průlom v hledání konkrétních genetických příčin nedávno přineslo sekvenování nové generace, pokročilá genetická technologie umožňující rychlé a efektivní čtení DNA. Od jeho zavedení vyšlo množství článků zabývajících se identifikací genů a s nimi spojených monogenních příčin nejrůznějších NP (Stessman et al., 2017, Wang et al., 2021).

Leblond a kol. (2021) ve svém článku uvádějí přehled databází, které identifikují 1586 genů zapříčiňujících PI a PAS. 204 z nich je zahrnuto v databázi SynGO, ve které jsou uvedeny geny účastnící se synaptických činností a s tím pojících se procesů. Jejich exprese je zaznamenána po narození v mozečku a kůře mozku. Mezi mechanismy na synapsích, o které jsou tyto geny obohaceny patří ligandem a napětově ovládaná aktivita iontových kanálů zprostředkovávající presynaptickou regulaci membrány, regulace neurotransmiterových receptorů na postsynaptické membráně, exocytóza nebo regulace synaptických váčků. Avšak pro spojení těchto biologických procesů se symptomy je potřeba více klinického výzkumu.

Parenti a kol. (2020) ve svém článku zmiňují různorodost genetických mutací a jejich dopad na molekulární dráhy. Zdůrazňují důležitost porozumění interakcí mezi

jednotlivými drahami, protože mnoho genů je zapojeno ve více molekulárních procesech najednou. Molekulární dráhy zahrnuté v NP jako je syntéza proteinů, transkripční a epigenetická regulace nebo synaptická signalizace mohou sloužit jako potencionální cíle pro léčbu NP.

1.2.2 PI, PAS a habituace

V řadě neurovývojových poruch jako jsou například PAS, PI, syndrom fragilního X, schizofrenie, ADHD nebo Tourettův syndrom byl potvrzen deficit v habituaci jako jeden z přispívajících mechanismů těchto onemocnění (McDiarmid et al., 2017). Poruchy habituálního učení mohou vést k neschopnosti vyfiltrovat nepotřebné informace, což může mít za následek přetížení organismu. Habituace je důležitá pro normální kognitivní funkci, kam řadíme pozornost a její udržení, učení či paměť, tudíž není překvapivé, že je snižena právě u těchto poruch.

Yehuda a kol. (2010) zjistili, že jedinci s nižším IQ vykazují méně konzistentní vzorce habituace na podnět než jedinci s vyšším IQ. Podle míry habituace kojenců lze navíc předpovídat inteligenci v pozdějším věku (Kavšek, 2004; McCall et al., 1993). Klinický význam habituace dokazuje fakt, že abnormální habituace bývá v kontextu se závažnými symptomy, a to napříč různými NP (Blok et al., 2022; McDiarmid et al., 2017).

Výzkum habituace dává příležitost k pochopení příčin a procesů, které vedou k těmto poruchám. Identifikace genů zapojených do habituace a případně jejího deficitu nabízí prostor pro pochopení molekulárních mechanismů a drah, které řídí kognitivní dysfunkci u NP a pro přesnější diagnózu a léčbu.

1.2.3 Problémy s imunitou a obezitou u pacientů s PAS a PI

U jedinců s PAS a PI se vyskytuje řada doprovodných sekundárních patologií mezi něž mimo jiné patří obezita a s ní spojená aktivace imunitního systému (P. Szachta et al., 2016). Vědci předpokládají vysokou významnost právě těchto dvou doprovodných znaků a jejich komplexní souvislost s PAS a PI. Avšak proč je tak často doprovází, zda, a jakým způsobem by mohli přispívat ke kognitivní dysfunkci není dosud známo.

Výzkumy ukazují vyšší výskyt nadváhy u dětí trpících poruchami autistického spektra než u zdravě se vyvíjejících vrstevníků (Egan et al., 2013, Criado et al., 2018). Důvodem může být více faktorů jako je podávání léků, genetické příčiny, atypické stravovací návyky, poruchy spánku či obtíže se zařazením pravidelné fyzické aktivity (Curtin et al., 2014). Také bylo zjištěno, že někteří jedinci s PAS mají mikrolece na

chromozomech 16 a 11. V těchto oblastech se nacházejí geny spojené se sklonem k obezitě (Shinawi et al., 2011). Obezita je spojena se změnami v imunitní tkáni. Tuková tkáň kromě ukládání energie plní funkci endokrinního orgánu a vylučuje signální molekuly, včetně adipokinů a cytokinů. Adipokiny je označení skupiny cytokinů v tukové tkáni, která má různé vlivy zejména na metabolický a imunitní systém. Může ovlivňovat například hladinu glukózy v krvi nebo regulovat zánětlivé procesy. Cytokiny jsou signální molekuly hrající klíčovou roli v komunikaci a řízení buněk imunitního systému. Při obezitě se zvyšuje produkce prozánětlivých cytokinů, a to může negativně ovlivnit imunitní systém. Obezita tak může vést k ztrátě aktivity a počtu imunitních buněk nebo snížené odpovědi na infekce (Schmidt et al., 2015).

Bylo prokázáno, že jedinci trpící PAS a PI čelí problémům se zvýšeným množstvím protilátek a s imunitou zahrnující změny v imunitních buňkách a imunoglobulinech. Tyto obtíže mohou přispívat k chronickým zánětům a zánětům nervové tkáně (Gładysz et al., 2018; Jyonouchi, 2013). Mohou mít i dopad na chování a kognitivní funkci (Jyonouchi, 2013). U dětí s autismem byly zjištěny specifické autoprotiátky v mozku, které mohou hrát roli v autoimunitních onemocněních. U těchto dětí byla dále diagnostikována nerovnováha cytokinů (Marco et al., 2016), která může zapříčinit neadekvátní odpověď imunitního systému na vnější faktory.

U lidí trpících PAS a PI byly dokázány jak problémy s imunitou a obezitou, tak přítomnost deficitu v habituačním učení. Pochopení mechanismů, jakými dochází u těchto pacientů k takovýmto klinickým příznakům by mohlo být klíčové k jejich eliminaci. A pokud by bylo prokázáno, že mutace v genech souvisejících s obezitou a imunitou hrají roli i v kognitivní dysfunkci, mohlo by napravení tohoto deficitu vést k eliminaci behaviorálních a kognitivních příznaků.

1.3 *Drosophila melanogaster*

Ve své práci se zaměřuji na geny, které jsou důležité pro habituaci, jsou spojeny s imunitní či metabolickou funkcí a jejich mutace způsobují PI nebo PAS. K výzkumu jsem zvolila mezidruhový přístup, s využitím modelového organismu *Drosophila melanogaster*. Přibližně 77 % lidských genů implikovaných v lidských onemocněních má svůj ortologní gen v jejím genomu (Puig & Mattila, 2011).

Drosophila melanogaster (Octomilka obecná, dále jen drozofila) se řadí do čeledi octomilkovití a řádu Diptera (dvoukřídli). Těší se velké oblibě jakožto modelový organismus pro výzkum v oblasti genetiky, fyziologie, evoluční biologie nebo

mikrobiologie. Stala se tak oblíbenou zejména díky svému rychlému generačnímu času, rozmnožování, velkému množství vajíček, snadné manipulaci a nízkým nákladům na její chov.

1.3.1 Životní cyklus

U drozofily můžeme pozorovat pohlavní dimorfismus. Samička naklade až sto vajíček denně. Po vykladení nastává cyklus o čtyřech fázích: embryo, larva, pupa a dospělec. Z vajíček se stávají larvy prvního instaru. Larvy třetího instaru migrují na místo vhodné k zakuklení a přeměňují se na kuklu. Během metamorfózy v kukle zahyne většina buněk larválního stádia a vzniká tělo dospělého z buněk imaginálních terčků a histoblastů. Život dospělého jedince může trvat až 70 dní. Doba životního cyklu závisí na okolní teplotě. Čím vyšší teplota prostředí, tím rychlejší životní cyklus. Například při teplotě 29 °C může trvat pouhých 7 dní, naopak při teplotě 18 °C se tato doba prodlužuje na přibližně 14 dní. K prvnímu rozmnožování dospělců dochází 8-12 hodin po vylíhnutí dospělé samičky.

Genom drozofily je kompletně zmapován. Obsahuje 13 600 genů a byl osekvenován v roce 2000 (Adams et al., 2000). Geny se nachází na čtyřech párech chromozomů. Prvním párem jsou pohlavní chromozomy a ostatní tři páry jsou autozomy. Na chromozomu Y se nachází méně než jedno procento kódující části genomu, a dokonce na čtvrtém páru chromozomů leží méně než jedno procento z celkového genomu. Kvůli tomuto faktu se v genetice příliš nevyužívá a nebývá obvykle zaznačen ani v genotypech jednotlivých linií. Pohlaví je primárně určeno poměrem autozomů k chromozomům X. Tato determinace pohlaví je známá jako X:A systém. Pokud je tento podíl 1:1 (jeden chromozom X a jeden set autozomů) dojde k vývoji jedince v samce, pokud je podíl 2:1 vyvíjí se jedinec jako samice. Sekundárně pohlaví závisí na přítomnosti pohlavních chromozomů X a Y. Přítomnost samotného chromozomu Y není dostatečné pro determinaci pohlaví.

1.3.2 Genetické nástroje pro práci s drozofilou

Mezi nástroje pro práci s drozofilou řadíme balancerové chromozomy. Tyto chromozomy jsou navrhnuté tak, aby nedocházelo k rekombinaci homologních regionů během meiózy. Tato vlastnost je umožněna čtenými inverzemi na chromozomech. Balancerové chromozomy nesou recesivně letální mutace. Nemohou tedy existovat v homozygotním uspořádání. Využívají se k zachování jinak letálních mutací. Aby byly balancery snadno identifikovatelné, nesou často viditelné fenotypové znaky, které se

označují jako markery. Markery jsou dominantními mutacemi a díky nim lze snadno selektovat jedince s danými balancerovými chromozomy. Mezi takové znaky patří například markery pro změnu barvy nebo tvaru očí: white – bílé nebo světle zbarvené oči, drop – oči ve tvaru kapky, markery pro změnu barvy těla: ebony – tmavě hnědé nebo černé tělo nebo markery pro změnu tvaru a velikosti křídel: curly – křídla jsou zahnutá, vestigial – menší velikost křídel. Markerů je veliké množství a jsou užitečné při práci v laboratorních podmínkách.

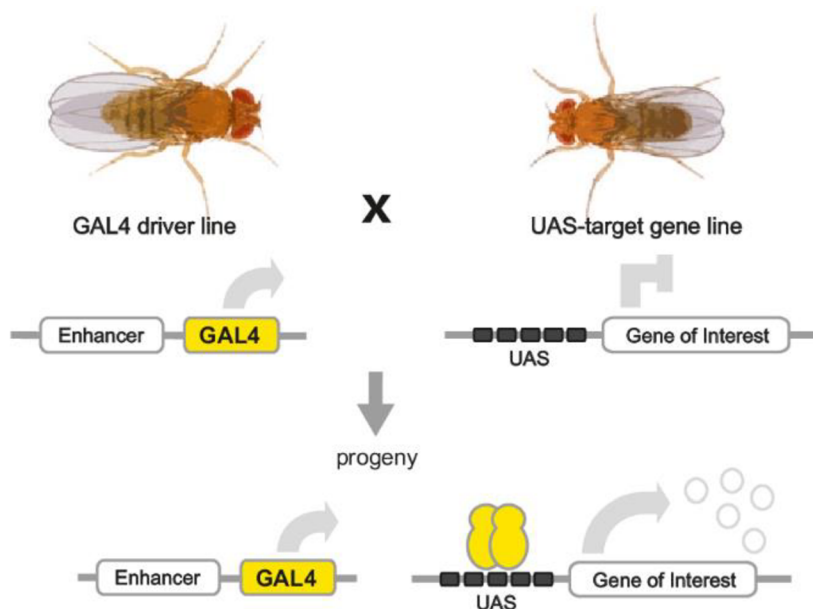
Další důležitou součástí genomu drozofily jsou mobilní elementy, které otvírají další možnosti pro práci s geny. Tyto elementy jsou schopné se v rámci genomu přesouvat. Umožňuje to enzym transponáza. Mechanismem pohybu těchto elementů je takzvaný „cut and paste“. Transponáza rozpozná specifickou sekvenci DNA na koncích transpozonů, jimiž jsou invertované terminální repetice, a stimuluje vystřížení transpozonu z DNA. Celý komplex transpozonu s transponázou se přemístí na jiné místo genomu, které je také rozpoznáno a stříženo transponázou. Dojde k vložení transpozonu do nového místa genomu.

U drozofily jsou nejzásadnějšími transponovatelnými elementy takzvané P elementy, které jsou ~3 kb dlouhé a obsahují čtyři otevřené čtecí rámce (ORF), které kódují enzym transponázu. Jejich objevení popsali D. B. Finnegan, D. L. Hartl a S. J. Kidwell ve svém článku, který vyšel v roce 1980. Enzym transponáza, který je kódovaný vlastní strukturou P elementů, je aktivní hlavně v zárodečných liniích. P elementy zapříčiňují hybridní dysgenezi, která vzniká při zkřížení samců bez P elementů a samic, které mají P elementy přítomné v genomu. Hybridní dysgeneze způsobuje sterilitu a zvýšenou frekvenci vzniku mutací (Simmons, 2013). K obraně proti P elementům si drozofila vyvinula mechanismus založený na přítomnosti „piwi“ genu. Malé RNA zvané piRNA slouží k navádění piwi proteinu ke komplementární sekvenci v transpozonu, kde dojde k jeho umlčení. PiRNA figurují v ochraně genomu v zárodečné linii před nežádoucí aktivitou transpozonů.

Do genomu drozofil lze vnášet geny, to znamená, že ji lze geneticky transformovat. Přenos genů, jak vlastních, tak cizích druhů organismů do genomu umožňují mimo jiné transpozony, jimiž jsou právě P elementy. Z P elementu je odstraněn gen pro transponázu, díky čemuž se P element není schopný začlenit do genomu nebo přesunout na jiné místo. Odstranění transponázy je za účelem zabránění nekontrolovatelného pohybu P elementu v genomu. K zavedení P elementu do genomu

drozofily dochází pomocí injikace ve stádiu embrya, kdy jsou zavedeny dvě kruhové molekuly DNA: syntetický P element bez transponázy, který nese daný gen a marker a DNA pro helper plazmid, který nese transponázu pro aktivaci P elementu. Důležité je, aby se P element zabudoval do jaderné DNA a stal se součástí zárodečné linie. Výsledkem je přítomnost P elementu se sledovaným genem v potomcích transformované drozofily, který lze sledovat pomocí markeru. P elementy se používají pro genetickou manipulaci, jako je vytváření mutací, inzercí nebo cílené aktivaci genů.

Dalším systémem používaným pro regulaci exprese genů, který je založený na využití P-elementů, je systém *UAS-GAL4* (**Obr. 1**). Tento systém byl převzat z genetiky kvasinek a umožňuje manipulaci exprese ve specifických buňkách, tkáních nebo v určitém stádiu vývoje. Na počátku je třeba vytvořit dvě transgenní linie, kdy každá ponese jednu část tohoto systému. Jedna linie nese transkripční aktivátor, protein *GAL4*, který je vnesen pomocí vektoru P. Tato linie se označuje jako driver linie. Druhá linie nese úsek pro regulaci exprese genů, *UAS* – upstream activating sequence – následovaný kódující sekvencí cílového genu. Cílový gen je v genomu umístěn za *UAS*, ale není transkripčně aktivní. Až při zkřížení driver a *UAS* linie dojde k navázání proteinu *GAL4* na regulační část *UAS* a cílový gen se exprimuje. Systém *UAS-GAL4* umožňuje místně a časově specifickou expresi genů. Dá se využít pro expresi cizorodých genů (např. lidských), či pro zvýšení exprese vlastních genů (tzv. overexpresce).

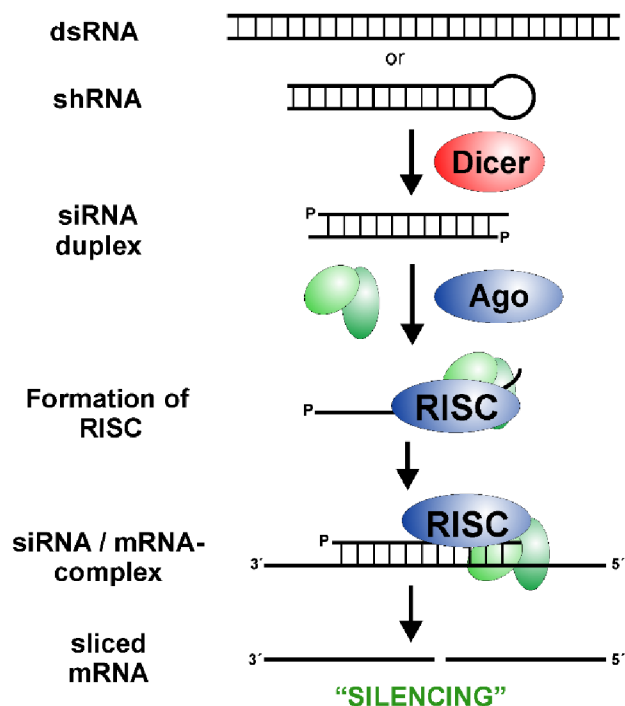


Obr. 1: *UAS-GAL4*. Pro expresi cílového genu je nejprve třeba zkřížit dvě transgenní linie, které nesou části systému, a tedy u nich samotných nedochází k expresi. (<https://www.semanticscholar.org/paper/Chapter-2-The-GAL-4-System-%3A-A-Versatile-System-for-Caygill-Brand/5d6ee570c78084d0b77c06dea87025025e543180>)

Pro snížení exprese genů se využívá RNA interference (**Obr. 2**). Princip RNA interference spočívá v zavedení malých dvouvláknových RNA interferencí (siRNA) do cytoplazmy anebo v případě *GAL4-UAS* systému jejich endogenní expresi. Tyto 21-23 nukleotidů dlouhé fragmenty siRNA vzniknou z dvouvláknové RNA sestřiháním za pomoci enzymu Dicer. V cytoplazmě jsou siRNA zpracovány RISC komplexem, který je použije jako templát pro lokalizaci cílové mRNA určené k degradaci. Finální mRNA je střižena díky aktivaci enzymatické aktivity komplexu RISC pomocí proteinu Argonaut.

RNAi se využívá pomocí systému *GAL4-UAS*. Za sekvencí *UAS* leží sekvence genu, který chceme umlčet, a to dvakrát za sebou v opačné orientaci. Přepisem tohoto úseku vznikne dvouvláknová molekula RNA, která je rozpoznána systémem RNAi. Ten jí použije jako vzor pro nalezení a rozložení mRNA a umlčení cílového genu. RNAi se projeví u potomků křížení dvou transgenních linií, díky aktivaci RNAi konstruktů pomocí navázání *GAL4* proteinu na sekvenci *UAS*. Jedna linie nese konstrukt RNAi a druhá, driver linie, řídí proces exprese RNAi.

Ve světě existuje několik center („stock centres“), odkud si lze objednat již transgenní linie drozofily s požadovaným genetickým pozadím. Objednané linie nesou specifické genetické modifikace jako jsou inserce nebo konstrukty RNA interference. Tato centra jsou Vienna Drosophila Resource Center (VDRC) ve Vídni, Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC) v Indianě (USA), National Institute of Genetics Fly Stock Center (NIG-Fly) a Kyoto Stock Center (DGRC-Kyoto) v Japonsku. Centra shromažďují linie drozofil, starají se o ně a distribuují je na základě požadavků objednavatelů pro vědecké účely. Každé z center umožňuje zaslání některých z ~ 80 000 variant drozofilních linií (Bilder & Irvine, 2017).



Obr. 2: RNA interference. Dvouvláknová RNA je pomocí enzymu Dicer sestříhána na siRNA, které jsou komplexem Dicer použity jako templát k degradaci cílové mRNA. (<https://www.gene-quantification.de/si-ma-index.html>)

1.3.3 Drozofila a kognitivní funkce

Výzkumy ukazují, že drozofila má vysoký potenciál pro studium kognitivních funkcí. Bylo zjištěno, že kognitivní paměť a predikční chování u drozofily nejsou jen pouhou reakcí na smyslové podněty nebo učení na základě asociací. Pravděpodobnější je skutečnost, že jde o aktivní rozhodnutí na základě zkušenosti (Guo et al., 2016).

Předmětem tohoto výzkumu je konkrétní kognitivní funkce a to habituace, k čemuž je drozofila ideálním modelem díky dobře popsaným mechanismům habituačního učení. Ať už jde o koncept negativního obrazu (Ramaswami, 2014) nebo klíčovou Ras/MAPK kaskádu s protichůdnými účinky dle typu neuronu, na který působí (Fenckova et al., 2019).

U drozofily je tato kognitivní funkce aktivně zkoumána v různých modifikacích a kontextech. Jedná se o vizuální (světlo), chemické (pachy), elektrické (elektrické šoky) a mechanické (vibrace) stimuly (Engel & Wu, 2009). Na základě těchto stimulů jsou zkoumány odpovědi na ně a na jejich opakování. Díky široké škále možností manipulace s genovou expresí (např. pomocí *GAL4-UAS*) lze odhalit, zda určité mutace způsobují poruchy této nejjednodušší formy učení nebo nikoli.

V mém výzkumu jsem využila tzv. „light-off jump“ habituaci. Mušky jsou vystaveny pravidelnému zhasínání světla, které vyvolá únikovou odpověď. Únikovou odpovědí v tomto případě je skok. Mušky, které nemají poruchu v habituaci na toto opakované zhasnutí postupně přestanou reagovat. Výsledkem je snížení skokové odpovědi. U mušek s poruchou v habituaci toto snížení buď nenastane, anebo k němu dojde až po větším počtu opakovaných stimulů než u mušek bez poruchy habituace. U velkého množství genů přítomných u PAS a PI je „light-off jump“ habituace narušena, a tak je dobrým nástrojem pro výzkum vlivu těchto genů na kognitivní dysfunkci (Fenckova et al., 2019).

2 Cíle

Deficit v habituálním učení je fenomén provázející PAS a PI. Identifikace genů, které jsou pro habituaci nezbytné a jsou zároveň spojené s PAS/PI může vést k lepšímu porozumění příčin kognitivní dysfunkce u PAS/PI a napomoci diagnostice. Tato práce se zabývá novými kandidátními geny *XPO1* a *USP34*, jejichž mutace se vyskytují u jedinců s PI a mohou tedy být monogenními příčinami těchto poruch. Cílem bylo ověřit jejich roli, respektive roli jejich drozofilích ortologů v kognitivní (dys)funkci s pomocí habituace. Tento cíl se skládá ze dvou dílčích cílů:

1. Snížit expresi ortologů pro *XPO1* a *USP34* v nervové tkáni pomocí RNAi a otestovat efekt na habituaci.
2. Molekulárně ověřit efektivitu RNAi.

S PAS a PI se mimo deficitu v habituaci a dalších příznaků pojí i častý výskyt obezity a imunitních problémů. To může přispívat ke kognitivní dysfunkci. Nicméně, přesný mechanismus tohoto vlivu není znám. Mým úkolem bylo zjistit, zda ortology vybraných genů, jejichž mutace způsobují monogenní PI/PAS syndromy se zvýšeným výskytem obezity a s ní spojených imunitních problémů mohou ovlivnit kognitivní funkci v habituaci, pokud jsou manipulovány pouze v imunitní tkáni, tedy mimo tkáň nervovou. Pracovala jsem s ortology 12 genů, jejichž exprese se v imunitní tkáni během její aktivace zvyšuje (Fencková, nepublikováno) a dá se tedy předpokládat, že budou pro její funkci důležité. Dílčími cíli tedy bylo:

3. Připravit drozofilí linii pro manipulaci PI/PAS genů v imunitní tkáni a vhodnou pro studium habituace.
4. Manipulovat s expresí genů implikovaných v PI/PAS v imunitní tkáni a otestovat efekt na kognitivní funkci v habituaci.

3 Materiál a metody

3.1 Drozofilí linie a péče o ně

Transgenní linie pro tento výzkum byly objednané z Vienna Drosophila Resource Center (VDRC) nebo Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC) a nebylo potřeba je přímo vytvářet. Všechny linie jsou uvedené v **tabulce 1** včetně jejich interního číselného označení, typu (*Gal4* driver, kontrola, RNAi, overexpres), původu a genotypu. Jednotlivé linie byly uchovávané ve vialkách v inkubátorech s monitorovanou úrovní vlhkosti (40-60 %) a stálým světelným režimem (12h světla, 12h tmy) s teplotou 25 °C nebo v případě potřeby 18 °C či 29 °C. Potrava pro drozofily se nacházela na dně vialek a byla složená z vody, agaru, sacharózy, instantních kvasnic a kukuřičné mouky. Linie byly podle potřeby přehazované do nových vialek, aby měly drozofily přístup k čerstvé potravě a nedocházelo k přemnožení uvnitř jedné vialky. Pro práci pod stereomikroskopem byli jedinci uspáni pomocí CO₂ a vysypáni na destičku s přívodem CO₂. Manipulace na destičce byla prováděna pomocí štětečku.

Číselné označení	Popis	Původ	Genotyp
1285	<i>Gal4</i> driver všeobecný	Alena Bruce	;act/CyOGFP
1403	<i>Gal4</i> driver všeobecný	Monika Zuberova	w ⁺ ; act-Gal4/TM6B
1498	kontrola	Bloomington 36303	y ¹ v ¹ ;P{y ⁺ t7.7=CaryP}attP2
1499	kontrola	Bloomington 36304	y ¹ v ¹ ;P{y ⁺ t7.7=CaryP}attP40
1713	<i>GFP</i>	Tomáš Doležal	w*; P{UAS-2xEGFP}AH2/CyO; +*/TM6C
1836	<i>mCherry</i>	Bloomington 52261	y ¹ w*; PBac{y ⁺ mDint w ⁺ mC=20XUAS-6XGFP}VK00018/CyO, P{Wee-P.ph0}Bacc ^{Wee-P20}
1848	<i>Gal4</i> driver pro imunitní buňky/hemocyty	Odvozeno z (Kierdorf et al., 2020)	w ¹¹¹⁸ ; TubGal80; crq-Gal4/ TM6C, Sb
2055	kontrola	VDRC GD 60000	w ¹¹¹⁸
2056	kontrola	VDRC KK 60100	y,w ¹¹¹⁸ ;P{attP,y ⁺ ,w ³ }
9003	Balancer	Laura Blok	w ⁺ ; GMR-wIR-3/2-25/1; MKRS/TM6, Ubx
9068	<i>Gal4</i> driver panneuronální	Odvozeno z FBst0602358	w-;GMR-wIR-3/2-25/1;elav-Gal4, UAS-Dicer2-6

9196	<i>Gal4</i> driver pro GABAergní neurony	Odvozeno z FBst0051630	; <i>Gad1-Gal4; GMR-wIR-1/3-172/1</i>
9252	<i>Ras</i> overexpresse	VDRC GD FBgn0003205	<i>w¹¹¹⁸; UAS-Ras1-R68Q;</i>
9260	<i>Csw</i> overexpresse	VDRC GD FBgn0000382	<i>P{w^{+mC}=UAS-csw.WT}CIM, w¹¹¹⁸</i>
9310	Double balancer	Laura Blok	<i>w¹¹¹⁸; Sp/CyO; Dr/TM6C, Sb, Tb</i>
9405	<i>CG14882</i> RNAi	VDRC GD 38838	<i>w¹¹¹⁸; P{GD8474}v38838</i>
9407	<i>PEK</i> RNAi	VDRC KK 110278	<i>P{KK100348}VIE-260B</i>
9419	<i>Gkl</i> RNAi	VDRC GD 52478	<i>w¹¹¹⁸ P{GD9566}v52478</i>
9421	<i>Gale</i> RNAi	VDRC GD 47408	<i>w¹¹¹⁸; P{GD7464}v47408</i>
9423	<i>G9a</i> RNAi	VDRC KK 110662	<i>P{KK100579}VIE-260B</i>
9424	<i>Cbs</i> RNAi	VDRC GD 32946	<i>w¹¹¹⁸ P{GD9407}v32946</i>
9427	<i>G9a</i> RNAi	VDRC GD 25474	<i>w¹¹¹⁸; P{GD9876}v25474</i>
9429	<i>PEK</i> RNAi	VDRC GD 16427	<i>w¹¹¹⁸; P{GD5584}v16427</i>
9431	<i>Alg1</i> RNAi	VDRC GD 20580	<i>w¹¹¹⁸; P{GD9500}v20580</i>
9434	<i>Cbs</i> RNAi	VDRC KK 31192	<i>w¹¹¹⁸; P{GD6887}v31192/TM3</i>
9435	<i>scu</i> RNAi	VDRC GD 37083	<i>w¹¹¹⁸; P{GD1528}v37083</i>
9436	<i>CG14882</i> RNAi	VDRC KK 103984	<i>P{KK103664}VIE-260B</i>
9437	<i>Gkl</i> RNAi	VDRC KK 110806	<i>P{KK100748}VIE-260B</i>
9441	<i>CG6287</i> RNAi	VDRC GD 40358	<i>w¹¹¹⁸; P{GD11878}v40358</i>
9452	<i>emb/XPO1</i> RNAi	VDRC GD 3347	<i>w¹¹¹⁸; P{GD1239}v3347</i>
9454	<i>emb/XPO1</i> RNAi	Bloomington 31353	<i>y¹v¹; P{TRiP.JF01311}attP2</i>
9460	<i>Gal4</i> driver pro imunitní buňky/hemocyty	Odvozeno z (Goto et al., 2003)	<i>w⁺; Hml-Gal4; 2xGMR-wIR-1/3-172/1</i>
9461	<i>Gal4</i> driver pro imunitní buňky/hemocyty	Odvozeno z (Kierdorf et al., 2020)	<i>w¹¹¹⁸; GMR-wIR-3/2-25/1/CyO; crq-Gal4/TM6, Ubx</i>
9467	<i>Galt</i> RNAi	Bloomington 28668	<i>y¹ v¹; P{TRiP.JF03083}attP2</i>

9469	<i>Gal4</i> RNAi	VDRC KK 100025	<i>P{KK102974}VIE-260B</i>
9470	<i>USP34</i> RNAi	VDRC GD 27517	<i>w¹¹¹⁸; P{GD11771}v27517</i>
9471	<i>USP34</i> RNAi	VDRC KK 106192	<i>P{KK102400}VIE-260B</i>

Tab. 1: Linie použité při experimentech včetně jejich číselného kódu, popisu typu, původu a genotypu. V zápisu genotypu jsou jednotlivé chromozomy oddělené středníkem (;) a sesterské chromozomy lomítkem (/). Na prvním místě je pohlavní chromozom popisující pohlaví a barvu očí. Značka + značí wild type červenookou mušku, bez + je bělooký mutant. Z genotypu lze vyčíst přítomnost markerů. Dominantní markery jsou označeny velkým prvním písmenem, recesivní malým. Pomocí nich lze sledovat přítomnost balancerů, které nepodléhají rekombinaci a lze díky nim udržet mutace letální v homozygotním stavu. Složená závorka indikuje P element. Horním indexem jsou označeny mutantní alely.

3.2 Křížení linií

Pro všechny experimenty, ať už to bylo habituační měření, molekulární ověřování nebo tvorba nové linie, byly kříženy potřebné linie. Před samotným křížením byly vysbíráni z jedné linie samci a z druhé panny. Je známo, že po dobu prvních 8 hodin života dospělce nedochází k páření (doba se může lišit v závislosti na teplotě), proto lze po tuto dobu vybírat panny potřebné pro křížení. Panny nesou fenotypové znaky jako je například světlejší zbarvení, které usnadňují jejich rozpoznání. Panny jsem vybírala 2krát až 3krát denně podle potřeby. Po sesbírání dostatečného množství samců a panen pro křížení bylo do každé vialky dáno 5 panen a 5-10 samců. Panny by měly být v den křížení maximálně 6 dní staré. Vialky s křížením byly dány do inkubátoru požadované teploty a byly přehozeny na čerstvou potravu 2krát po 2 dnech. První dospělci z křížení se objevují po 8-10 dnech (opět v závislosti na teplotě).

3.2.1 Křížení pro manipulaci s expresí genů *emb* a *puf*, ortologů *XPO1* a *USP34*

Pro ověření rolí v kognitivní funkci u ortologů nových kandidátních PI genů (*emb*, *puf*) byly zkříženy *Gal4* driver linie ovládané určitým typem promotoru buď s linií nesoucí UAS-RNAi proti konkrétnímu genu nebo s kontrolní linií, mající stejné genetické pozadí, ale bez genetické manipulace. Během experimentů byly využity dva typy promotorů s *Gal4* drivery, a to konkrétně panneuronální promotor *elav-Gal4* pro snížení exprese (knockdown) genů ve všech neuronech a GABAergní promotor *Gad1-Gal4* pro knockdown pouze v GABAergních inhibičních neuronech. *Elav-Gal4* využívá promotor pro gen *embryonic lethal abnormal vision (elav)*, jehož produktem je RNA vazebný protein, který řídí různé procesy v nervových buňkách, například růst axonů a tvorbu synapsí (FlyBase, FB2024_01). *Gad1-Gal4* driver využívá promotor pro gen *Glutamic acid decarboxylase 1 (Gad1)* *Gad1* katalyzuje dekarboxylaci kyseliny glutámové na kyselinu gama-aminomáselnou (GABA) (FlyBase, FB2024_01). GABA je hlavním

inhibičním neurotransmiterem v centrálním nervovém systému savců i drozofily a tvoří se tedy pouze v inhibičních neuronech. Pro ověření RNAi interference byly zkříženy driver linie pro geny *emb* a *puf* s RNAi pro všeobecný knockdown s aktinovým promotorem před *Gal4* (Tab. 2).

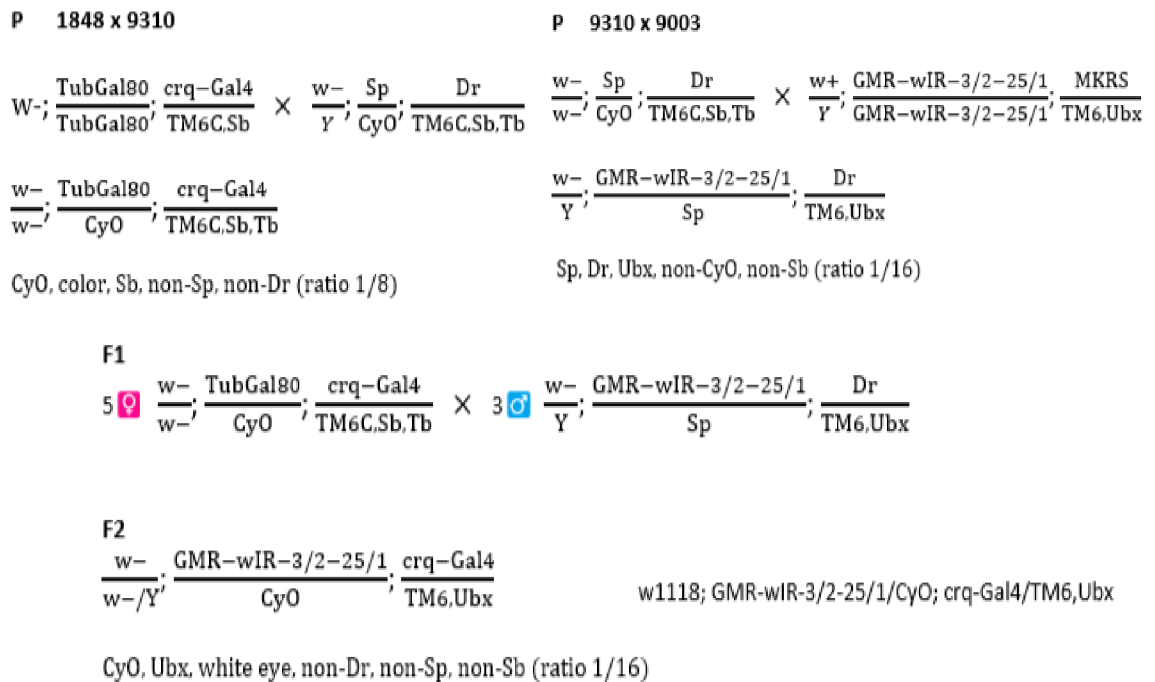
Gen	Knockdown	Driver	RNAi kontrola	Typ manipulace	Genotyp	Zkrácený genotyp
<i>emb</i>	GABA	9196	9454	RNAi	$+/y^1v^1; Gad1-Gal4/P\{TRiP.JF0131\}attP2; GMR-wIR-1/3-172/1$	<i>Gad1-Gal4>emb-RNAi-1</i>
			1498	Kontrola	$+/y^1v^1; Gad1-Gal4/Py^{+17.7}=CaryPa ttP2; GMR-wIR-1/3-172/1$	<i>Gad1-Gal4/+</i>
			9452	RNAi	$w^{1118}; Gad1-Gal4/P\{GD1239\}v3347; GMR-wIR-1/3-172/1$	<i>Gad1-Gal4>emb-RNAi-2</i>
			2055	Kontrola	$w^{1118}; Gad1-Gal4; GMR-wIR-1/3-172/1$	<i>Gad1-Gal4/+</i>
<i>puf</i>	Panneuronální	9068	9470	RNAi	$w^{1118}/-; GMR-wIR-3/2-25/1/PGD11771v27517; elav-Gal4, UAS-Dicer2-6/+$	<i>elav-Gal4>puf-RNAi-1</i>
			2055	Kontrola	$w^{1118}/-; GMR-wIR-3/2-25/1/+; elav-Gal4, UAS-Dicer2-6/+$	<i>elav-Gal4/+</i>
			9471	RNAi	$w/+; GMR-wIR-3(2-25)1/PKK102400VIE-260B, elav-Gal4, UAS-Dicer2-6/+$	<i>elav-Gal4>puf-RNAi-2</i>
			2056	Kontrola	$w-/y, w^{1118}; GMR-wIR-3(2-25)1/P\{attP, y^+, w^3\}; UAS-Dicer2-6/+$	<i>elav-Gal4/+</i>
<i>emb</i>	všeobecný	1285	9452	RNAi	$+/w^{1118}; act/PGD1239v3347$	<i>act-Gal4>emb-RNAi-2</i>
			2055	kontrola	$+/w^{1118}; act-Gal4/+$	<i>act-Gal4/+</i>
			9454	RNAi	$y^1v^1; act/P\{TRiP.JF01311\}attP2$	<i>act-Gal4>emb-RNAi-1</i>

			2056	kontrola	$y;w^{1118};act/P\{attP,y^+,w^3\}$	$act/+$
<i>puf</i>	všobecný	1403	9470	RNAi	$+/w^{1118};act-Gal4/PGD11771v27517$	$act-Gal4>puf-RNAi-1$
			2055	kontrola	$+/w^{1118};act-Gal4/+$	$act-Gal4/+$
		1285	9471	RNAi	$;act/PKK102400VI E-260B$	$act-Gal4>puf-RNAi-2$
			2056	kontrola	$y;w^{1118};P\{attP,y^+,w^3\}$	$act-Gal4/+$

Tab. 2: Křížení pro panneuronální, GABA a všeobecný knockdown genů *emb* a *puf*. V tabulce je uveden název genu, typ knockdownu, číselné označení driveru, RNAi nebo kontrolní linie, typ manipulace (RNAi, kontrola), křížením vzniklý genotyp a zkrácený genotyp.

3.2.2 Vykřížení linie pro manipulaci s genovou expresí v imunitních buňkách

Další křížení je zobrazeno pomocí schématu. **Obrázek 3** znázorňuje linie zkřížené pro vytvoření nové linie pro další experimenty s habituací. Výsledná linie měla mít *Gal4* aktivační protein pod promotorem *crq* (*croquemort*) na třetím chromozomu a zároveň RNAi proti genu *white* (*GMR-wIR*), která je nezbytná k potlačení červené barvy očí pro optimální skokovou odpověď v „light-off jump“ habituaci (Fenckova et al., 2019). *Gal4* pod promotorem *crq* je aktivačním proteinem pro experimenty v buňkách imunitní tkáně – hemocytech (FlyBase, FB2024_01). Křížení probíhalo při 25 °C. Výsledná linie dostala číselné označení 9461 (**Tab. 1**).



Obr. 3: Schéma pro vytvoření nové RNAi linie s promotorem *crq* (*croquemort*) a bílou barvou očí pro další experimenty s habituací. Písmeno P je označení pro křížení, ze kterého pochází rodičovské linie, jejichž křížení je označeno jako F1. F2 označuje finální křížení pro výsledný genotyp $w^{1118}; GMR-wIR-3/2-25/1/CyO; crq-Gal4/TM6.Ubx$. Jednotlivé chromozomy jsou označeny středníkem, sesterské chromatidy vodorovnou čarou. V závorkách jsou uvedeny pravděpodobnosti výskytu daného genotypu mezi potomky křížení.

Pro ověření přítomnosti *Gal4* driveru pomocí fluorescenčního mikroskopu byli jedinci 9461 zkříženi s linií 1713 nesoucí *UAS-GFP* (zelený fluorescenční protein) a s linií 1836 nesoucí *UAS-mCherry* (červený fluorescenční protein) (**Tab. 3**). Pro kontrolu byla zkřížena s těmito liniemi i linie 1848, což je původní linie nesoucí *crq-Gal4*, ze které byla nová linie 9461 vykřížena (**Tab. 1**). Křížení linie 9461 bylo inkubováno při 25 °C a linie 1848 při 29 °C, a to z důvodu přítomnosti teplotně citlivého *Gal4* inhibitoru, který zamezuje expresi *Gal4* v nižších teplotách.

Driver	GFP/mCherry	Genotyp
9461	1713	w^{1118}/w^* ; <i>GMR-wIR-3/2-25/1/P{UAS-2xEGFP}AH2</i> ; <i>crq-Gal4/TM6C</i>
9461	1836	w^{1118}/y^1w^* ; <i>GMR-wIR-3/2-25/1/PBac{y^{+mDint2}w^{+mC}=20XUAS-6XmCherry-HA}VK00018</i> ; <i>crq-Gal4/TM6C</i> , <i>Sb¹Tb¹</i>
1848	1713	w^{1118}/w^* ; <i>TubGal80/P{UAS-2xEGFP}AH2</i> ; <i>crq-Gal4/TM6C</i>
1848	1836	w^{1118}/y^1w^* ; <i>TubGal801/PBac{y^{+mDint2}w^{+mC}=20XUAS-6XmCherry-HA}VK00018</i> ; <i>crq-Gal4/TM6C</i> , <i>Sb¹Tb¹</i>

Tab. 3: Křížení pro ověření přítomnosti *Gal4* driveru v nově vzniklé drozofilí linii. V tabulce je uvedeno číselného označení driver linie, s čím byla zkřížena a výsledný genotyp.

3.3 Manipulace exprese vybraných genů v imunitní tkáni

Další křížení bylo provedeno pro snížení či zvýšení exprese 12 vybraných genů implikovaných v PI/PAS a v imunitní tkáni (Lesch et al., 2007). Účelem této manipulace bylo zjištění efektu na kognitivní funkci v habituaci. Jako driver byl použit *Hml-Gal4*. Ten exprimuje *Gal4* pod promotorem hemolektinu, proteinu specifického pro hemocyty hmyzu. Hemolektin je důležitý pro imunitní reakce. V **tabulce 4** jsou uvedena křížení k jednotlivým genům. GD, KK a TRiP je označení RNAi knihoven – zdrojů RNAi linií. GD (Dietzl et al., 2007) a KK (https://shop.vbc.ac.at/vdrc_store/rnai-info) jsou knihovny s odlišným designem patřící pod VDRC. TRiP (Transgenic RNAi Project) je RNAi knihovna jejíž RNAi linie jsou dostupné v BDSC (Perkins et al., 2015). Jako kontrolní byla použita křížení mezi *Hml-Gal4* driverem (9460) a příslušným genetickým pozadím linií (GD: 2055, KK: 2056, TriP: 1498) uvedené na konci tabulky. Křížení probíhala při 25 °C.

Lidský gen	Drozofilí gen	Typ manipulace	RNAi	Driver	Genotyp	Zkrácený genotyp
<i>EHMT1</i>	<i>G9a</i>	RNAi	9427 GD	9460	w^+/w^{1118} ; <i>Hml-Gal4/P{GD9876}v25474; 2xGMR-wIR-1/3-172/1</i>	<i>Hml-Gal4>G9a-RNAi-1</i>

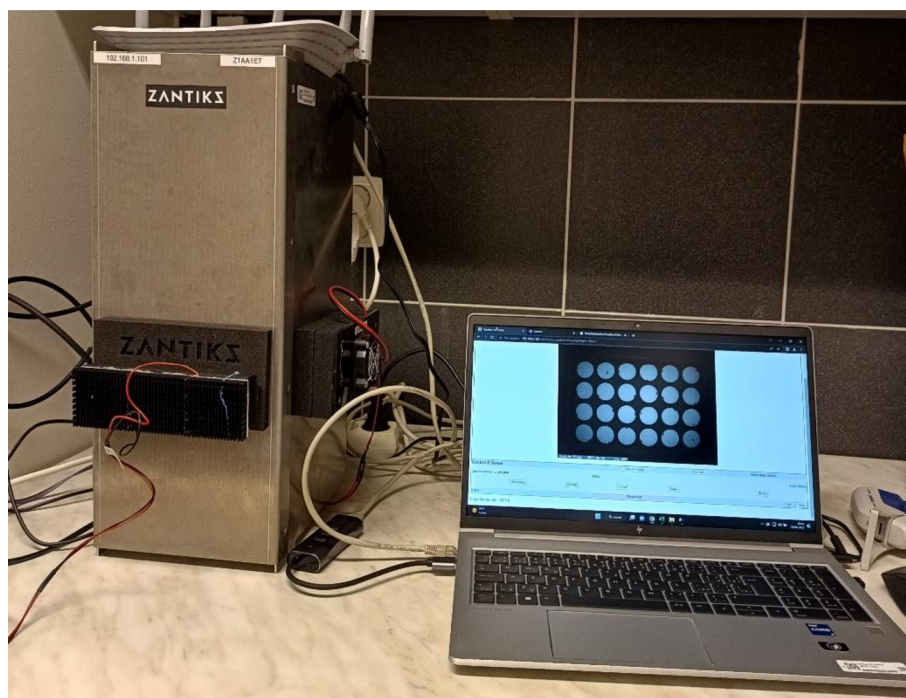
		RNAi	9423 KK		$w^+ / w^{1118}; Hml-Gal4 / P\{KK100579\}VI E-260B; 2xGMR-wIR-1/3-172/1$	<i>Hml-Gal4>G9a-RNAi-2</i>
<i>KRAS/HRAS</i>	<i>Ras</i>	Overexpress	9252 GD		$w^+ / w^{1118}; Hml-Gal4 / UAS-Ras1-R68Q; 2xGMR-wIR-1/3-172/1$	<i>Hml-Gal4>Ras-R68Q</i>
<i>PTPN11</i>	<i>Csw</i>	Overexpress	9260 GD		$w^+ / w^{1118}; Hml-Gal4 / P\{w^{+mC}=UAS-csw.WT\}CIM; 2xGMR-wIR-1/3-172/1$	<i>Hml-Gal4>Csw</i>
<i>MTRR</i>	<i>CG14882</i>	RNAi	9405 GD		$w^+ / w^{1118}; Hml-Gal4 / P\{GD8474\}v38838; 2xGMR-wIR-1/3-172/1$	<i>Hml-Gal4>CG14882-RNAi-1</i>
		RNAi	9436 KK		$w^+; Hml-Gal4 / P\{KK103664\}VI E-260B; 2xGMR-wIR-1/3-172/1$	<i>Hml-Gal4>CG14882-RNAi-2</i>
<i>GK</i>	<i>Gkl</i>	RNAi	9419 GD		$w^+ / w^{1118}; Hml-Gal4 / P\{GD9566\}v52478; 2xGMR-wIR-1/3-172/1$	<i>Hml-Gal4>Gkl-RNAi-1</i>
		RNAi	9437 KK		$w^+; Hml-Gal4 / P\{KK100748\}VI E-260B; 2xGMR-wIR-1/3-172/1$	<i>Hml-Gal4>Gkl-RNAi-2</i>
<i>GALE</i>	<i>Gale</i>	RNAi	9421 GD		$w^+ / w^{1118}; Hml-Gal4; 2xGMR-wIR-1/3-172/1$	<i>Hml-Gal4>Gale-RNAi</i>
<i>GALT</i>	<i>Galt</i>	RNAi	9469 KK		$w^+ / w^{1118}; Hml-Gal4 / P\{GD7464\}v47408; 2xGMR-wIR-1/3-172/1$	<i>Hml-Gal4>Galt-RNAi-1</i>
		RNA	9467 TRiP		$w^+ / y^1 v^1; Hml-Gal4 / P\{TRiP.JF03083\}attP2; 2xGMR-wIR-1/3-172/1$	<i>Hml-Gal4>Galt-RNAi-2</i>
<i>CBS</i>	<i>Cbs</i>	RNAi	9434 KK		$w^+ / w^{1118}; Hml-Gal4 / P\{GD6887\}v31192; 2xGMR-wIR-1/3-172/1$	<i>Hml-Gal4>Cbs-RNAi</i>

<i>EIF2AK3</i>	<i>PEK</i>	RNAi	9429 GD	$w^+/w^{1118}; Hml-Gal4/P\{GD5584\}v16427; 2xGMR-wIR-1/3-172/1$	<i>Hml-Gal4>PEK-RNAi-1</i>
		RNAi	9407 KK	$w^+; Hml-Gal4/P\{KK100348\}VI E-260B; 2xGMR-wIR-1/3-172/1$	<i>Hml-Gal4>PEK-RNAi-2</i>
<i>ALG1</i>	<i>Alg1</i>	RNAi	9431 GD	$w^+/w^{1118}; Hml-Gal4/P\{GD9500\}v20580; 2xGMR-wIR-1/3-172/1$	<i>Hml-Gal4>Alg1-RNAi</i>
<i>HSD17B10</i>	<i>Scu</i>	RNAi	9435 GD	$w^+/w^{1118}; Hml-Gal4/P\{GD1528\}v37083; 2xGMR-wIR-1/3-172/1$	<i>Hml-Gal4>Scu-RNAi</i>
<i>PHGDH</i>	<i>CG6287</i>	RNAi	9441 GD	$w^+/w^{1118}; Hml-Gal4/P\{GD11878\}v40358; 2xGMR-wIR-1/3-172/1$	<i>Hml-Gal4>CG6287-RNAi</i>
		Kontrola	2055 GD	$w^+/w^{1118}; Hml-Gal4; 2xGMR-wIR-1/3-172/1$	<i>Hml-Gal4/+</i>
		Kontrola	2056 KK	$w^+/w^{1118}; Hml-Gal4/P\{attP,y^+,w^3\}; 2xGMR-wIR-1/3-172/1$	<i>Hml-Gal4/+</i>
		Kontrola	1498 TRip	$w^+/y^1v^{18}; Hml-Gal4/P\{y^{+t7.7}=CaryP\} attP2; 2xGMR-wIR-1/3-172/1$	<i>Hml-Gal4/+</i>

Tab. 4: V tabulce jsou uvedeny názvy lidských genů, názvy jejich drozofilích ortologů, typ manipulace, číselné označení RNAi, kontroly a driveru, křížením vzniklý genotyp a zkrácený genotyp (použitý pro označení manipulací ve grafech a výsledcích).

3.4 Měření habituace – systém Zantiks

Měření habituace u drozofily probíhá za pomoci detekce skokových odpovědí (jump) na podnět, kterým je zhasnutí světla (light-off). Experiment je prováděn v behaviorální jednotce MWP unit od firmy Zantiks (zantiks.com) (**Obr. 4**) s vlastním programovacím jazykem Zanscript. Tato jednotka je výkonný systém pro sledování a poskytování podnětů malým organismům. Jednotka zajišťuje stabilní prostředí, které lze ovládat prostřednictvím webového prohlížeče a umožňuje sledování průběhu experimentu v reálném čase přes video. Obsahuje integrovanou kameru, světla, monitoring teploty, datové výstupy pohybu organismů (v mm za daný časový interval) a testovací komoru.



Obr. 4: Měřicí jednotka Zantiks s připojeným notebookem.

Odpovědi během měření mají formu skoku a jsou to únikové reakce na podnět, kterým je zhasnutí světla. K měření se využívá hlavně samců, protože u samic může dojít k ovlivnění aktivity hormony až do té míry, že vůbec neskáčou.

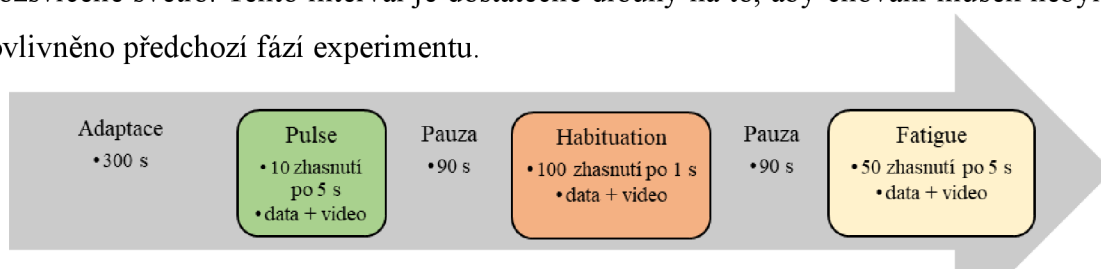
Před samotným experimentem jsou dospělí jedinci staří 3 až 7 dní krátce uspaní na ledu a přeneseni na destičku s 24 oddělenými komůrkami (**Obr. 5**). Do každé komůrky je dána jedna moucha, aby nedocházelo k vzájemnému ovlivňování jedinců mezi sebou. Destička je uzavřena a ponechána v pokojové teplotě alespoň 30 minut, aby došlo

k znovuoobnovení normálního stavu tělních funkcí po usnutí na ledu. Destička je vložena do systému Zantiks, uvnitř kterého je teplota 25 °C.



Obr. 5: Destička do systému Zantiks s 24 komůrkami, v každé je jeden samec testované linie na habituaci.

Samotný experiment se skládá z několika fází (**Obr. 6**). Prvně jsou jedinci vystaveni konstantnímu světlu po dobu 5 minut, aby si zvykli na nové prostředí. Další fází je takzvaná „Pulse“ fáze. V této fázi jsou jedinci vystaveni 10 podnětům ve formě zhasnutí světla. Mezi jednotlivými podněty jsou vždy intervaly, kdy dojde k opětovnému rozsvícení světla. V této fázi jeden interval trvá 5 sekund. „Pulse“ část je kontrolní fází, jak dobře dospělci reagují na podněty. Interval 5 sekund je dostatečně dlouhý na to, aby se jedinci na opakované podněty nehabituovali. Dalším krokem je měření samotné habituace, proto je druhá fáze nazvaná „Habituation“. Podnět se opakuje 100krát s intervalem 1 sekundy mezi podněty, což umožňuje habituaci, tedy snižování počtu skokových odpovědí s rostoucím počtem opakování. Poslední část měření se nazývá „Fatigue“. Podnětů je v tomto případě 50 s intervalem světla trvajícím 5 sekund. Na základě této fáze můžeme vyloučit případné snížení počtu skokových odpovědí v habituaci zapříčiněné únavou. Interval 5 sekund je dostatečně dlouhý na to, aby se jedinci nehabituovali. Mezi všemi fázemi je pauza trvajícím 90 sekund, při které je uvnitř systému rozsvícené světlo. Tento interval je dostatečně dlouhý na to, aby chování mušek nebylo ovlivněno předchozí fází experimentu.

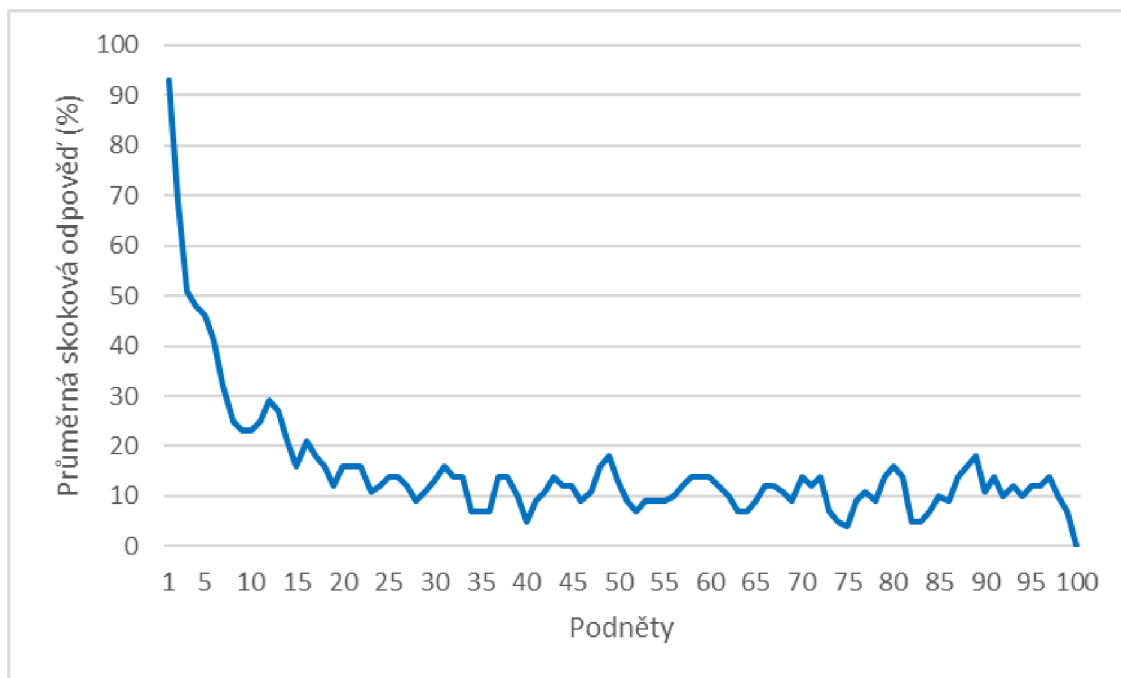


Obr. 6: Jednotlivé fáze měření habituace, délka (s) a počet light off podnětů trvajících 15 ms. Data a o pohybu a videa se sbírají z fází Pulse, Habituation a Fatigue.

3.4.1 Vyhodnocení výsledků měření

Přístroj Zantiks je napojen na notebook, přes jehož kontrolní centrum lze přístroj řídit a zaznamenávat výsledky, které jsou dostupné ve formátu .csv a videí z fází „Pulse“, „Habituation“ a „Fatigue“ (**Obr. 6**). Data obsahují skokové odpovědi, které jsou rozeznávané na základě rozdílu uražené vzdálenosti drozofilou 0,5 sekund po stimulu a 0,5 sekund před stimulem (měřeno v milimetrech). Aby byl zaznamenán skok musí být hodnota rozdílu větší než 0. Zároveň je používána hodnota MSD (mean square difference) udávající průměrnou velikost rozdílu vzdálenosti mezi jednotlivými videosnímky. Pokud je MSD větší než 1, pohnula se drozofila celým svým tělem, a ne pouze jeho částí (noha, křídlo atd.). Kombinací těchto dvou kritérií (rozdíl pohybu po a před stimulem > 0 a zároveň $MSD > 1$) lze dosáhnout přesnosti vyhodnocování skoků z 98,42 % (Kabátová, 2023). Podle těchto kritérií jsou data automaticky převedena do nového datasetu, který zaznamenává jedničky (skoky) a nuly (neskoky). Ten se dále analyzuje programem připraveným přímo na míru těmto datům. Nazývá se HAB_PPI. Program automaticky každé mouše přiřadí proměnnou TTC. Jedná se o takzvané „Trials To Criterion“. A to na základě toho, po kolika light-off stimulech moucha dosáhla tzv. „no-jump criterion“. „No-jump criterion“ je splněné, pokud u drozofily nedojde ke skokové odpovědi v pěti po sobě jdoucích stimulech. Průběh habituace je znázorněn pomocí křivky, která zobrazuje počet stimulů na ose X a průměrnou skokovou odpověď (v procentech) na ose Y (**Obr. 7**). TTC tedy udává počet stimulů, které daná moucha potřebovala k dosažení habituace. Hodnoty TTC pro všechny mouchy z jedné sady se zprůměrují a podíl mezi TTC manipulovaných much a TTC kontrolních much udává rozdíl v habituaci. Průměrné TTC se většinou udává včetně standardní chyby průměru ($\pm SEM$). Získané hodnoty z rozdílu mohou být větší nebo menší než 1. Pokud jsou < 1 jde o předčasnou habituaci, naopak pokud hodnoty vycházejí > 1 jde o pomalejší, tedy defektní habituaci. TTC hodnoty jednotlivých much z obou sad nemají normální rozdělení, proto se musí zlogaritmovat ($\log TTC$). Analýza je integrovaná v systému a zahrnuje zlogaritmování kritéria $TTC \pm SEM$ pro kontrolní a experimentální sadu drozofil a jejich porovnání. Lineárním modelem se otestuje vliv genetické manipulace na $\log TTC$. Pro statistickou průkaznost testu je potřeba, aby hodnota testu pravděpodobnosti (p-value) byla menší než 0,05. Vše se ukládá do databáze. Pokud rozdíl TTC naznačuje předčasnou habituaci, hodnotí se i test únavy (Fatigue). Ten se hodnotí stejně jako habituace. Pokud je rozdíl TTC jak v habituaci, tak ve „Fatigue“ < 1 , nejedná se

pravděpodobně o rychlejší habituaci, ale o zvýšenou únavu. Informaci z fáze „Pulse“ jsem v této práci nepoužívala.



Obr.7: Průběh habituace. Křivka zobrazuje počet stimulů na ose X a na ose Y průměrnou procentuální skokovou odpověď.

S každou sadou manipulovaných drozofil je testována ten samý den i kontrolní sada, tedy mušky bez genetické manipulace na stejném genetickém pozadí. Pro vyhodnocení habituace je nezbytné, aby během prvních 5 zhasnutí (light off stimulů) odpověděla skokem alespoň minimálně polovina z testovaných jedinců. Pokud nedojde k splnění tohoto kritéria minimální skokové odpovědi, nelze habituaci vyhodnotit. To se týká jak sady kontrolní, tak sady mutantní (manipulované).

3.5 Izolace RNA z larev

RNA byla izolována z larev třetího instaru za pomoci kitu Direct-zol™ Kit (Zymo research). 3 až 4 larvy byly pomocí ručního homogenizátoru zhomogenizované v 200 μ L TRIzolu®. Pro každé křížení byly vytvořeny tři vzorky. Práce s TRizolem® probíhala uvnitř digestoře. Zhomogenizované vzorky byly inkubované 15 minut v pokojové teplotě. Po 15 minutách bylo k vzorkům napipetováno 200 μ L 96-100 % ethanolu a vše bylo zvortexováno. Centrifuga byla nastavena na rychlost 13 000 g. Roztok byl přenesen do čistých kolonek se sběrnými zkumavkami. Vzorky byly centrifugované po dobu 60 sekund. Kolonky byly přenesené do čistých sběrných zkumavek. Sběrné zkumavky s TRizolem® a ethanolem byly odnesené do digestoře a zlikvidované po izolaci. Do kolonky bylo přidáno 400 μ L RNA Wash pufru a vše bylo stočeno na centrifuze po dobu 60 sekund. Sběrné kolonky byly vylité pod proudem vody do dřezu. Byl připraven roztok

5 μL DNázy v 35 μL DNA Digestion pufru na vzorek. Do kolonky přímo na membránu bylo přidáno 40 μL této směsi. Vzorky byly následně znovu inkubovány po dobu 15 minut v pokojové teplotě. Po inkubaci bylo do kolonky přidáno 400 μL RNA PreWash pufru. Vše bylo opět 60 sekund centrifugováno a sběrné kolonky byly vylity do dřezu pod proudem vody. Krok s přidáním RNA PreWash pufru a centrifugací byl zopakován. Následně bylo do kolonky napipetováno 700 μL RNA Wash pufru a centrifugace tentokrát trvala 3 minuty. Kolonky byly opatrně přeneseny do čistých zkumavek. RNA byla vymytá z kolonky pomocí 20 μL DNase/RNase-Free vody, která byla přidána přímo na membránu kolonky. Vše bylo centrifugováno po dobu 90 vteřin. Vymývání RNA z kolonky bylo zopakováno včetně centrifugace. Výsledkem bylo 40 μL vzorku. Kvalita vzorků byla zkontrolována na NanoDropu One (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), na který byl použit 1 μL z každého vzorku a jako slepý vzorek posloužila DNase/RNase-Free voda.

3.6 Reverzní transkripce

Reverzní transkripce byla prováděna na ledu a s dodržováním zásad pro práci s RNA – práce v rukavicích, špičky na pipety s filtry. Nejprve byl nastaven termoblok (CH-100, Heating/Cooling Dry Block, Biosan, Latvia) na teplotu 65 °C. V 1,5 ml RNase-free zkumavce byla připravena směs o 1 μL Oligo dT primeru (50 μM), 1 μL dNTP (10 mM), zhruba 120 ng templátové RNA ze vzorku a zbytek do 10 μL byl doplněn DEPC vodou (voda bez nukleáz, sterilně filtrovaná a autoklávovaná s přidavkem diethyl pyrokarbonátu). Směs ve zkumavce byla přenesena na termoblok, kde byla zahřáta při 65 °C 5 minut. Poté byly vzorky okamžitě schlazeny na ledu. Termoblok byl nastaven na 30 °C. K první směsi o 10 μL byla přidána směs o 10 μL . Tato směs vznikla smícháním 4 μL 5X PrimeScript pufru, 0,5 μL PrimeScript reverzní transkriptázy a 5,5 μL DEPC vody. Kontrolní vzorky byly vytvořeny stejným způsobem, ale PrimeScript reverzní transkriptáza byla nahrazena DEPC vodou (6 μL dohromady). Vzorky byly promíchány a ponechány v termobloku 10 minut při 30 °C, poté 60 minut při 42 °C a nakonec 15 minut při 70 °C. Z termobloku byly vzorky okamžitě přendány na led k schlazení.

3.7 qPCR

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR) je metodou, která umožňuje sledování množství právě amplifikované DNA v reálném čase. Monitorování nárůstu množství DNA během amplifikace je umožněno detekcí fluorescenčních sond nebo barviv, které se vážají na DNA. Nejčastěji využívanou metodou, která je použita i v této práci, je sledování množství DNA pomocí fluorescenčního barviva SyberGreen.

SyberGreen se přidává do reakční směsi s primery a polymerázou. SyberGreen se naváže pouze na dvou řetězcovou DNA a při navázání dojde k emisi fluorescence. Fluorescence se zvyšuje s každou amplifikací a je detekována pomocí detektoru v cykléru.

qPCR byla provedena na dvou genech za účelem zjištění efektivity indukované RNA interference. U genů *emb* a *puf* byl použit k práci se sekvencemi, vyznačení primerů a dsRNA smyčky program ApE (A plasmid Editor v3.1.4). Sekvence použitých primerů jsou uvedeny v **tabulce 5**. Pro jejich výběr byl použit Primer3web (<https://primer3.ut.ee/>). Kritéria pro produkt byly 100-300 nukleotidů, teplota tání 57-60 °C. Pozici primerů jsem vybírala tak, aby se nacházely na 5' konci od komplementární sekvence pro příslušnou dvouvláknovou smyčkou použité RNAi a aby byl mezi dvojicí primerů přítomen intron pro kontrolu amplifikace z mRNA a nikoli z případné jaderné DNA, pokud by se i přes ošetření Dnázou nacházela ve vzorku. Sekvence *emb* a *puf* byly získány z FlyBase (FB2024_01) (<https://flybase.org/>) a jsou uvedeny v **Příloze 1,2**.

Název primeru	Sekvence
<i>Emb_F1</i>	TTTCACACGCTGCTCTTTTC
<i>Emb_R1</i>	GAGCTCGGATCTCACGTTTT
<i>Usp_F4</i>	GCGGCCATACAGTACATCA
<i>Usp_R4</i>	CACGCATCAAAGCATTCTCA
<i>Rp49 F</i>	AAGCTGTCGCACAAATGGCG
<i>RP49 R</i>	GCACGTTGTGCACCAGGAAC
<i>Aktin F</i>	TACCCCATGAGCACGGTAT
<i>Aktin R</i>	GGTCATCTTCTCACGGTTGG
<i>Polr2A F</i>	GACCAGCTAGGCGACATTC
<i>Polr2A R</i>	CCGCGATACTTCTCTCCAC

Tab. 5: Sekvence primerů navržené pro qPCR ověření manipulací genů *emb* a *puf* a sekvence referenčních genů *RP49*, *Aktin* a *Polr2A*.

Vzorky po reverzní transkripci byly naředěny na objem 200 µL MilliQ H₂O a zvortexovány. Kontrolní vzorky, bez reverzní transkriptázy, byly naředěny na objem 50 µL. Z primerů byl vytvořen pracovní roztok, který byl 5krát zředěný (20 µM) oproti původní koncentraci (100 µM). To znamená, že k 10 µL primeru bylo přidáno 40 µL MilliQ vody. Reakční směs pro qPCR o objemu 126 µL vycházející na 14 jamek na

destičce byla vytvořena smícháním 84 μL TP SYBR 2x Master Mix, 35 μL PCR Ultra H_2O , 3,5 μL přímého a 3,5 μL zpětného primeru (20 μM). Do každé jamky bylo napipetováno 8,2 μL reakční směsi a 3 μL vzorku. Ke každému primeru byly pipetovány kontrolní vzorky, které byly bez reverzní transkriptázy. Navíc byla u všech primerů provedena i negativní kontrola nahrazením vzorku 3 μL PCR Ultra H_2O . Na destičku byly pipetovány tři biologické vzorky, vždy o třech technických vzorcích, aby byla eliminována případná chyba v pipetování.

Pro zjištění efektivity primerů byla vytvořena standartní křivka. Vzorek o objemu 60 μL byl zředěn 10krát, 100krát a 1000krát. Na destičku pro qPCR o 96 jamkách bylo postupně napipetováno vždy do každé jamky 8,2 μL reakční směsi s daným primerem a poté 3 μL 1krát, 10krát, 100krát a 1000krát zředěného vzorku. Standardní křivku vyjádříme tak, že propojíme v grafu hodnoty Ct pro jednotlivé naředěné vzorky s hodnotami daných ředění. Podle sklonu křivky lze vypočítat účinnost reakce a to dle vzorce $E = (10^{(-1/\text{Slope})} - 1) \times 100$. Ideální efektivita primerů by měla být, co nejbližší 100 %. U standartní křivky byla také vyhodnocena negativní kontrola pro každý vzorek, aby se vyloučila amplifikace z důvodu kontaminace.

Denaturační teplota pro qPCR byla nastavena na termocykléru (CFX96 Real-Time PCR Detection Systems, Bio-Rad Laboratories, CA, USA) na 95 $^{\circ}\text{C}$ na 3 minuty. Cyklů amplifikace bylo 40. Při každém cyklu proběhla denaturace při 94 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 15 vteřin, annealing při teplotě 60 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 30 vteřin a extenze při 72 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 vteřin.

Z každého triplikátu byly zaznamenány hodnoty Ct, ze kterých byl udělán průměr, pokud mezi nimi nebyl rozdíl větší než 1. Dalším krokem bylo odečtení průměrného Ct referenčního genu a cílového genu RNAi nebo kontrolních vzorků (ΔCt). Z průměru kontrolních vzorků byla vytvořena kalibrační hodnota. Kalibrační hodnota byla odečtena od hodnot ΔCt ($\Delta\Delta\text{Ct}$). Konečný výsledek qPCR byl získán vzorečkem $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ a vyjadřuje relativní množství mRNA ve vzorku v poměru k referenčnímu genu. Pro každé qPCR byla vyhodnocena statistická průkaznost na základě T testu. Hodnoty $p < 0,05$ byly považovány za signifikantní.

4 Výsledky

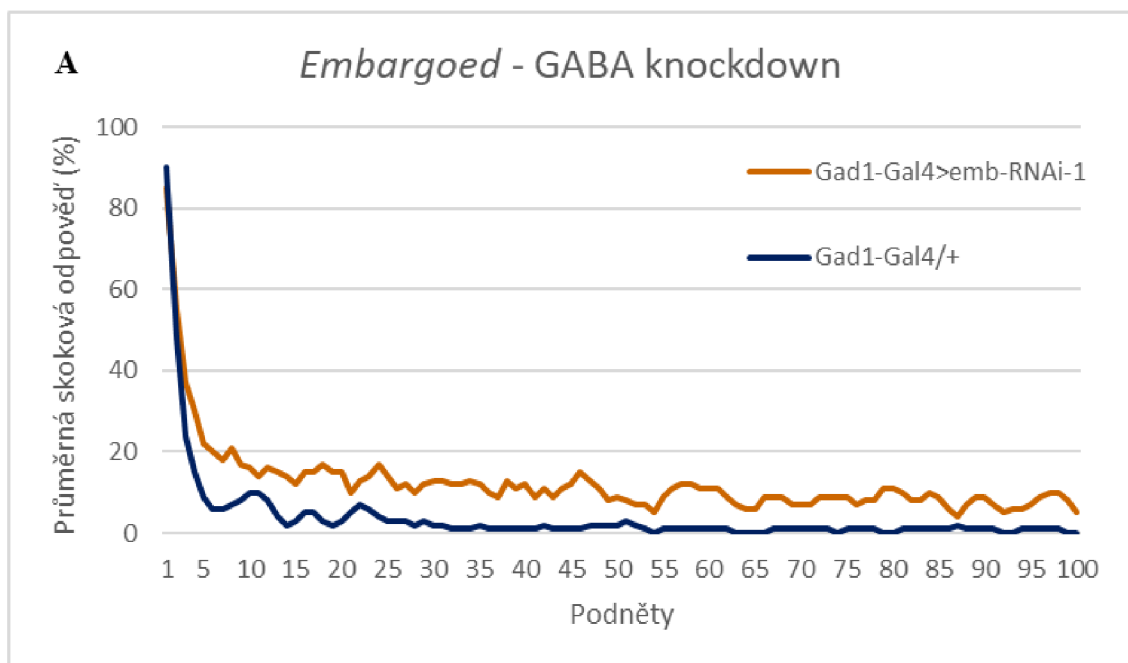
4.1 *Embargoed* – *XPO1*

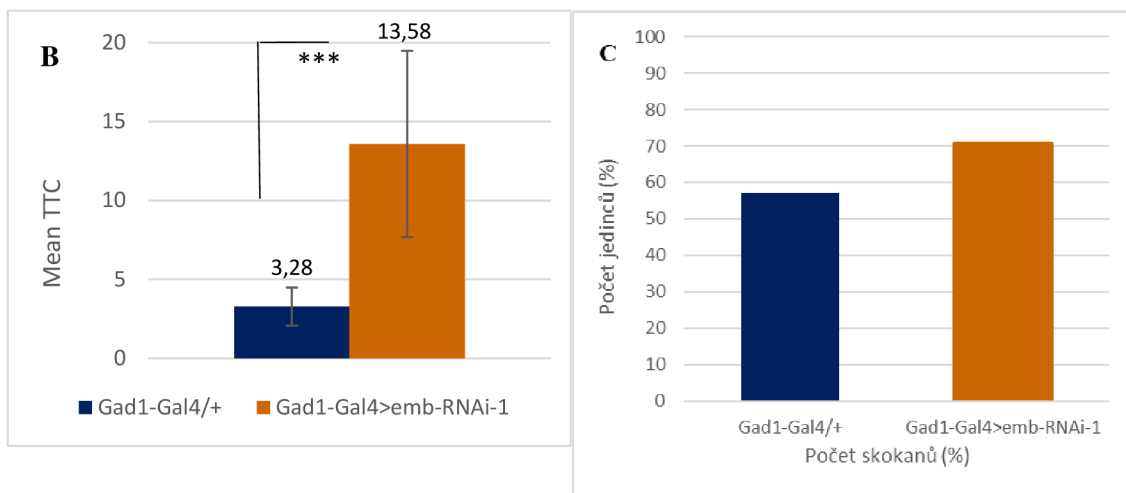
4.1.1 Měření habituace v nervové tkáni

Prvním zkoumaným genem byl gen *embargoed* (*emb*), sekvenční a funkční ortolog *XPO1*, který kóduje exportin. Podobnost aminokyselinové sekvence ortologů *emb* a *XPO1* je 82 %. Exportin hraje roli v exportu proteinů z jádra buňky, reguluje odpověď na hypoxii a je také zahrnut v replikaci centriol. Expres *XPO1* je kontrolována buněčným cyklem a podílí se na jeho řízení kontrolou lokalizace cyklinu B. Mezi další významné cargo proteiny patří MAPK a MAPKAP kináza 2a, malé jaderné RNA, konkrétně Rev a U snRNA (SFARI GENE, Q1, 2024). Gen *XPO1* najdeme v databázi SFARI GENE, která shromažďuje informace z vědeckých studií o lidských genech, které mají souvislost s PAS. Genům je přiřazeno skóre na základě daných pravidel a jsou rozděleny do kategorií označených značkou a krátkým popisem. Nejvyšší skóre, a tedy největší relevance ve spojitosti s PAS je označena písmenem S – syndromický (mutace spojené s významným stupněm rizika a s dalšími charakteristikami, které nejsou nutné k diagnostice PAS), dalším stupněm je kategorie 1 – vysoká důvěryhodnost (jednoznačná spojitost genu s PAS – obvykle se zmínkou v literatuře o nejméně 3 pravděpodobných de novo mutacích narušujících gen), dále kategorie 2 – silný kandidát (geny s dvěma hlášenými de novo gen narušujícími mutacemi, dosahující celogenomové významnosti nebo jejich riziková varianta má vliv na funkci genu) a nakonec kategorie 3 – naznačující důkazy (geny s jedinou de novo mutací pravděpodobně narušující gen, významné, ale nereplikované asociační studie nebo série vzácných dědičných mutací, pro které neexistuje statistické srovnání s kontrolami). Gen *XPO1* patří do kategorie 2. Podle záznamu ve SFARI GENE databázi delece 2p15-16.1 zapříčiňuje nový syndrom spojený se souborem fenotypových znaků, jakými jsou autismus, porucha intelektu, kraniofaciální/CNS dysmorfologie. *XPO1* může přispívat k PAS jak v případech delece 2p15-p16.1, tak i za okolností bez delece u PAS lokalizovaných na tuto oblast. Spolupracující laboratoře školitelky (Richard van Jaarsveld, University Medical Center Utrecht, Nizozemsko a Zdeněk Sedláček, 2. Lékařská fakulta, Karlova Univerzita) identifikovaly několik jedinců s PI a de novo patogenními mutacemi v genu *XPO1*, což naznačuje důležitou úlohu genu v kognitivní funkci.

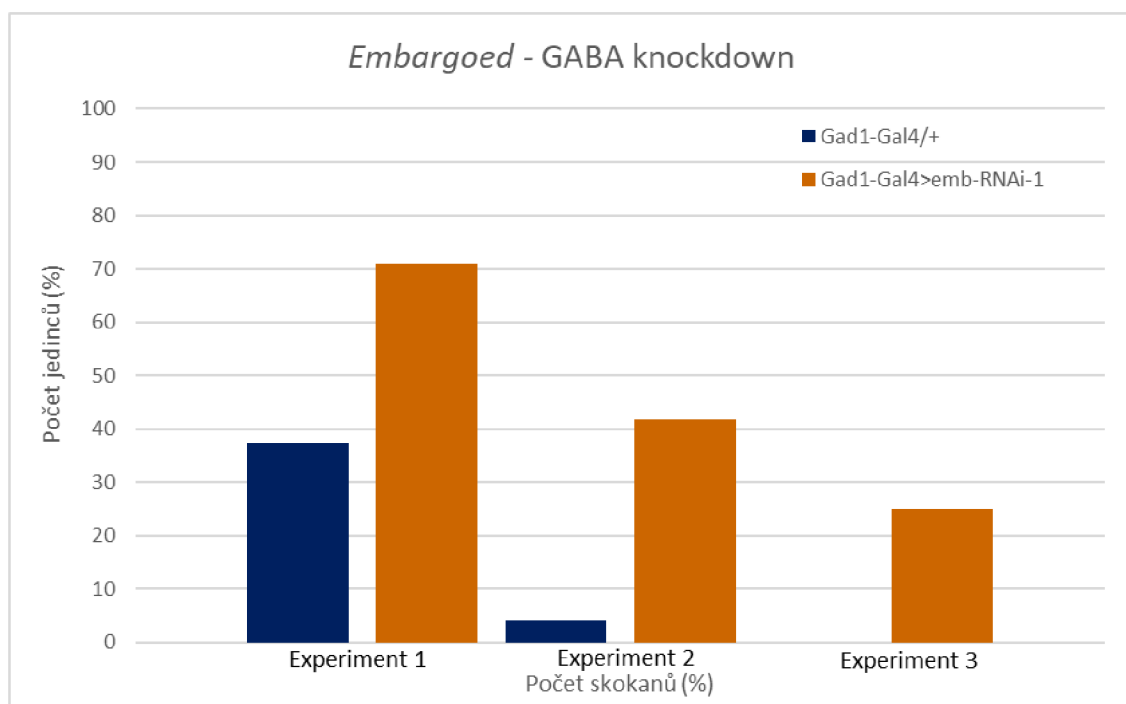
Lidský ortolog *XPO1* je tedy asociován s PAS/PI a potvrzení role v habituaci by mohlo poskytnout podpurný důkaz pro jeho roli v kognitivní funkci. Má školitelka již

provedla knockdown genu *emb* v nervových buňkách pomocí panneuronálního *elav-Gal4* driveru. Nicméně toto vedlo k předčasné letalitě a ověření funkce v habituaci nebylo možné. Protože většina genů kontroluje habituaci v inhibičních neuronech (Fenckova et al., 2019), rozhodla se zacílit knockdown pouze do inhibičních neuronů s pomocí *Gad1-Gal4* driveru. V případě *emb-RNAi-1* vedl knockdown k deficitu v habituaci (**Obr. 8**). Narozdíl od kontrolních much (*Gad1-Gal4/+*), potřebovali *emb-RNAi-1* mouchy (*Gad1-Gal4>emb-RNAi-1*) více light-off stimulů k habituaci a jejich skoková odpověď zůstala vyšší po celou dobu trvání experimentu. Tento výsledek je založen na základě dvou nezávislých opakování (N=48 much). Mým úkolem bylo zopakovat experiment s *emb-RNAi-1* a ověřit efektivitu knockdownu na habituaci. O měření habituace jsme se pokusila celkem třikrát – ve třech opakováních, která se uskutečnila ve třech různých dnech (**Obr. 9**). V případě *emb-RNAi-2* došlo GABA knockdownem k defektu v habituaci (**Obr. 11**). Tento výsledek je založen na základě třech nezávislých opakování (N=72 much). U obou RNAi jsem ověřila manipulace pomocí qPCR (**Obr. 12,13**).





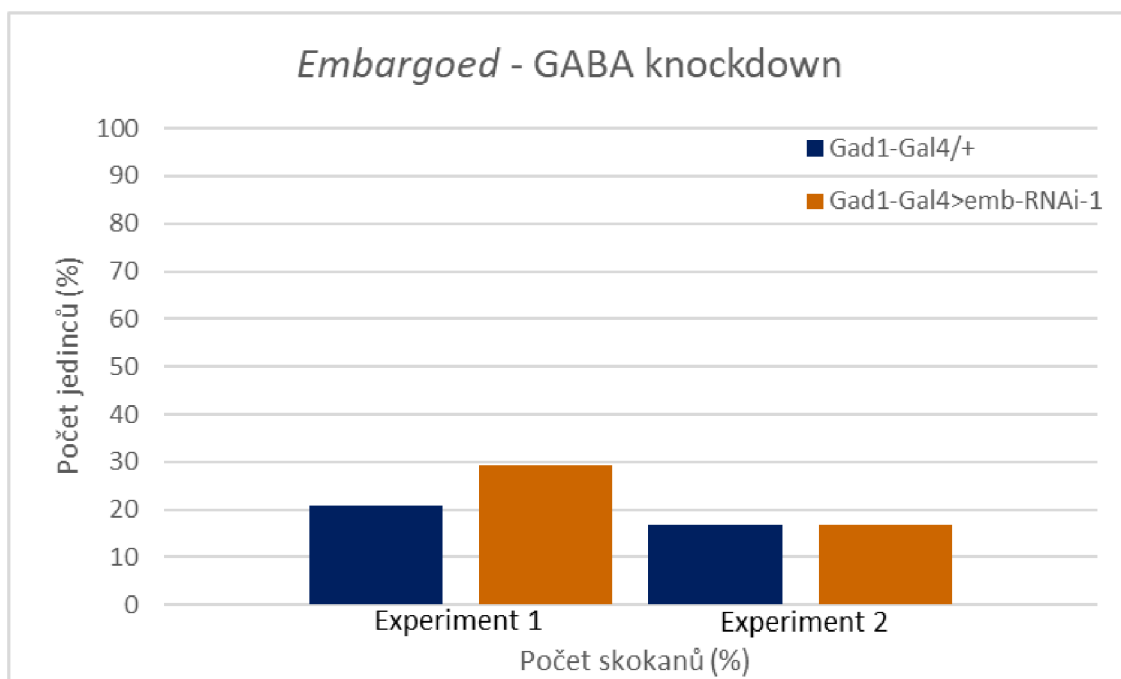
Obr. 8: Kombinované výsledky měření RNAi linie *Gad1-Gal4> emb-RNAi-1* a kontrolní *Gad1-Gal4/+*. Na ose X je počet podnětů, na ose Y průměrná skoková odpověď (%) (A). Oranžovou barvou jsou znázorněny odpovědi mutantních samců, modrou kontrolních. Hodnoty pro tento graf jsou 51 skokanů mutantních linií a 37 skokanů kontrolních z celkového počtu 72 jedinců z každé linie (C). Průměrná hodnota TTC je pro mutantní linii 13,58 s odchylkou (SEM) 5,9 a pro kontrolní 3,28 s odchylkou 1,21 (B). Hodnota $P=0,000$, $***p < 0,001$, $**p < 0,01$, $*p < 0,05$



Obr. 9: Výsledky měření RNAi linie *Gad1-Gal4> emb-RNAi-1* a kontrolní *Gad1-Gal4/+*. Hodnoty pro první experiment jsou *RNAi linie*: 17 skokanů a pro kontrolní: 9 skokanů z 24. Hodnota $P=0,003$. Hodnoty pro druhý experiment jsou pro *RNAi* linii 10 skokanů a pro kontrolní: 1 skokan z 24. Hodnota $P=NaN$. Hodnoty pro třetí experiment jsou pro *RNAi*: 6 skokanů a pro kontrolní žádný skokan. Hodnota $P=NaN$.

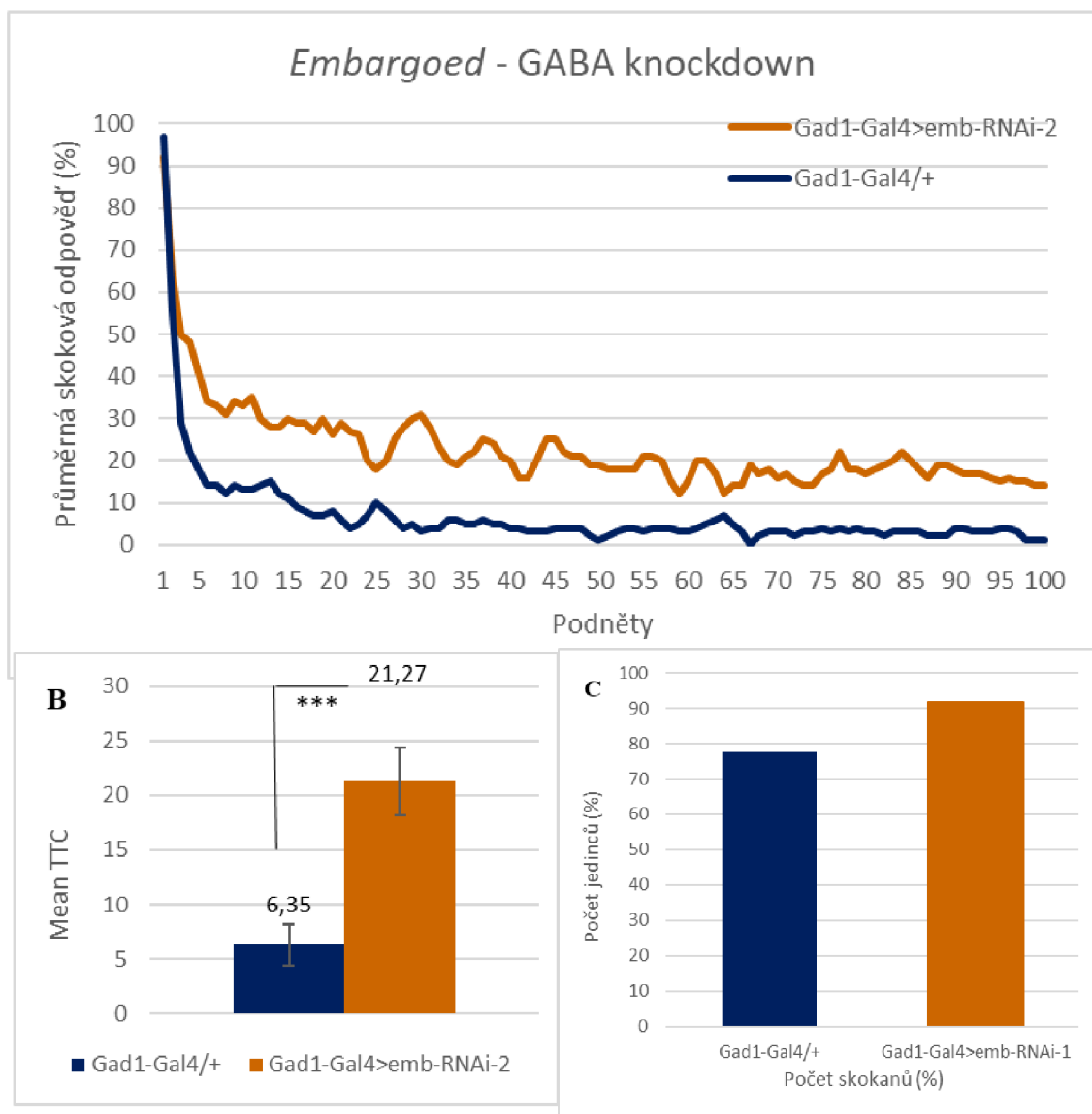
Během prvních tří experimentů byly zejména ve skupině kontrol pozorovány špatné počáteční reakce v podobě skokových odpovědí. Pro zhodnocení habituace je potřeba, aby během prvních pěti stimulů, odpovídalo alespoň 50 % much, což se v tomto případě u kontrol nestalo ani jednou. Habituace nešla vyhodnotit, TTC hodnoty pro jednotlivá měření jsou uvedena v **příloze 3**. Experiment jsem zopakovala. Znovu jsem zkřížila driver linie s *RNAi* a kontrolními liniemi a pokusila se je znovu otestovat

(Obr. 10). Pro křížení jsem použila jiný alikvót kontrolních drozofil (z jiné lahvičky) v případě, že by původní použitá populace nebyla dostatečně fit.



Obr. 10: Výsledky měření RNAi linie *Gad1-Gal4> emb-RNAi-1* a kontrolní *Gad1-Gal4/+*. Hodnoty pro první experiment jsou RNAi linie: 7 skokanů a pro kontrolní: 5 skokanů z 240,75. Hodnota $P=0,613$. Hodnoty pro druhý experiment jsou pro RNAi linii 4 skokani a pro kontrolní: 4 skokani z 24. Hodnota $P=0,161$.

Jedinci měli být opět testováni ve třech dnech, avšak kontrolní i RNAi linie vykazovaly špatnou skokovou odpověď (**Obr. 10**). Mušky byly testovány jak po ponechání v inkubátoru o 25 °C, tak po ponechání v pokojové teplotě. Ani tento rozdíl v teplotách během vývoje nehrál roli a kontrolní sada neskákala, nebylo tedy provedeno měření mutantních sad třetí den. Měření habituace se tedy, z důvodu nedostatečné skokové odpovědi kontrolních much, nepodařilo zopakovat, TTC hodnoty pro jednotlivá měření jsou uvedena v **příloze 4**.



Obr. 11: Kombinované výsledky měření RNAi linie *Gad1-Gal4> emb-RNAi-2* a kontrolní *Gad1-Gal4/+*. Na ose X je počet podnětů, na ose Y průměrná skoková odpověď (%) (A). Oranžovou barvou jsou znázorněny odpovědi mutantních samců, modrou kontrolních. Hodnoty pro tento graf jsou 66 skokanů mutantních linií a 56 skokanů kontrolních z celkového počtu 72 jedinců z každé linie (C). Průměrná hodnota TTC je pro mutantní linii 21,27 s odchylkou (SEM) 3,10 a pro kontrolní 6,35 s odchylkou 1,88 (B). Hodnota $P=0,000$. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$

4.1.2 Ověření efektivity manipulací – qPCR

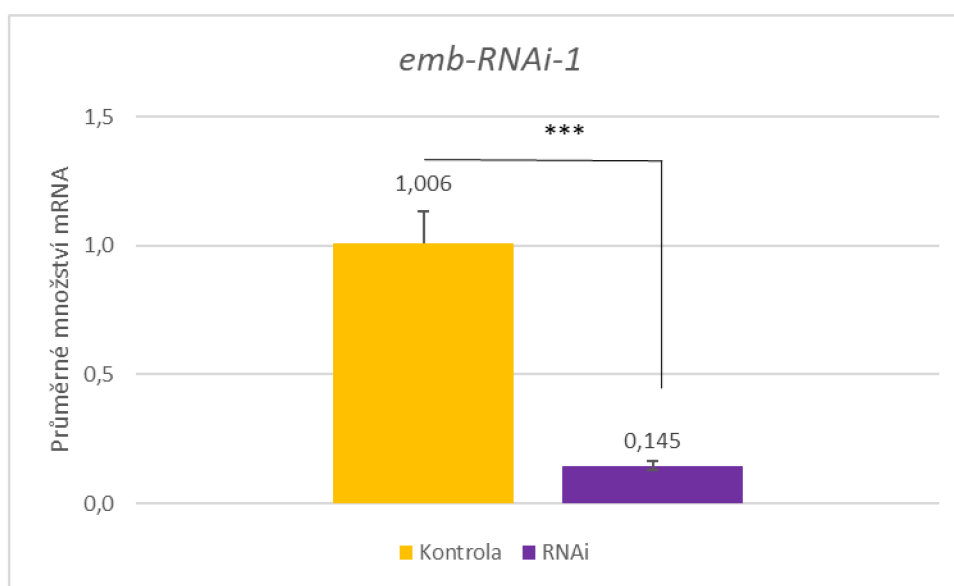
Kromě měření efektivity genetické manipulace na kognitivní dysfunkci pomocí testu habituace jsem měla za úkol ověřit efektivitu RNAi molekulárně pomocí qPCR a ověřit tak, že k defektu v habituaci dochází díky snížení exprese genu *emb*.

V **tabulce 2** jsou zaznamenány linie křížení, jejichž potomci byli použiti pro ověření manipulace RNA interferencí pomocí qPCR. Larvy pocházely z křížení *Gal4* driver linie ovládané aktinovým promotorem a specifických RNAi linií proti genu *emb*. Knockdown je v **tabulce 2** označen jako všeobecný, protože je použit aktinový promotor, který je exprimován ve všech typech buněk. U obou linií byl prokázán rozdíl v expresi

mezi referenčním a cílovým genem oproti kontrolní linii. Referenčním genem pro porovnání účinnosti manipulace byl gen *RP49*. *RP49* je značkou pro ribozomální protein 49, který kóduje proteinovou složku ribozomů. *RP49* je často používán jako referenční gen pro jeho stabilní expresi napříč různými vývojovými stádii drozofil.

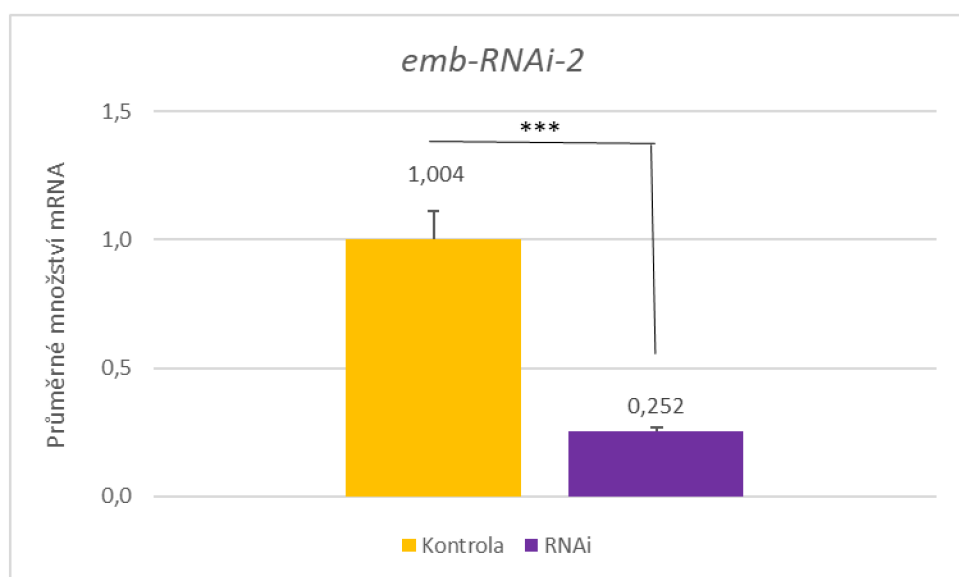
Účinnost knockdownu u *emb-RNAi-1* byla 86 % ($P=0,000$) a u *emb-RNAi-2* 75 % ($P=0,000$) (**Obr 12, 13**). Výsledné hodnoty z qPCR jsou uvedeny v **příloze 5,6**.

1. *emb-RNAi-1*



Obr. 12: Graf hodnoty $2^{-\Delta\Delta Ct}$ pro *emb-RNAi-1*, kde $\Delta\Delta Ct$ vyjadřuje ΔCt testovaného vzorku – ΔCt kontrolního vzorku. ΔCt testovaného vzorku je rozdíl mezi hodnotami Ct cílového genu (*embargoed*) a Ct referenčního genu (*Rp49*). Žlutě je zvýrazněné průměrné množství mRNA pro kontrolní vzorky *act-Gal4/+* a fialově pro vzorky mutantní *act-Gal4> emb-RNAi-1*. Účinnost 86 %. T test = 0,000. Referenční gen *Rp49*. *** $p < .001$, ** $p < .01$, * $p < .05$

2. *emb-RNAi-2*



Obr. 13: Graf hodnoty $2^{-\Delta\Delta Ct}$ pro *emb-RNAi-2*, kde $\Delta\Delta Ct$ vyjadřuje ΔCt testovaného vzorku – ΔCt kontrolního vzorku. ΔCt testovaného vzorku je rozdíl mezi hodnotami Ct cílového genu (*embargoed*) a Ct referenčního genu (*Rp49*). Žlutě je zvýrazněné průměrné množství mRNA pro kontrolní vzorky *act-Gal4/+* a fialově pro vzorky po RNAi *act-Gal4>emb-RNAi-2*. Účinnost 75 %. T test = 0,000. Referenční gen *Rp49*. *** $p < .001$, ** $p < .01$, * $p < .05$

4.2 *Puffyeeye* – *USP34*

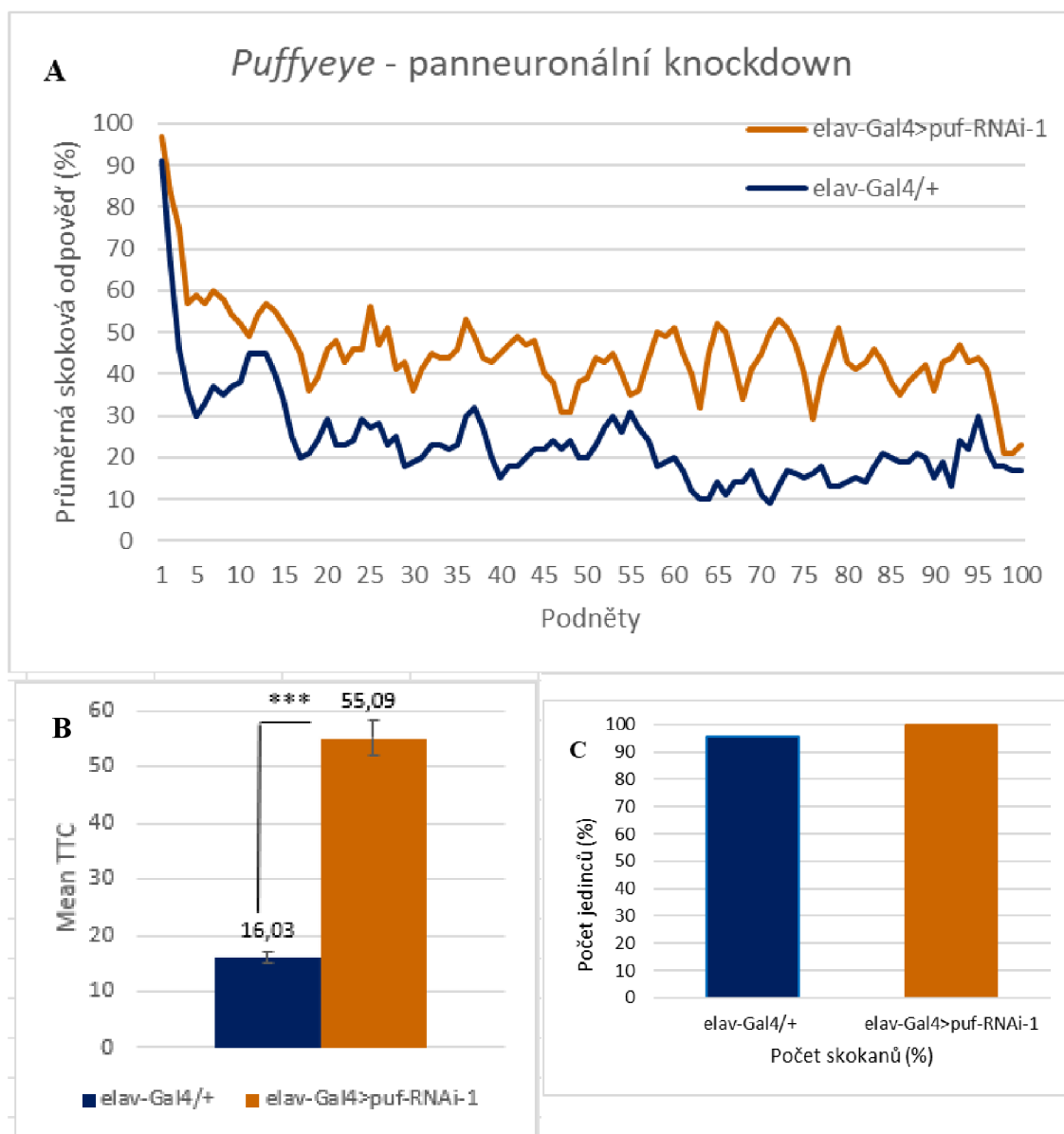
4.2.1 Měření habituace v nervové tkáni

Druhým zkoumaným genem byl sekvenční a funkční ortolog lidského genu *USP34* s označením *puf* neboli *puffyeeye*. Podobnost aminokyselinové sekvence ortologů *puf* a *USP34* je 53 %. Jde o gen kódující protein – konkrétně deubikvitinační enzym, který působí jako ubikvitin specifická proteáza, má tedy schopnost odstranit řetězce nebo molekuly ubikvitinu z cílového proteinu. Tímto způsobem může chránit protein před degradací, modulovat jeho aktivitu a hraje významnou roli v buněčných signálních drahách (FlyBase, FB2024_01). Lidský ortolog, *USP34* umožňuje endopeptidázovou aktivitu a thiol-dependentní deubikvitinázu. Jeho předpokládaná aktivita je v cytosolu a v jádře (NCBI).

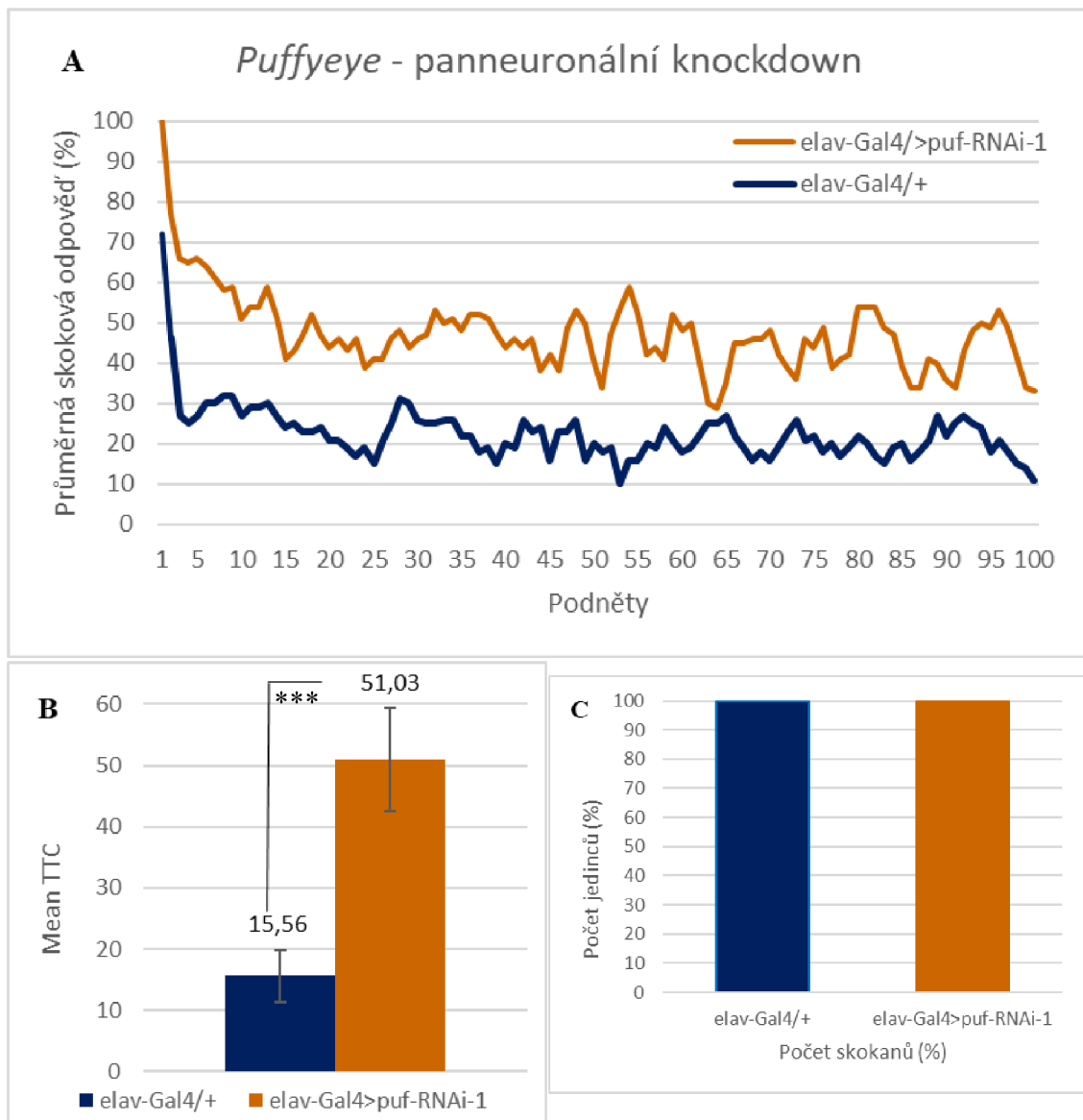
Gen *USP34* je dalším kandidátním genem pro PI, a snížení jeho exprese by mohlo přispívat k deficitu v habituacím učení. Podobně jako u genu *XPO1* porozumění jeho role v spojitosti s PAS/PI a deficitu v habituaci by mohlo vést k lepšímu porozumění a přístupu k diagnostice pacientů s PAS/PI. Proto jsem u drozofilního ortologu *puffyeeye* testovala efekt na habituaci po manipulaci panneuronálním knockdownem. Pro křížení

byly použity u panneuronálního knockdownu dvě RNAi linie proti genu *puffyye* (Tab. 2).

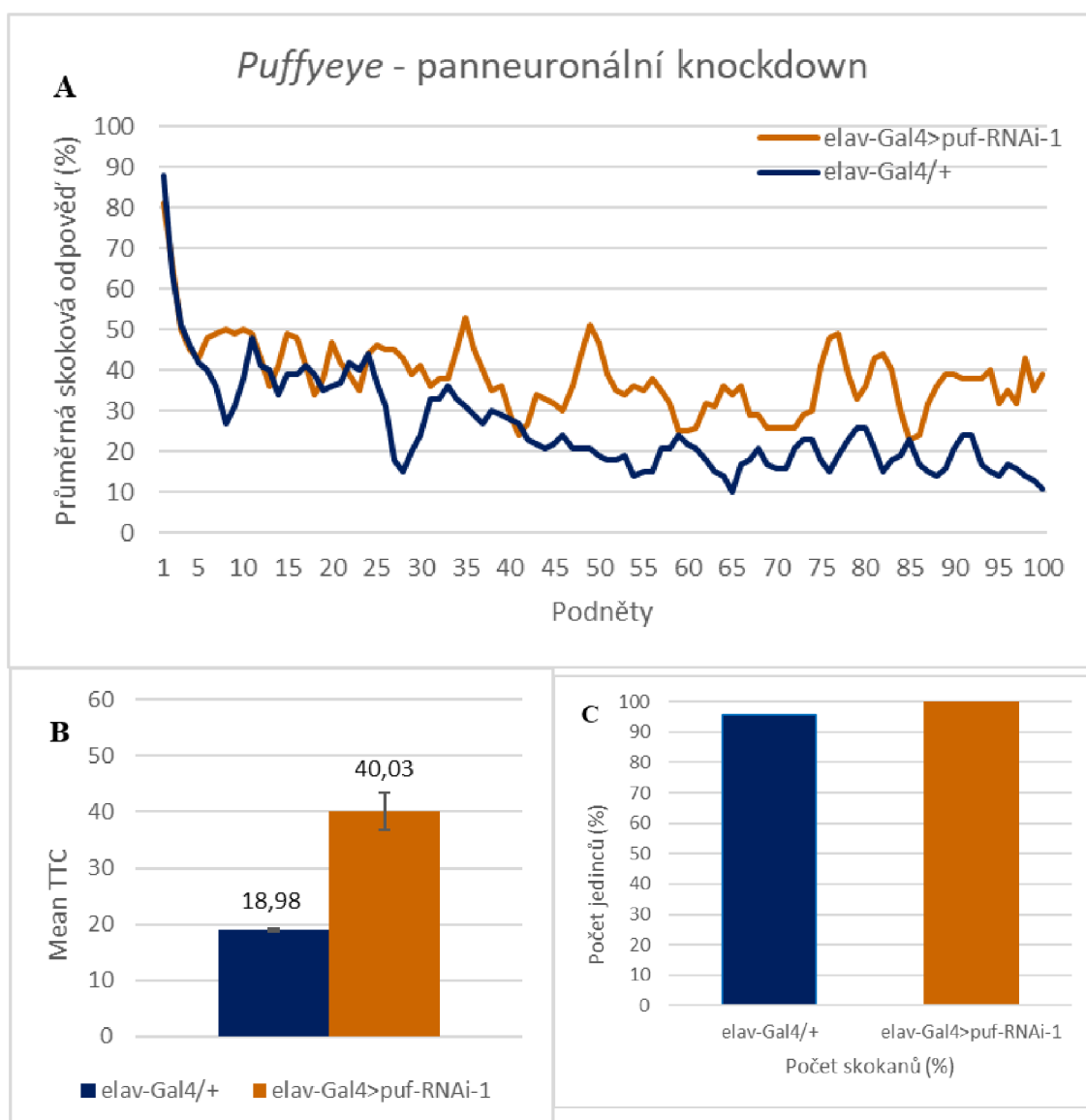
První testovanou linií byla RNAi linie *puf-RNAi-1* (*elav-Gal4>puf-RNAi-1*). Jako kontrolní linie byla na křížení použita kontrolní linie (*elav-Gal4/+*). Výsledné grafy jsou ze třech různých nezávislých měření během tří dnů, pokaždé s jinou skupinou samců daného křížení (Obr. 14, 15, 16).



Obr.14: Výsledky měření RNAi linie *elav-Gal4>puf-RNAi-1* a kontrolní *elav-Gal4/+*. Na ose X je počet podnětů, na ose Y průměrná skoková odpověď (%) (A). Oranžovou barvou jsou znázorněny odpovědi mutantních samců, modrou kontrolních. Hodnoty pro tento graf jsou 24 skokanů z RNAi linie a 23 skokanů kontrolní linie (C), průměrná TTC hodnota pro RNAi linii 55,09, s odchylkou (SEM) 3,22, pro kontrolní 16,03 s odchylkou 0,97 (B) a hodnota $P=0,000$. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$



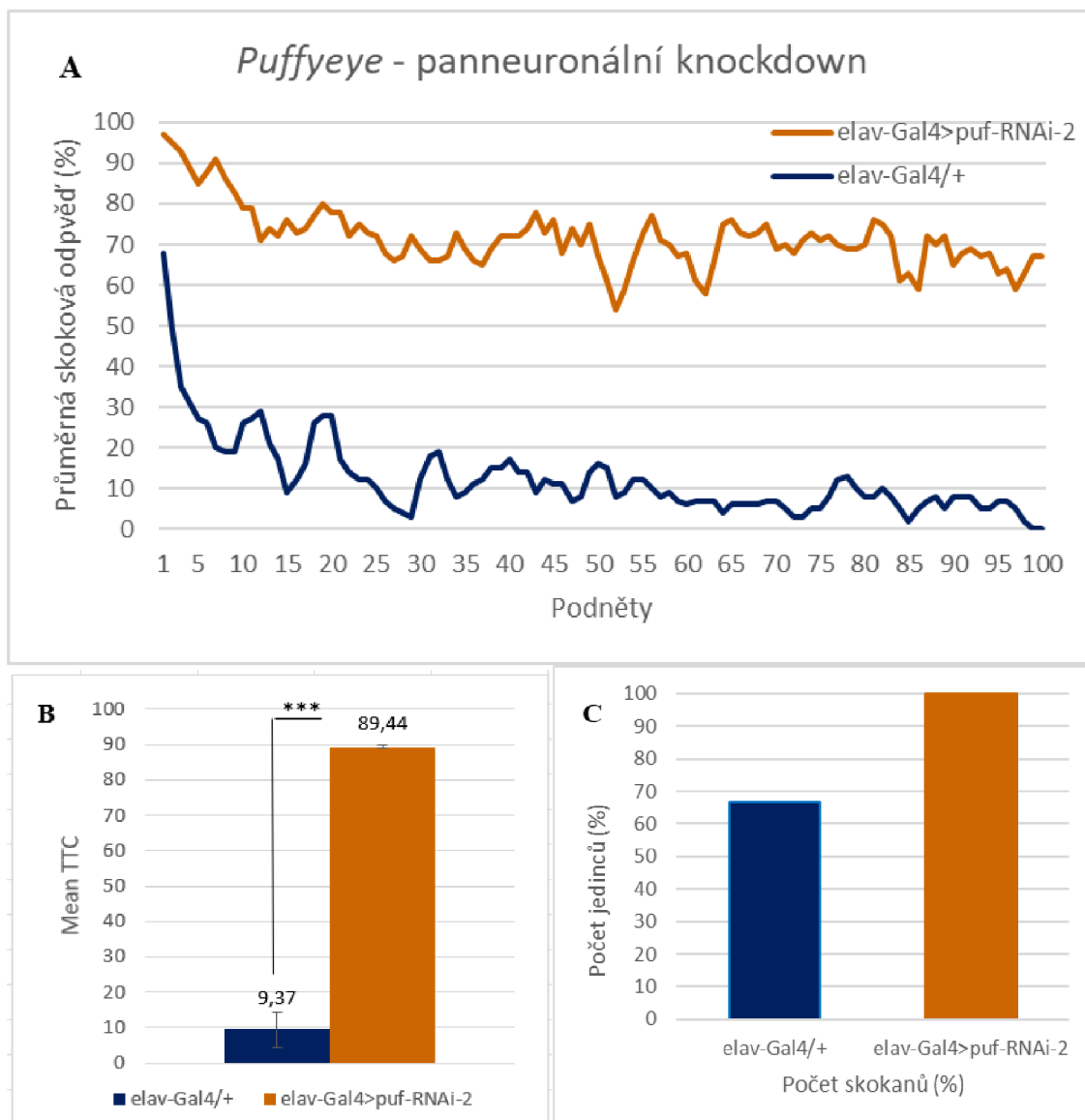
Obr. 15: Výsledky měření RNAi linie *elav-Gal4>puf-RNAi-1* a kontrolní *elav-Gal4/+*. Na ose X je počet podnětů, na ose Y průměrná skoková odpověď (%) (A). Oranžovou barvou jsou znázorněny odpovědi mutantních samců, modrou kontrolních. Hodnoty pro tento graf jsou 24 skokanů RNAi linie a 24 skokanů z kontrolní (C), průměrná TTC hodnota pro RNAi linii 51,03 s odchylkou (SEM) 8,47, pro kontrolní linii 15,56 s odchylkou 4,19 (B) a hodnota $P=0,000$. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$



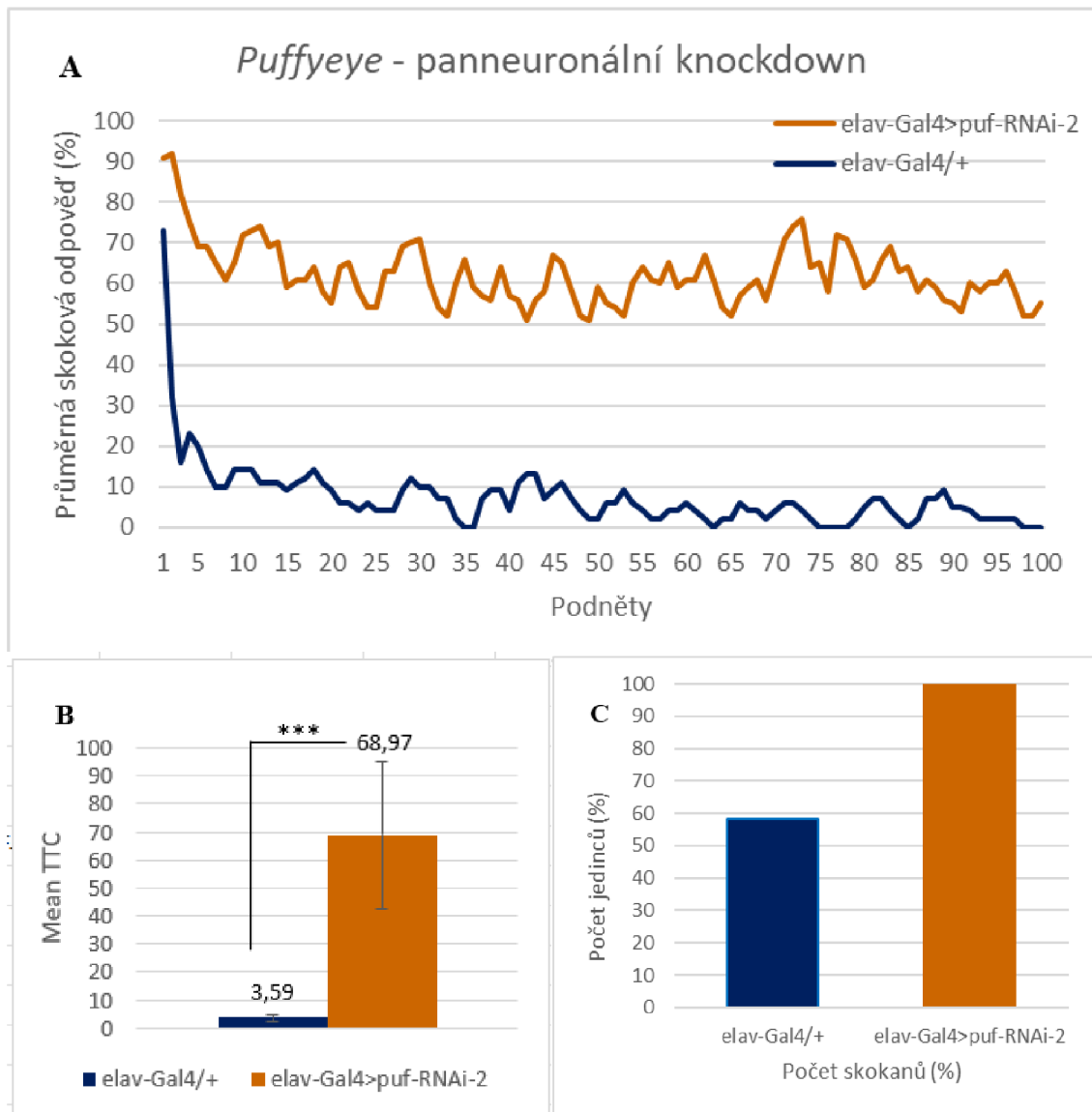
Obr. 16: Výsledky měření RNAi linie *elav-Gal4>puf-RNAi-1* a kontrolní *elav-Gal4/+*. Na ose X je počet podnětů, na ose Y průměrná skoková odpověď (%) (A). Oranžovou barvou jsou znázorněny odpovědi mutantních samců, modrou kontrolních. Hodnoty pro tento graf jsou 24 skokanů RNAi linie a 23 skokanů kontrolní (C), průměrná TTC hodnota pro RNAi linii 40,03 s odchylkou (SEM) 3,34, pro kontrolní 18,98 s odchylkou 0,27 (B) a hodnota $P=0,222$.

Pro panneuronální knockdown genu *puf* s *puf-RNAi-1* (*elav-Gal4>puf-RNAi-1*) byly získány dobré skokové odpovědi pro vyhodnocení měření. U mutantní linie bylo zaznamenáno každý den měření habituace 100 % skokových odpovědí. U kontrolní linie skákalo první a třetí den 23 z 24 jedinců a druhý den měření dokonce 24 samců. Průkazně vyšla první dvě měření na hladině pravděpodobnosti $P=0,000$. Třetí test vyšel neprůkazně na hladině pravděpodobnosti $P=0,222$. Hodnoty TTC pro mutantní linie prvních dvou dní vyšly 55,09 a 51,03. Kontrolní linie (*elav-Gal4/+*) se habituovaly na TTC hodnotě 15,56 a 16,03. Z těchto hodnot vyplývá deficit v habituaci.

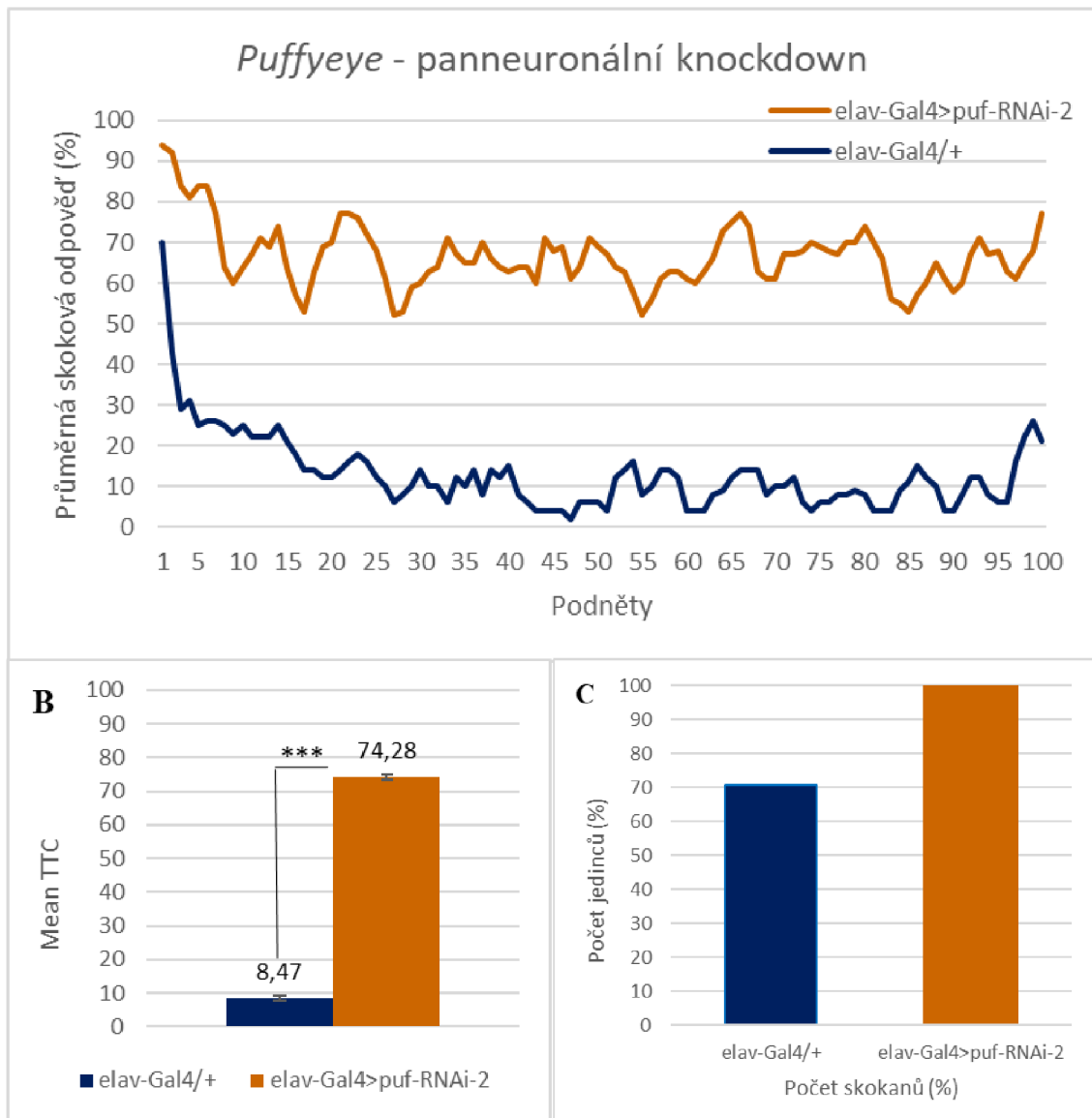
Jako druhá RNAi linie proti genu *puf* pro panneuronální knockdown byla testována linie *puf-RNAi-2* (*elav-Gal4>puf-RNAi-2*) s příslušnou kontrolou (*elav-Gal4/+*) (Obr. 17,18,19).



Obr.17: Výsledky měření RNAi linie *elav-Gal4>puf-RNAi-2* a kontrolní *elav-Gal4/+*. Na ose X je počet podnětů, na ose Y průměrná skoková odpověď (%) (A). Oranžovou barvou jsou znázorněny odpovědi mutantních samců, modrou kontrolních. Hodnoty pro tento graf jsou 24 skokanů RNAi linie a 16 skokanů kontrolní (C), průměrná TTC hodnota pro RNAi linii 89,44 s odchylkou (SEM) 0,31, pro kontrolní 9,37 s odchylkou 5,03 (B) a hodnota $P=0,000$. *** $p < .001$, ** $p < .01$, * $p < .05$



Obr.18: Výsledky měření RNAi linie *elav-Gal4> puf-RNAi-2* a kontrolní *elav-Gal4/+*. Na ose X je počet podnětů, na ose Y průměrná skoková odpověď (%) (A). Oranžovou barvou jsou znázorněny odpovědi mutantních samců, modrou kontrolních. Hodnoty pro tento graf jsou 24 skokanů pro RNAi linii a 14 skokanů pro kontrolní (C), průměrná TTC hodnota pro RNAi linii 68,97 s odchylkou (SEM) 26,34, pro kontrolní 3,59 s odchylkou 1,19 (B) a hodnota $P=0,000$. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$



Obr.19: Výsledky měření RNAi linie *elav-Gal4>puf-RNAi-2* a kontrolní *elav-Gal4/+*. Na ose X je počet podnětů, na ose Y průměrná skoková odpověď (%) (A). Oranžovou barvou jsou znázorněny odpovědi mutantních samců, modrou kontrolních. Hodnoty pro tento graf jsou 24 skokanů pro RNAi linii a 17 skokanů pro kontrolní (C), průměrná TTC hodnota pro RNAi linii 74,28 s odchylkou (SEM) 0,72, pro kontrolní 8,47 s odchylkou 0,97 (B) a hodnota $P=0,000$. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$

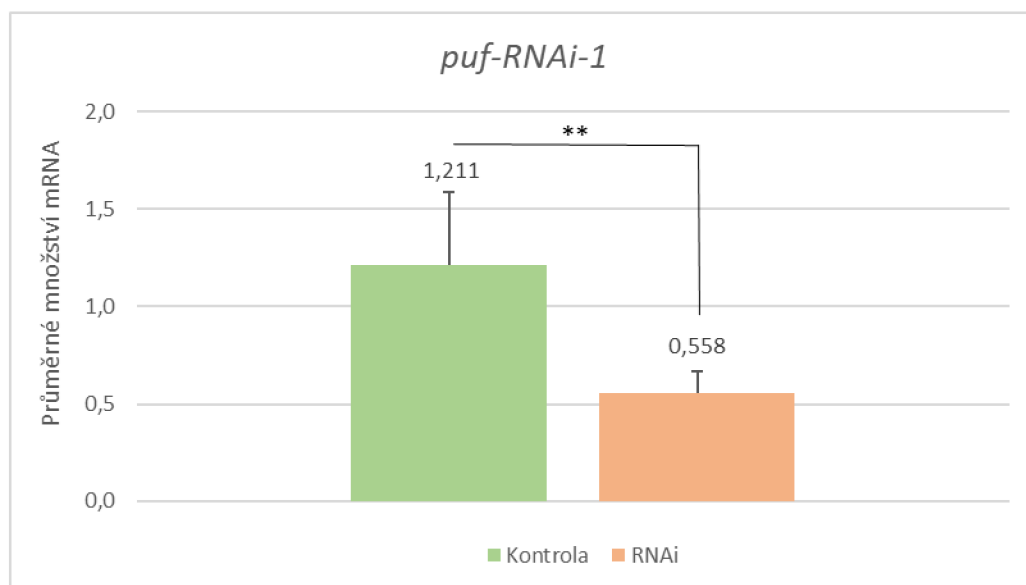
Úspěšnost skokových odpovědí pro knockdown (*elav-Gal4>puf-RNAi-2*) byla 100%. Kontrolní linie *elav-Gal4/+* vykazovaly vždy alespoň 50% skokových odpovědí. Všechna měření vyšla průkazně na hladině pravděpodobnosti $P=0,000$. Velké rozdíly mezi TTC hodnotami kontrolních a mutantních linií ukazují na deficit v habituaci.

4.2.2 Ověření efektivity manipulací – qPCR

Pro gen *puf* byly vybrány k otestování pomocí qPCR dvě RNAi linie testované na habituaci a k nim příslušné kontrolní linie (Tab. 2). Všechny linie byly zkřížené s dvěma různými *act-Gal4* liniemi a křížení byla umístěna do inkubátorů o teplotách 25 °C a 29 °C, pro získání co nejefektivnějšího knockdownu. Je známo, že *act-Gal4* s číslem

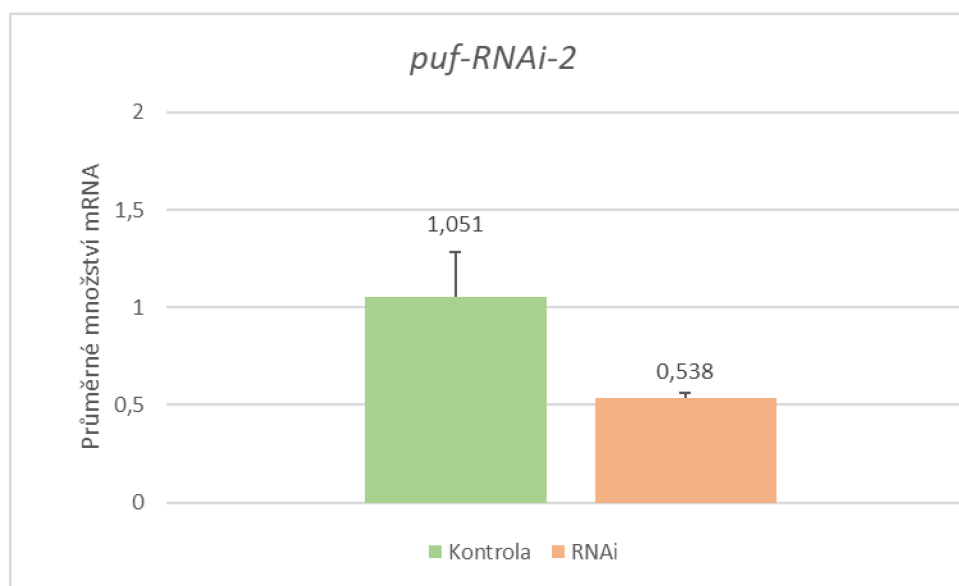
1403 (*act/CyOGFP*) je silnější než *act-Gal4* s číslem 1285 (*act-Gal4/TM6B*) (**Tab. 1**) a vyšší teplota znamená silnější knockdown. Podařilo se sesbírat 3 vzorky o 3 larvách z křížení s *act-Gal4/TM6B* a všechny z inkubace při 29 °C. Vybrané larvy byly důkladně prohlédnuty pod mikroskopem, a pouze ty, které neobsahovaly fenotypový marker pro přítomnost TM balanceru - *Tb* (menší a širší larvy), a obsahovaly tedy RNAi inzerce, byly použity. Jako referenční geny byly použity *aktin* a *Polr2A*. Tyto geny jsou považovány za takzvané „housekeeping“ geny. Ty jsou stabilně exprimovány ve většině typech buněk a během různých podmínek. Účinnost knockdownu u *a* a u *puf-RNAi-1* byla 54 % ($P=0,003$) a u *puf-RNAi-2* 49 % ($P=0,019$) (**Obr. 20, 21**). Výsledné hodnoty z qPCR jsou uvedeny v **příloze 7,8**.

1. *puf-RNAi-1*



Obr. 20: Graf hodnoty $2^{-\Delta\Delta Ct}$ pro *puf-RNAi-1*, kde $\Delta\Delta Ct$ vyjadřuje ΔCt testovaného vzorku – ΔCt kontrolního vzorku. ΔCt testovaného vzorku je rozdíl mezi průměrem hodnot Ct cílového genu (*puf*) a průměrem Ct referenčních genů (*Aktin*, *Polr2A*). Zeleně je zvýrazněné průměrné množství mRNA pro kontrolní vzorky *act-Gal4/+* a růžově pro vzorky po RNAi *act-Gal4>puf-RNAi-1*. Účinnost 54 %. T test = 0,003. Referenční geny *Aktin*, *Polr2A*. *** $p < .001$, ** $p < .01$, * $p < .05$

2. *puf-RNAi-2*



Obr. 21: Graf hodnoty $2^{-\Delta\Delta Ct}$ pro *puf-RNAi-2*, kde $\Delta\Delta Ct$ vyjadřuje ΔCt testovaného vzorku – ΔCt kontrolního vzorku. ΔCt testovaného vzorku je rozdíl mezi průměrem hodnot Ct cílového genu (*puf*) a průměrem Ct referenčních genů (*Aktin*, *Pol2*). Zeleně je zvýrazněné průměrné množství mRNA pro kontrolní vzorky *act-Gal4/+* a růžově pro vzorky po RNAi ;*act-Gal4> puf-RNAi-2*. Účinnost 49 %. T test = 0,019. Referenční geny *Aktin*, *Polr2A*. ***p <.001, **p <.01, *p <.05

4.3 Manipulace a test habituace genů exprimovaných v imunitní tkáni

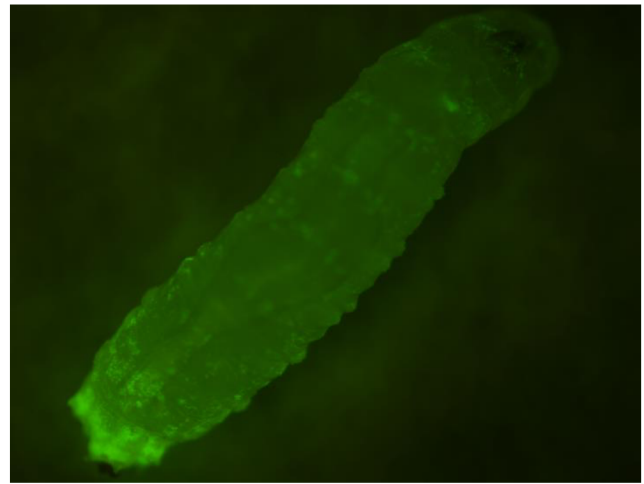
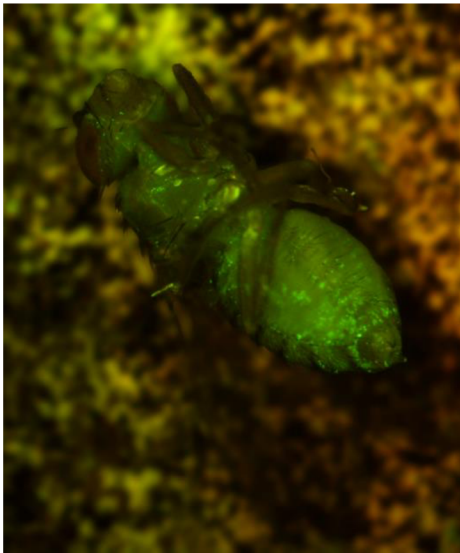
Má školitelka ve své předešlé práci analyzovala expresi 97 genů asociovaných s deficitem v habituaci v imunitní a tukové tkáni. Zjistila, že 82 z těchto genů je exprimováno alespoň v jedné z těchto tkání. Navíc exprese 32 genů se zvyšuje během infekce, a to hlavně v hemocytech, hlavních buňkách imunitního systému drozofily. To může naznačovat roli těchto genů v imunitní odpovědi. PAS/PI jedinci s mutacemi v 33 genech trpí alespoň jedním z následujících příznaků: obezita, metabolické, endokrinní či imunologické abnormality (Fenckova, nepublikováno). Mým cílem bylo zaměřit se na geny, které patří do obou těchto skupin, (1) jsou asociované u pacientů s PAS/PI s některým z uvedených příznaků a zároveň (2) se jejich exprese v imunitních buňkách při jejich aktivaci zvyšuje. Tyto geny jsem manipulovala pomocí RNAi anebo overexprese (v případě, že jejich mutace u jedinců s PI/PAS zvyšuje funkci proteinu) a testovala vliv na kognitivní funkci pomocí habituace na zhasnutí světla („light off jump“ habituace).

V mém výzkumu jsem se zaměřila na manipulaci 12 genů v imunitní tkáni. Gen *G9a* kóduje histon-lysin metyltransferázu podílející se na epigenetické regulaci. Mimo genové exprese, lokomočním chování larev se také podílí na krátko- a dlouhodobé

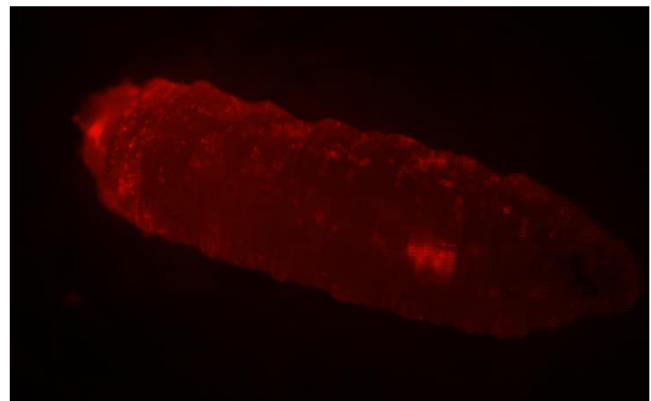
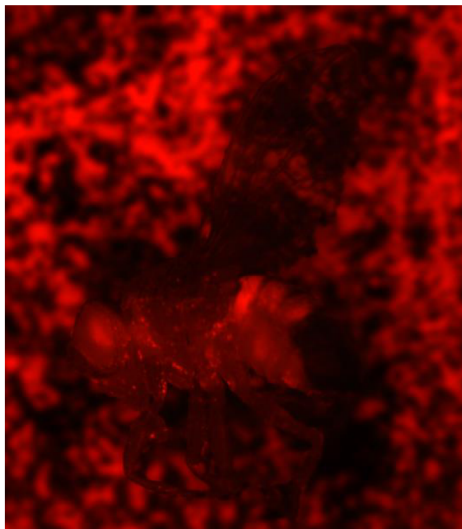
paměti. Lidský ortolog *EHMT1* kóduje protein histonmetyltransferázu, která je součástí komplexu potlačující transkripci. V databázi SFARI GENE se řadí do kategorií 1 a S v souvislosti s PAS/PI a jeho poruchy jsou příčinou Kleefstra syndromu. Gen *Ras* hraje významnou roli v regulaci buněčného růstu. Jedná se o GTPázu, která s navázáním GTP použije fosfát na fosforylaci dalších proteinů, zejména proteinu RAF, čímž řídí buněčnou proliferaci. Lidský ortolog *KRAS/HRAS* kóduje GTP vázající protein, v SFARI GENE databázi se řadí do kategorie 1 a je asociovaný s PAS/PI a syndromem Costello. Produkt genu *Csw*, tyrozinofosfatáza přispívá k regulaci růstu, přežívání buněk a vývoji. Lidský ortolog *PTPN11* kóduje protein tyrozin fosfatázu, která je široce exprimována a hraje regulační funkci v signálních drahách například pro řízení metabolismu nebo regulace transkripcí. Mimo jiné reguluje *Ras*. V databázi SFARI GENE spadá do kategorie 1S a jeho mutace jsou ve spojitosti s PAS/PI příčinou tzv. Noonanova syndromu a akutní myeloidní leukémie. Předpokládané funkce pro gen *CG14882* jsou – umožnění reductázové aktivity a podílení se na biosyntéze methioninu. Lidský ortolog *MTRR* se v SFARI databázi nenachází, ale je zaznamenán v databázi SysNDD, odborné databázi shromažďující informace o vztazích mezi geny a NP, primárně zaměřené na PI geny (<https://sysndd.dbmr.unibe.ch/>). *MTRR* je zde asociován s homocysteinurií se závažnými až smrtelnými klinickými symptomy včetně běžného výskytu opožděného vývoje. Gen *Gkl* umožňuje aktivitu glycerol kinázy. Lidský ortolog *GK* kóduje protein hrající roli v metabolismu glycerolu. Nedostatek glycerol kinázy je v databázi SysNDD zaznamenán ve spojitosti s opožděným vývojem a PI u dětí. Gen *Gale* kóduje enzym přispívající ke katabolismu galaktózy a hemopoéze larválních lymfatických žláz. Lidský ortolog *GALE* kóduje UDP-galaktózu-4-epimerázu a jeho deficit je podle SysNDD databáze spojen mimo jiné klinické příznaky i s opožděným fyzickým a kognitivním vývojem a poruchami učení. Gen *Galt* kóduje enzym, který přispívá k homeostáze galaktózy a lokomoci dospělců. Lidský ortolog *GALT* katalyzuje druhý krok Leloirovy dráhy metabolismu galaktózy. Absence tohoto enzymu zapříčiňuje galaktosémii a může být fatální pro novorozence, pokud nedojde k navození bezlaktózové diety. V databázi SysNDD jsou s galaktosémií zaznamenány klinické příznaky jako problémy s řečí, kognitivní poruchy či PI (>40 %). Gen *Cbs* kóduje enzym podílející se na reakci endoplazmatického retikula (ER) na stres. Lidský ortolog *CBS* katalyzuje přeměnu homocysteinu na cystathionin. Defekty tohoto genu mohou způsobit nedostatek cystathionin beta-syntázy, což může vést k homocystinurii, která je podle SysNDD asociována mimo jiné s opožděním ve vývoji a PI. Gen *PEK* kóduje kinázu

transmembrány ER a komponenty účastníci se stresové odpovědi. Předpokládá se, že lidský ortolog *EIF2AK3* kóduje protein modulující funkci mitochondrií. Mutace genu *EIF2K3* jsou spojeny s Wolcott-Rallisonovým syndromem doprovázeným jaterní dysfunkcí, u některých pacientů jsou zaznamenány PI nebo opožděný vývoj (SysNDD). Předpokládá se, že gen *Alg1* se podílí na glykosylaci proteinů, jeho aktivita je zaznamenána v ER. Lidský ortolog *ALG1* kóduje enzym katalyzující první krok v biosyntéze oligosacharidů vázaných na lipidy. Mutace *ALG1* vedou k vrozené poruše glykosylace. V databázi SysNDD je záznam o 4 postižených jedincích, kteří vykazovali mimo jiné závažné opoždění vývoje, hypotonii, kardiomyopatii či imunodeficit, u 2 jedinců zaznamenána mozková atrofie. Gen *Scu* kóduje mitochondriální protein, který je součástí komplexu k štěpení mitochondriální tRNA. Lidský ortolog *HSD17B10* kóduje mitochondriální protein katalyzující oxidaci mastných kyselin a steroidů a podílí se na maturaci tRNA. Aktivita tohoto proteinu byla zaznamenána při vzniku Alzheimerovy choroby. SysNDD se zmiňuje o ~30 pacientech s dědičnými nebo *de novo* mutacemi tohoto genu spojenými s rysy jako ztráta zraku/sluchu, metabolická/mléčná acidóza vývojová regrese a neurodegenerace, PI, heterozygotní ženy vykazují neprogresivní opoždění vývoje a PI, ale mohou být i asymptomatické. Gen *CG6287* je exprimován v hlavě, srdci a organismu dospělého a předpokládá se, že umožňuje aktivitu fosfoglycerát hydrogenázy. Lidský ortolog *PHGDH* kóduje enzym podílející se na syntéze L-serinu a podílí se na Neulaxova 1 syndromu, poruše metabolismu aminokyselin a nedostatku fosfoglycerát dehydrogenázy (SysNDD). Mutace genu jsou spojeny mimo jiné s vrozenou mikrocefalií a psychomotorickou retardací.

Pro experimenty s těmito geny bylo mým úkolem vytvořit novou linii s *crq-Gal4* pro manipulaci genů v imunitní tkáni, aby obsahovala inzerci *GMR-wIR* pro bílou barvu očí. Podařilo se mi zkřížit linie podle navrženého schématu (**Obr. 3**) a vytvořit tento požadovaný genotyp. Přítomnost *Gal4* driveru jsem potvrdila zkřížením s liniemi nesoucími *GFP* a *mCherry* (**Tab. 3**). Pozorovala jsem, že mušky nesoucí *Gal4* protein pod fluorescenčním mikroskopem emitovaly zelené nebo červené světlo (**Obr. 22, 23**). Nově vytvořená linie předtím, než jsem ji stihla použít pro další experimenty, byla v inkubátoru, ne mojí vinnou, kontaminovaná. Kvůli experimentům bylo potřeba rychle použít nový driver. Dostala jsem linii *w⁺; Hml-Gal4; 2xGMR-wIR-1/3-172/1*, která byla vybrána v závislosti na jiných experimentech.



Obr. 22: Fotografie dospělé a larvy pod fluorescenčním mikroskopem po zkřížení linie 9461: w^{1118} ; *GMR-wIR-3/2-25/1/CyO*; *crq-Gal4/TM6, Ubx* s GFP. Potvrzení přítomnosti *Gal4*.



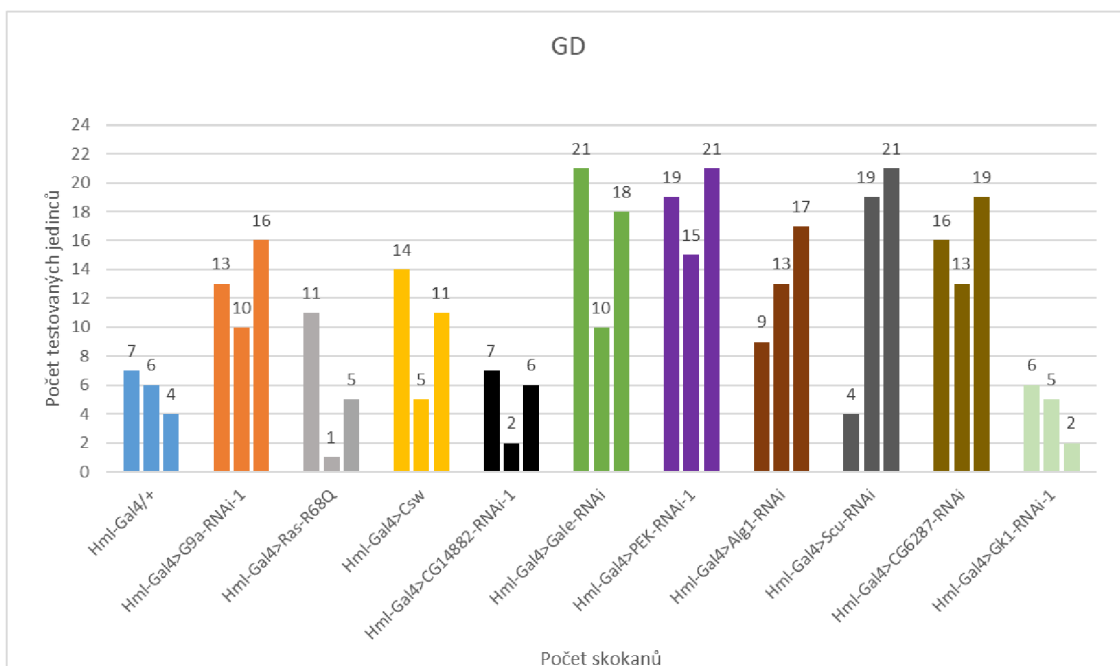
Obr. 23 Fotografie dospělé a larvy pod fluorescenčním mikroskopem po zkřížení linie 9461: w^{1118} ; *GMR-wIR-3/2-25/1/CyO*; *crq-Gal4/TM6, Ubx* s mCherry. Potvrzení přítomnosti *Gal4*.

Poskytnutou linii s aktivačním proteinem *Gal4* za promotorem hemolektinu jsem použila na zkřížení s RNAi liniemi proti dvanácti vybraným genům (**Tab. 4**). Ve většině případů šlo o manipulaci knockdownem pomocí RNA interference, kromě genů *Ras* a *Csw*, kde naopak bylo docíleno overexprese daného genu (**Tab. 6**). Promotor *Hml* (*hemolektin*) je promotor genu, který je exprimovaný v hemocytech neboli imunitních buňkách hmyzu. Umožňuje nám tak manipulovat s těmito geny právě v imunitní tkáni a sledovat důsledky manipulace na kognitivní funkci.

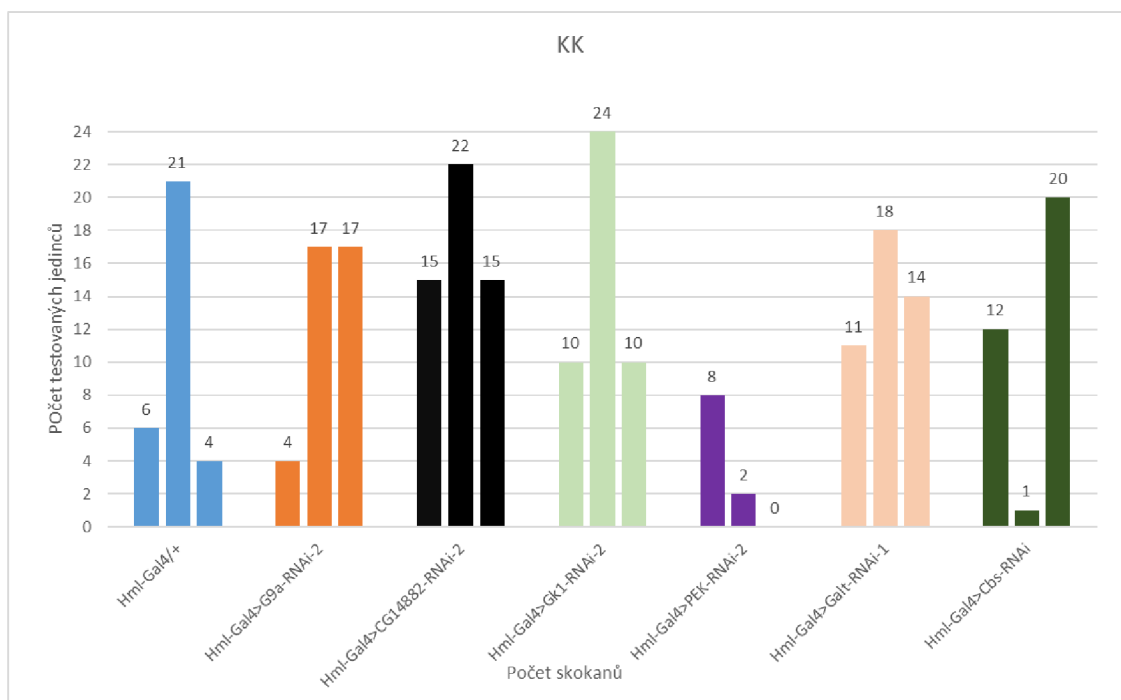
Lidský ortolog	Gen Drosophily m.	Typ manipulace	RNAi linie GD stock	RNAi linie KK stock	RNAi linie TriP stock
kontrola	-	-	2055	2056	1498
<i>EHMT1</i>	<i>G9a</i>	RNAi	9427	9423	-
<i>KRAS/HRAS</i>	<i>Ras</i>	Overexpresse	9252	-	-
<i>PTPN11</i>	<i>Csw</i>	Overexpresse	9260	-	-
<i>MTRR</i>	<i>CG14882</i>	RNAi	9405	9436	-
<i>GK</i>	<i>Gk1</i>	RNAi	9419	9437	-
<i>GALE</i>	<i>Gale</i>	RNAi	9421	-	-
<i>GALT</i>	<i>Galt</i>	RNAi	-	9469	9467
<i>CBS</i>	<i>Cbs</i>	RNAi	-	9434	-
<i>EIF2AK3</i>	<i>PEK</i>	RNAi	9429	9407	-
<i>ALG1</i>	<i>Alg1</i>	RNAi	9431	-	-
<i>HSD17B10</i>	<i>Scu</i>	RNAi	9435	-	-
<i>PHGDH</i>	<i>CG6287</i>	RNAi	9441	-	-

Tab. 6: 12 zkoumaných genů. Názvy lidských ortologů, drozofilí geny, typ manipulace, použité RNAi linie.

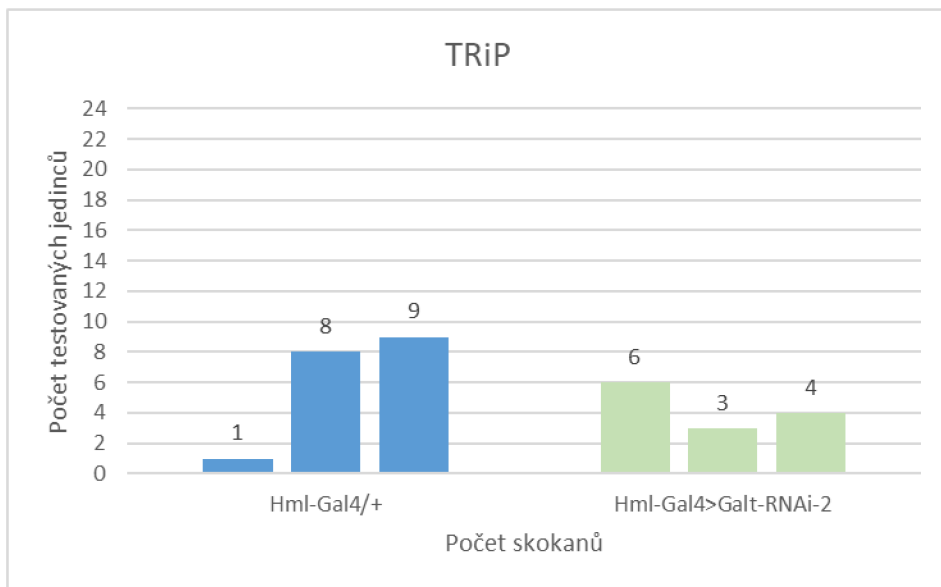
Zkřížené linie jsem otestovala na habituaci pomocí přístroje Zantiks. Na **obrázku 24, 25 a 26** jsou zaznamenány výsledky měření, a to pouze formou počtů skokanů pro tři dny měření pro dané genetické pozadí. V grafu jsou vždy ukázané tři počty skokanů pro tři nezávislá měření. Prvními třemi sloupečky jsou počty skokanů kontrolních linií, které by byly použity k porovnání případného rozdílu v habituaci. Tři grafy ukazují tři různé RNAi knihovny, ze kterých byly RNAi zvoleny v závislosti na genetickém pozadí daného genu. Jedná se o VDRC knihovny GD a KK a BDSC knihovnu TRiP. Habituaci jsem změřila, avšak kvůli nedostatku skokových odpovědí většiny linií nelze vliv na habituaci vyhodnotit. Jediné, co lze potvrdit je, že i s přítomností *Hml-Gal4* v genotypu dochází ke skokovým odpovědím, ačkoliv ne 100 %.



Obř. 24: Souhrnný graf počtu skokanů z GD linií pro testované geny a kontroly. Tři sloupečky ke každé linii značí nezávislá testování během tří dnů.



Obř. 25: Souhrnný graf počtu skokanů z KK linií pro testované geny a kontroly. Tři sloupečky ke každé linii značí nezávislá testování během tří dnů.



Obr. 26: Souhrnný graf počtu skoků z TRiP linií pro testované geny a kontroly. Tři sloupčky ke každé linii značí nezávislá testování během tří dnů.

5 Diskuse

Neurovývojové poruchy (NP) jako jsou poruchy autistického spektra nebo poruchy intelektu mají významný negativní vliv na vývoj a funkci mozku a nervového systému. Ačkoliv pod pojem NP spadá široká škála onemocnění včetně ADHD, poruch chování, poruch zraku a sluchu, dětská mozková obrna či epilepsie, já se ve své práci zaměřuji na geny asociované s poruchami autistického spektra (PAS) a poruchami intelektu (PI) (Cobb & Davies 2013, Niemi et al., 2018). Pacienti s PAS/PI mají porušené normální fungování kognitivních funkcí. Díky kognitivním funkcím dokážeme objektivně vnímat a vyhodnocovat každodenní situace. S pomocí kognice jsme schopni na okolnosti adekvátně reagovat a řešit je. Lidé s PAS/PI mohou tyto schopnosti ztrácet, a navíc často trpí potížemi s motorikou, řečí, pamětí nebo učením. Poslední dvě jmenované jsou příkladem vyšších kognitivních funkcí. PAS se vyskytují s frekvencí 1-2 % diagnostikovaných NP a PI postihuje 0,9 – 3,7 % celosvětové populace. PAS, jak už sám název vypovídá, se pojí s širokou škálou fenotypových projevů, avšak doprovodným společným fenoménem bývá porucha senzorického zpracování a neadekvátní odpovídání na podněty, ať už jde o přehnanou či nedostatečnou reakci (Sinclair et al., 2017). Pro PI jsou typické poruchy adaptivních funkcí a učení (Simonoff, 2018). Pro diagnostiku PI se obvykle uvádí hranice IQ <70. PAS a PI se často překrývají, až 70-75 % pacientů s PAS trpí také PI (Lecavalier, 2011) a jsou pro ně charakteristické závažnější problémy se sociálním a adaptivním chováním (Matson & Shoemaker, 2009; Spencer et al., 2006, Etyemez et al., 2022). Fenotyp pacientů s PAS a PI je ovlivněn řadou genetických i negenetických faktorů a nelze tedy nalézt jeden obecně platný fenotyp pro všechny pacienty. Mezi možné genetické příčiny patří chromozomální přestavby, změny počtu kopií větších úseků DNA, monogenetické mutace, bodové mutace, či inserce a delece v jednotlivých genech (Parenti et al., 2020). Genetické mutace spojené s PAS a PI jsou různorodé stejně jako jejich dopad na molekulární dráhy komplikovaný možností zapojení genů do více drah najednou. Diagnostika a léčba se tak stává velmi komplikovanou a komplexní záležitostí, ke které je třeba stále vézt výzkumy za účelem porozumění jednotlivých procesů pro zlepšení diagnostiky a léčby.

Předmětem mého výzkumu je jeden z procesů kognitivních funkcí a dopad genetických mutací na jeho fungování. Tímto mechanismem je habituace, základní forma učení vznikající už před narozením jedince (Leader et al., 1982; Morokuma et al., 2004). Tento nejjednodušší kognitivní proces je důležitý pro správné fungování jedince v prostředí, protože díky němu je schopný rozhodnout, které informace z prostředí jsou

zásadní a zbytek dokáže odfiltrovat. Habituační je tedy proces, při kterém dochází k snížené citlivosti na stále se opakující a nedůležité podněty a snížená reakce není způsobena únavou organismu ani adaptací smyslových orgánů. Habituační je adaptace behaviorální odpovědi snížením aktivity příslušných neuronálních drah na základě jejich opakované stimulace (Rankin et al., 2009). Právě deficit v habituaci byl potvrzen v řadě NP včetně PAS a PI jako jeden z přispívajících mechanismů komplexního onemocnění (McDiarmid et al., 2017).

Výzkum habituace otevírá cestu k pochopení příčin a procesů, které stojí za poruchami jako je PAS a PI. Identifikace genů spojených s habituací a případně jejich deficitem může přispět k lepšímu pochopení molekulárních mechanismů a drah, které ovlivňují kognitivní dysfunkci u těchto neurovývojových poruch a může vést k dalšímu porozumění tak komplexního problému jakými PAS a PI jsou, zároveň může pochopení napomoci v diagnostice a léčbě. V mém výzkumu se zabývám dvěma novými potenciálními geny *XPO1* a *USP34*, jejichž mutace byly nalezeny u jedinců s PI a mohou tak být jedním z monogenních faktorů vzniku těchto poruch. Výzkum probíhal na ortologních genech drozofily, *embargoed (emb)* a *puffyeye (puf)*.

Oba ortologní geny *XPO1* a *emb* kódují proteiny, které jsou zapojené do regulace transportu proteinů skrz jadernou membránu a jsou důležité pro řízení procesů genové exprese a buněčné signalizace. Pro ověření role genu *XPO1* v kognitivní (dys)funkci jsem provedla snížení exprese ortologu *emb* v nervové tkáni pomocí RNAi, následně jsem otestovala efekt manipulace na habituaci, a nakonec jsem molekulárně ověřila efektivitu RNAi.

Pro snížení exprese byl použit GABAergní promotor *Gad1-Gal4* pro knockdown pouze v GABAergních inhibičních neuronech. Jedná se o promotor genu *Glutamic acid decarboxylase 1* katalyzující dekarboxylaci kyseliny glutámové na kyselinu gama-aminomáselnou, která je hlavním inhibičním neurotransmiterem v centrálním nervovém systému savců i drozofily. Po úspěšné manipulaci genu pomocí křížení potřebných linií, které byly obstarané z drozofilích center, jsem mušky testovala na habituaci. Jedná se o tzv. „light-off“ jump habituaci, při které jsou jedinci vystaveni pravidelnému zhasínání světla, které vyvolá únikovou odpověď, kterou je zde skok. Pokud habituace normálně funguje, dochází postupně k útlumu reakce na opakované vypínání světla a postupnému snížení intenzity jejich skokové odpovědi. Naopak, u mušek s poruchou v habituaci toto snížení buď nenastává vůbec, nebo k němu dochází až po větším počtu opakovaných

stimulů. Mnoho genů, které jsou spojené s PAS a PI má narušenou „light-off“ jump habituaci, proto je studium tohoto jevu dobrým nástrojem pro zkoumání dopadu těchto genů na kognitivní dysfunkci (Fenckova et al., 2019).

Pro správné vyhodnocení habituace je nutné, aby během prvního zhasnutí (light off stimulů) odpověděla skokem alespoň minimálně polovina z testovaných much. Habituace se vyhodnocuje na základě dvou kritérií. „No-jump criterion“, které je splněné, pokud u drozofily nedojde ke skokové odpovědi v pěti po sobě jdoucích stimulech. Dalším kritériem je hodnota „trials to criterion“ (TTC), tedy počet stimulů před dosažením „no-jump criterion“. TTC tedy udává počet stimulů které daná moucha potřebovala k dosažení habituace. Hodnoty TTC pro všechny mouchy z jedné sady se zprůměrují a podíl mezi TTC manipulovaných much a TTC kontrolních much udává rozdíl v habituaci.

Měření bylo zopakováno třikrát ve třech dnech, vždy s novou sadou 24 mutantních a kontrolních jedinců. První den vyšel test průkazně na hladině hodnoty $P=0,003$, ale kontrolní linie nesplňovala kritérium, aby během prvního zhasnutí odpověděla skokem alespoň minimálně polovina. Druhé ani třetí měření nepřineslo zlepšení. Kvůli špatným výsledkům jsem experiment zopakovala a pro opakovaný experiment jsem použila nový alikvót kontrolních drozofil, aby byla eliminována případná chyba ve skupině kontrolních drozofil. Změna byla i v podmínkách křížení, drozofily byly testovány jak po ponechání v inkubátoru při 25 °C, stejně jak při předešlém měření, tak po ponechání v pokojové teplotě. Kvůli špatným reakcím kontrolní linie bylo měření opakováno jen dvakrát, ale žádné nevykázalo významný výsledek.

Na počet skokových odpovědí neměla vliv změna sady mušek, ze které byli jedinci testováni ani rozdílná teplota během vývoje. Nebylo možné vyhodnotit, zda GABA knockdown genu *emb* má vliv na habituaci. Proč mušky neskákaly nelze jednoznačně určit. Kontrolní sada použitá na toto měření, je sada, která je běžně používána a ověřena jinými experimenty. Nicméně je pravda, že jejich skokové odpovědi se většinou pohybují okolo 50 %, tedy těsně nad hranicí potřebné odpovědi. Problém tedy může být genetickém pozadí, a linie s tímto genetickým pozadím by v příštích genetických experimentech měly být nahrazeny liniemi s jiným pozadím, například VDRC GD nebo KK, jež vykazovaly lepší skokovou odpověď (**Obr. 14,17**). Další faktorů, kterými jsou skokové odpovědi ovlivněny je celá řada, od počasí, tlaku, vlhkosti, který zrovna den

měření panují až po celkový stav testované mušky, který může být rozdílný v závislosti na dalších faktorech. Výše zmíněný úspěšný experiment potvrdil významnou roli manipulovaného genu *emb* v deficitu habituace. Kombinované výsledky z třech měření přinesly signifikantní rozdíl ($P=0,000$) mezi hodnotami TTC. Kontrolní mušky se průměrně habituovaly během hodnoty $TTC=3,28$, zatímco mutantní až během $TTC=13,58$. Jedinců skákalo 51 mutantních a 37 kontrolních z celkového počtu 72. Toto měření potvrdilo deficit v habituaci pro RNAi genu *emb*.

Pro molekulární ověření významnosti RNAi manipulace byly použity larvy z panneuronálního knockdownu. qPCR ukázala, že při všeobecném knockdownu s *act-Gal4* driverem dojde k snížení exprese u *emb-RNAi-1* o 86 % ($P=0,000$) a u *emb-RNAi-2* o 75 % ($P=0,000$) (**Obr. 12, 13**).

Experimenty potvrdily hypotézu, že gen *XPO1*, respektive jeho drozofilí ortolog *emb* hraje významnou roli v kognitivní funkci habituace. Inhibice GABA knockdownem sice nepřinesla dobré výsledky, ale deficit v habituaci byl potvrzen předešlým experimentem. Panneuronální knockdown způsobil zpoždění ve vývoji a brzkou letalitu dospělců (Fencková, nepublikováno), což naznačuje vysokou významnost genu *emb* v správném fungování jedince. To, že jsou tyto rysy způsobené RNAi manipulací genu *emb* bylo podpořeno molekulárně pomocí qPCR, kterým byla potvrzena snížená exprese tohoto genu u larev sesbíraných z panneuronálního křížení.

Druhým zkoumaným pro habituaci potenciálně důležitým genem byl gen *USP34*. Jeho mutace byly nalezené u jedinců s PI a může tak být jedním z monogenních faktorů těchto poruch. Výzkum probíhal na ortologním drozofilím genu *puf* (*puffyeeye*). Oba geny jak lidský *USP34*, tak ortologní drozofilí gen *puffyeeye* kódují proteiny, které patří do rodiny deubiquitináz, enzymů odstraňující ubikvitin z proteinů. Tímto způsobem se podílí na regulaci různých buněčných procesů, včetně rozpadů proteinů, signalizaci a regulaci buněčného cyklu a předpokládá se, že mají významnou funkci i v regulaci transkripce. Pro ověření role genu *USP34* v kognitivní (dys)funkci jsem provedla snížení exprese drozofilího ortologu *puf* v nervové tkáni pomocí RNAi, následně jsem otestovala efekt manipulace na habituaci, a nakonec jsem molekulárně ověřila efektivitu RNAi.

Testovala jsem vliv panneuronálního knockdownu genu *puf*. Pro panneuronální knockdown byl využit promotor *elav* pro aktivační protein *Gal4* pro snížení exprese genu *emb* ve všech neuronech. *Elav-Gal4* využívá promotor pro gen embryonic lethal abnormal vision (*elav*), jehož produktem je RNA vazebný protein, který řídí různé

procesy v nervových buňkách, například růst axonů a tvorbu synapsí. Pro panneuronální knockdown byly použity dvě RNAi linie (*puf-RNAi-1*, *puf-RNAi-2*)

První experiment s *puf-RNAi-1* přinesl dobré skokové odpovědi a možnost porovnat kontrolní linie s mutantními pro zkoumání rozdílu v habituaci. První měření vyšlo signifikantně na hladině pravděpodobnosti $P=0,000$. Kontrolní drozofily se průměrně habituovaly během 16. podnětu (TTC=16,03), zatímco mutantní drozofily až během 55. podnětu (TTC=55,09). Druhé měření experimentu vyšlo signifikantně ($P=0,000$) s 100 % úspěšností skokových odpovědí. TTC obou linií vyšlo velmi podobě jako u prvního měření. Deficit v habituaci byl potvrzen u obou měření. Třetí měření i přes dobré skokové odpovědi nevyšlo průkazně ($P=0,222$).

Další RNAi linií použitou pro testování panneuronálního knockdownu *puf* a jeho efektu na habituaci byla *puf-RNAi-2*. V tomto experimentu byla úspěšnost skokových odpovědí ve všech opakování pro mutantní linie 100 %, zatímco pro kontrolní linie to byla vždy alespoň potřebná polovina. Všechna tři měření vyšla průkazně ($P=0,000$). První den průměrné TTC hodnoty vyšly pro kontrolní drozofily TTC=9,37 a pro mutantní TTC=89,44. Druhý den se kontrolní mušky habituovaly průměrně kolem 4. podnětu (TTC=3,59) a mutantní kolem 69. podnětu (TTC=68,97). Průměrné TTC hodnoty pro poslední opakování byly pro kontrolní linii TTC=8,47 a pro mutantní TTC=74,28. Na průměrných hodnotách můžeme vidět rozdíl v habituaci a potvrdit tak habituační deficit při panneuronálním knockdownu genu *puf*.

Pro molekulární ověření významnosti RNAi manipulace byly použity larvy z panneuronálního knockdownu. qPCR ukázala, že při všeobecném knockdownu s *act-Gal4* driverem dojde k snížení exprese u *puf-RNAi-1* o 54 % ($P=0,003$) a u *puf-RNAi-2* o 49 % ($P=0,019$) (**Obr. 20, 21**).

Experimenty potvrdily hypotézu, že gen *USP34*, respektive jeho drozofilí ortolog *puf* hraje významnou roli v kognitivní funkci habituace. To, že je fenotyp způsoben RNAi manipulací genu *puf* bylo podpořeno molekulárně pomocí qPCR, kterým byla potvrzena snížená exprese tohoto genu u larev sesbíraných z panneuronálního křížení.

S PAS a PI se mimo deficitu v habituaci a dalších příznaků pojí i častý výskyt obezity a imunitních problémů. To může přispívat ke kognitivní dysfunkci. Nicméně, přesný mechanismus tohoto vlivu není znám. Mým úkolem bylo zjistit, zda ortology vybraných genů, jejichž mutace způsobují monogenní PI/PAS syndromy se zvýšeným výskytem obezity a s ní spojených imunitních problémů mohou ovlivnit kognitivní

funkci v habituaci, pokud jsou manipulovány pouze v imunitní tkáni, tedy mimo tkáň nervovou. Pracovala jsem s ortology 12 genů, jejichž exprese se v imunitní tkáni během její aktivace zvyšuje (Fencková, nepublikováno) a dá se tedy předpokládat, že budou pro její funkci důležité. Dílčími cíli bylo připravit drozofilí linii pro manipulaci PAS/PI i imunitní tkáni, aby byla vhodná pro studium habituace a použít tuto linii k manipulaci s expresí genů implikovaných v PAS/PI v imunitní tkáni a otestovat efekt na kognitivní funkci v habituaci. Drozofilí ortology těchto dvanácti lidských genů jsou exprimovány v imunitní tkáni, která se při infekci zvyšuje a zároveň jsou u pacientů s PAS/PI asociované s některým z těchto příznaků: obezita, metabolické, endokrinní či imunologické abnormality.

Jako první krok se mi podařilo vytvořit novou linii pro habituální experimenty s genotypem $w^{1118}; GMR-wIR-3/2-25/1/CyO; crq-Gal4/TM6,Ubx$. *GMR-wIR* je inzercí pro bílé zbarvení očí, které je optimální pro dobré skokové odpovědi. *Gal4* aktivační protein je exprimován pod promotorem *crq*, který je exprimován v imunitních buňkách – hemocytech hmyzu. Přítomnost driveru *Gal4* jsem potvrdila zkřížením s *GFP* a *mCherry* proteinem, kdy bylo možno po zkřížení pozorovat pod fluorescenčním mikroskopem emitované zelené a červené světlo. Tato linie byla před uskutečněním dalších experimentů kontaminovaná v inkubátoru. Kvůli časové náročnosti případného opakovaného křížení mi byla v závislosti i na jiné experimenty poskytnuta jiná linie s promotorem hemolektinu s genotypem $w+; Hml-Gal4; 2xGMR-wIR-1/3-172/1$, kterou jsem použila pro zkřížení s 12 geny. Zkřížené linie jsem testovala na habituaci. Habituace u těchto genů nebyla vyhodnocena, protože nedošlo k dostatečným skokovým odpovědím linií. Proč k tomu došlo není jasné a existuje několik možností. Na chování organismu drozofily může mít vliv i přítomnost samotného *Gal4* driveru. Základním předpokladem je, že *Gal4* je sám o sobě v drozofile inaktivní, ale může být exprimován pod promotorem. Kramer & Staveley (2003) ve své studii popisují, že exprese *Gal4* driveru ve vyvíjejícím oku drozofily měla vliv na jeho morfologii, což značí, že v některých případech změna stavby nebo v našem případě chování může být způsobeno pouhou přítomností *Gal4* driveru. Další možností, proč drozofily špatně odpovídaly by mohla být přítomnost driver linie $w+; Hml-Gal4; 2xGMR-wIR-1/3-172/1$, která vznikla vykřížením jiných linií a mohlo vzniknout nevhodné genetické pozadí nebo genetické pozadí se sekundárními mutacemi. Řešením v tomto případě by mohlo být zkusit získat driver linii jiným vykřížením. Také je možné, že promotor hemolektinu není vhodný, ačkoliv drozofily s tímto promotorem skáčou i když ne 100 %. Pro opakování

experimentu by mohlo být dobré zkoušet znovu získat původně zamýšlenou driver linii w^{1118} ; *GMR-wIR-3/2-25/1/CyO*; *crq-Gal4/TM6,Ubx* a zkoušet, zda by v takovém případě byly skokové odpovědi častější. Nelze ani vyloučit faktory prostředí – tedy počasí, tlak atd.

6 Závěr

Prvním cílem bylo ověřit roli nových kandidátních PI genů *XPO1* a *USP34*, respektive jejich drozofilích ortologů *emb* a *puf* v kognitivní (dys)funkci. Experimenty potvrdily hypotézu, že tyto geny hrají významnou roli v kognitivní funkci v habituaci. U genu *emb* byl již deficit v habituaci po knockdownu znám z dat mé školitelky. Tato práce potvrdila i efektivitu RNAi knockdownu molekulárně skrze qPCR. U genu *puf* přinesl panneuronální knockdown dobré skokové odpovědi a potvrdil jeho významnost v kognitivní funkci, manipulace byly úspěšně ověřené molekulárně qPCR.

Druhým cílem bylo vytvořit novou drozofilí linii pro manipulaci 12 genů implikovaných v PI/PAS v imunitní tkáni a ověřit efekt manipulace exprese na kognitivní funkci v habituaci. Původně zamýšlená linie, která byla pro manipulaci vytvořena byla kontaminována v inkubátoru, proto byla poskytnuta linie s *Hml-Gal4* aktivačním proteinem exprimovaným v hemocytech. Po manipulaci genů drozofily nedosahovaly dostatečných skokových odpovědí a habituace nebyla vyhodnocena.

7 Seznam literatury

- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., George, R. A., Lewis, S. E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S. N., Sutton, G. G., Wortman, J. R., Yandell, M. D., Zhang, Q., ... Pfeiffer, B. D. (2000). The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. In *Source: Science, New Series* (Roč. 287, Číslo 5461).
- Bilder, D., & Irvine, K. D. (2017). Taking stock of the *Drosophila* research ecosystem. In *Genetics* (Roč. 206, Číslo 3, s. 1227–1236). Genetics Society of America. <https://doi.org/10.1534/genetics.117.202390>
- Blok, L. E. R., Boon, M., van Reijmersdal, B., Höffler, K. D., Fenckova, M., & Schenck, A. (2022). Genetics, molecular control and clinical relevance of habituation learning. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Roč. 143). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2022.104883>
- Borrie, S. C., Brems, H., Legius, E., & Bagni, C. (2017). *Cognitive Dysfunctions in Intellectual Disabilities: The Contributions of the Ras-MAPK and PI3K-AKT-mTOR Pathways*. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-091416>
- Bristol, A. S., & Carew, T. J. (2005). Differential role of inhibition in habituation of two independent afferent pathways to a common motor output. *Learning and Memory*, 12(1), 52–60. <https://doi.org/10.1101/lm.83405>
- Cobb, S.R., & Davies, C.H. (2013). Neurodevelopmental disorders. *Neuropharmacology*, 68, 1.
- Criado, K. K., Sharp, W., McCracken, C., de Vinck-Baroody, O., Dong, L., Aman, M., McDougale, C., McCracken, J., Arnold, L. E., Weitzman, C. C., Leventhal, J., Vitiello, B., & Scahill, L. (2018). Overweight and obese status in children with autism spectrum disorder and disruptive behavior. *Autism*.
- Curtin, C., Jojic, M., & Bandini, L. (2014). Obesity in Children with Autism Spectrum Disorder. *Harvard Review of Psychiatry*.
- Di Marco, B., Bonaccorso, C., Aloisi, E., D'Antoni, S., & Catania, M. V. (2016). Neuro-Inflammatory Mechanisms in Developmental Disorders Associated with Intellectual Disability and Autism Spectrum Disorder: A Neuro-Immune Perspective. *CNS and Neurological Disorders - Drug Targets*.

- Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K. C., Barinova, Y., Fellner, M., ... & Dickson, B. J. (2007). A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature*, *448*(7150), 151-156.
- Egan, A., Dreyer, M., Odar, C. C., Beckwith, M., & Garrison, C. B. (2013). Obesity in young children with autism spectrum disorders: Prevalence and associated factors. *Childhood Obesity*.
- Engel, J. E., & Wu, C. F. (2009). Neurogenetic approaches to habituation and dishabituation in *Drosophila*. *Neurobiology of Learning and Memory*, *92*(2), 166–175. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.08.003>
- Etyemez, S., Esler, A., Kini, A., Tsai, P. C., DiRienzo, M., Maenner, M., & Lee, L. C. (2022). The role of intellectual disability with autism spectrum disorder and the documented cooccurring conditions: A population-based study. *Autism Research*, *15*(12), 2399-2408.
- Fenckova, M., Blok, L. E. R., Asztalos, L., Goodman, D. P., Cizek, P., Singgih, E. L., Glennon, J. C., IntHout, J., Zweier, C., Eichler, E. E., von Reyn, C. R., Bernier, R. A., Asztalos, Z., & Schenck, A. (2019). Habituation Learning Is a Widely Affected Mechanism in *Drosophila* Models of Intellectual Disability and Autism Spectrum Disorders. *Biological Psychiatry*, *86*(4), 294–305. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2019.04.029>
- Finnegan, D. B., Hartl, D. L., & Kidwell, S. J. (1980). Introduction of P Elements into the Germ Line of *Drosophila melanogaster*. *Molecular and General Genetics*, *178*(3), 607–614.
- Fischer, T. M., & Carew, T. J. (1993). Activity-Dependent Potentiation of Recurrent Inhibition: A Mechanism for Dynamic Gain Control in the Siphon Withdrawal Reflex of *Aplysia*. In *The Journal of Neuroscience* (Roč. 3, Číslo 3).
- Frueh, J. S., Press, D. Z., & Sanders, J. S. (2021). Diagnosis and workup of intellectual disability in adults: Suggested strategies for the adult neurologist. *Neurology: Clinical Practice*, *11*(6), 534-540.
- Gładysz, D., Krzywdzińska, A., & Hozyasz, K. K. (2018). Immune Abnormalities in Autism Spectrum Disorder—Could They Hold Promise for Causative Treatment? In

- Molecular Neurobiology* (Roč. 55, Číslo 8, s. 6387–6435). Humana Press Inc. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0822-x>
- Goto, A., Kadowaki, T., & Kitagawa, Y. (2003). *Drosophila* hemolectin gene is expressed in embryonic and larval hemocytes and its knock down causes bleeding defects. *Developmental Biology*, 264(2), 582–591. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2003.06.001>
- Guo, A., Gong, Z., Li, H., Li, Y., Liu, L., Liu, Q., Lu, H., Pan, Y., Ren, Q., Wu, Z., Zhang, K., & Zhu, Y. (2016). Vision, memory, and cognition in *Drosophila*. In *The Curated Reference Collection in Neuroscience and Biobehavioral Psychology* (s. 483–503). Elsevier Science Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809324-5.21029-8>
- Gupta, S., Kumar, M., Chaudhuri, S., & Kumar, A. (2022). The non-canonical nuclear functions of key players of the PI3K-AKT-MTOR pathway. In *Journal of Cellular Physiology* (Roč. 237, Číslo 8, s. 3181–3204). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/jcp.30782>
- Chen, J., Alberts, I., & Li, X. (2014). Dysregulation of the IGF-I/PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in autism spectrum disorders. In *International Journal of Developmental Neuroscience* (Roč. 35, s. 35–41). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2014.03.006>
- Christoffersen, G. R. J. (1997). HABITUATION: EVENTS IN THE HISTORY OF ITS CHARACTERIZATION AND LINKAGE TO SYNAPTIC DEPRESSION. A NEW PROPOSED KINETIC CRITERION FOR ITS IDENTIFICATION. In *Progress in Neurobiology* (Roč. 53).
- Jyonouchi, H. (2013). Immunological abnormalities in autism spectrum disorders. *Advances in Neuroimmune Biology*, 4(3), 141–159. <https://doi.org/10.3233/NIB-130061>
- Kahrizi, K., Hu, H., Hosseini, M., Kalscheuer, V. M., Fattahi, Z., Beheshtian, M., Suckow, V., Mohseni, M., Lipkowitz, B., Mehvari, S., Mehrjoo, Z., Akhtarkhavari, T., Ghaderi, Z., Rahimi, M., Arzhang, S., Jamali, P., Falahat Chian, M., Nikuei, P., Sabbagh Kermani, F., ... Ropers, H. H. (2019). Effect of inbreeding on intellectual disability revisited by trio sequencing. *Clinical Genetics*, 95(1), 151–159. <https://doi.org/10.1111/cge.13463>

- Kavšek, M. (2004). Predicting later IQ from infant visual habituation and dishabituation: A meta-analysis. *Journal of Applied Developmental Psychology*, 25(3), 369–393. <https://doi.org/10.1016/j.appdev.2004.04.006>
- Kierdorf, K., Hersperger, F., Sharrock, J., Vincent, C. M., Ustaoglu, P., Dou, J., Gyoergy, A., Groß, O., Siekhaus, D. E., & Dionne, M. S. (2020). Muscle function and homeostasis require cytokine inhibition of AKT activity in drosophila. *eLife*, 9. <https://doi.org/10.7554/eLife.51595>
- Kramer, J. M., & Staveley, B. E. (2003). GAL4 causes developmental defects and apoptosis when expressed in the developing eye of *Drosophila melanogaster*. In *www.funpecrp.com.br Genet. Mol. Res* (Roč. 2, Číslo 1). www.funpecrp.com.br
- Leader, L. R., Baillie, P., Martin, B., & Vermeulen, E. (1982). The assessment and significance of habituation to a repeated stimulus by the human fetus. In *Early Human Development* (Roč. 7). Elsevier Biomedical Press 211.
- Leblond, C. S., Le, T.-L., Malesys, S., Cliquet, F., Tabet, A.-C., Delorme, R., Rolland, T., & Bourgeron, T. (2021). Operative list of genes associated with autism and neurodevelopmental disorders based on database review. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 113, 103623. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2021.103623>
- Lecavalier, L., Snow, A.V., Norris, M. (2011). Autism Spectrum Disorders and Intellectual Disability. In: Matson, J., Sturmey, P. (eds) International Handbook of Autism and Pervasive Developmental Disorders. Autism and Child Psychopathology Series. Springer, New York, NY.
- Lesch, C., Goto, A., Lindgren, M., Bidla, G., Dushay, M. S., & Theopold, U. (2007). A role for Hemolactin in coagulation and immunity in *Drosophila melanogaster*. *Developmental & Comparative Immunology*, 31(12), 1255-1263.
- López-Pisón, J., García-Jiménez, M. C., Monge-Galindo, L., Lafuente-Hidalgo, M., Pérez-Delgado, R., García-Oguiza, A., & Peña-Segura, J. L. (2014). Our experience with the aetiological diagnosis of global developmental delay and intellectual disability: 2006–2010. *Neurología (English Edition)*, 29(7), 402–407. <https://doi.org/10.1016/j.nrleng.2013.10.018>

- Matson, J. L., & Shoemaker, M. (2009). Intellectual disability and its relationship to autism spectrum disorders. In *Research in Developmental Disabilities* (Roč. 30, Číslo 6, s. 1107–1114). <https://doi.org/10.1016/j.ridd.2009.06.003>
- McCall, B. B., Carriger, M. S., & A, M. S. (1993). *A Meta-Analysis of Infant Habituation and Recognition Memory Performance as Predictors of Later IQ*.
- McDiarmid, T. A., Bernardos, A. C., & Rankin, C. H. (2017). Habituation is altered in neuropsychiatric disorders—A comprehensive review with recommendations for experimental design and analysis. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Roč. 80, s. 286–305). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.05.028>
- McDiarmid, T. A., Yu, A. J., & Rankin, C. H. (2019). Habituation Is More Than Learning to Ignore: Multiple Mechanisms Serve to Facilitate Shifts in Behavioral Strategy. *BioEssays*, 41(9). <https://doi.org/10.1002/bies.201900077>
- McKenzie, K., Milton, M., Smith, G., & Ouellette-Kuntz, H. (2016). Systematic Review of the Prevalence and Incidence of Intellectual Disabilities: Current Trends and Issues. *Current Developmental Disorders Reports*, 3(2), 104–115. <https://doi.org/10.1007/s40474-016-0085-7>
- Morokuma, S., Fukushima, K., Kawai, N., Tomonaga, M., Satoh, S., & Nakano, H. (2004). Fetal habituation correlates with functional brain development. *Behavioural Brain Research*, 153(2), 459–463. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.01.002>
- Niemi, M. E. K., Martin, H. C., Rice, D. L., Gallone, G., Gordon, S., Kelemen, M., McAloney, K., McRae, J., Radford, E. J., Yu, S., Gecz, J., Martin, N. G., Wright, C. F., Fitzpatrick, D. R., Firth, H. V., Hurles, M. E., & Barrett, J. C. (2018). Common genetic variants contribute to risk of rare severe neurodevelopmental disorders. *Nature*, 562(7726), 268–271. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0566-4>
- Parenti, I., Rabaneda, L. G., Schoen, H., & Novarino, G. (2020). Neurodevelopmental Disorders: From Genetics to Functional Pathways. In *Trends in Neurosciences* (Roč. 43, Číslo 8, s. 608–621). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.05.004>
- Perkins, L. A., Holderbaum, L., Tao, R., Hu, Y., Sopko, R., McCall, K., ... & Perrimon, N. (2015). The transgenic RNAi project at Harvard Medical School: resources and validation. *Genetics*, 201(3), 843-852.

- Puig, O., & Mattila, J. (2011). Understanding Forkhead box class O function: lessons from *Drosophila melanogaster*. *Antioxidants and Redox Signaling*.
- Ramaswami, M. (2014). Network plasticity in adaptive filtering and behavioral habituation. In *Neuron* (Roč. 82, Číslo 6, s. 1216–1229). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.04.035>
- Rankin, C. H., Abrams, T., Barry, R. J., Bhatnagar, S., Clayton, D. F., Colombo, J., Coppola, G., Geyer, M. A., Glanzman, D. L., Marsland, S., McSweeney, F. K., Wilson, D. A., Wu, C. F., & Thompson, R. F. (2009). Habituation revisited: An updated and revised description of the behavioral characteristics of habituation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92(2), 135–138. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.09.012>
- Sharma, A., & Mehan, S. (2021). Targeting PI3K-AKT/mTOR signaling in the prevention of autism. In *Neurochemistry International* (Roč. 147). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2021.105067>
- Shinawi, M., Sahoo, T., Maranda, B., Skinner, S. A., Skinner, C., Chinault, C., Zascavage, R., Peters, S. U., Patel, A., Stevenson, R. E., & Beaudet, A. L. (2011). 11p14.1 microdeletions associated with ADHD, autism, developmental delay, and obesity. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 155(6), 1272–1280. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.33878>
- Schmid, S., Brown, T., Simons-Weidenmaier, N., Weber, M., & Fendt, M. (2010). Group III metabotropic glutamate receptors inhibit startle-mediating giant neurons in the caudal pontine reticular nucleus but do not mediate synaptic depression/short-term habituation of startle. *Journal of Neuroscience*, 30(31), 10422–10430. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0024-10.2010>
- Schmid, S., Wilson, D. A., & Rankin, C. H. (2015). Habituation mechanisms and their importance for cognitive function. In *Frontiers in Integrative Neuroscience* (Roč. 8, Číslo JAN, s. 1–2). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnint.2014.00097>
- Schmidt, F. M., Weschenfelder, J., Sander, C., Minkwitz, J., Thormann, J., Chittka, T., Mergl, R., Kirkby, K. C., Faßhauer, M., Stumvoll, M., Holdt, L. M., Teupser, D., Hegerl, U., & Himmerich, H. (2015). Inflammatory cytokines in general and central obesity and modulating effects of physical Activity. *PLoS ONE*, 10(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121971>

- Simmons, M. J. (2013). P Elements. In S. Maloy & K. Hughes (Eds.), *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (2nd ed., pp. 258-260). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01112-8>.
- Simonoff, E. (2018). Intellectual impairment and neurogenetic disorders. *Oxford textbook of ADHD*. Oxford University Press, Oxford, 235-246.
- Sinclair, D., Oranje, B., Razak, K. A., Siegel, S. J., & Schmid, S. (2017). Sensory processing in autism spectrum disorders and Fragile X syndrome—From the clinic to animal models. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Roč. 76, s. 235–253). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.05.029>
- Spencer, M. D., Moorhead, T. W. J., Lymer, G. K. S., Job, D. E., Muir, W. J., Hoare, P., Owens, D. G. C., Lawrie, S. M., & Johnstone, E. C. (2006). Structural correlates of intellectual impairment and autistic features in adolescents. *NeuroImage*, 33(4), 1136–1144. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2006.08.011>
- Stessman, H. A., Xiong, B. O., Coe, B. P., Wang, T., Hoekzema, K., Fenckova, M., ... & Eichler, E. E. (2017). Targeted sequencing identifies 91 neurodevelopmental-disorder risk genes with autism and developmental-disability biases. *Nature genetics*, 49(4), 515-526.
- Szachta P., Skonieczna-Żydecka K., Adler G, Karakula-Juchnowicz H., Mandlani H, & Ignýs I.. (2016). *Immune related factors in pathogenesis of autism spectrum disorders*.
- Tan, A.-H. (1997). Cascade ARTMAP: Integrating Neural Computation and Symbolic Knowledge Processing. In *IEEE TRANSACTIONS ON NEURAL NETWORKS* (Roč. 8, Číslo 2).
- Thomas, S. D., Jha, N. K., Ojha, S., & Sadek, B. (2023). mTOR Signaling Disruption and Its Association with the Development of Autism Spectrum Disorder. In *Molecules* (Roč. 28, Číslo 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules28041889>
- Wang, H., László, K. D., Gissler, M., Li, F., Zhang, J., Yu, Y., & Li, J. (2021). Maternal hypertensive disorders and neurodevelopmental disorders in offspring: a population-based cohort in two Nordic countries. *European journal of epidemiology*, 36(5), 519-530.

Yehuda, R., Bierer, L., Pratchett, L., & Malowney, M. (2010). Glucocorticoid augmentation of prolonged exposure therapy: Rationale and case report. *European Journal of Psychotraumatology*, 1(1), 5643.

8 Přílohy

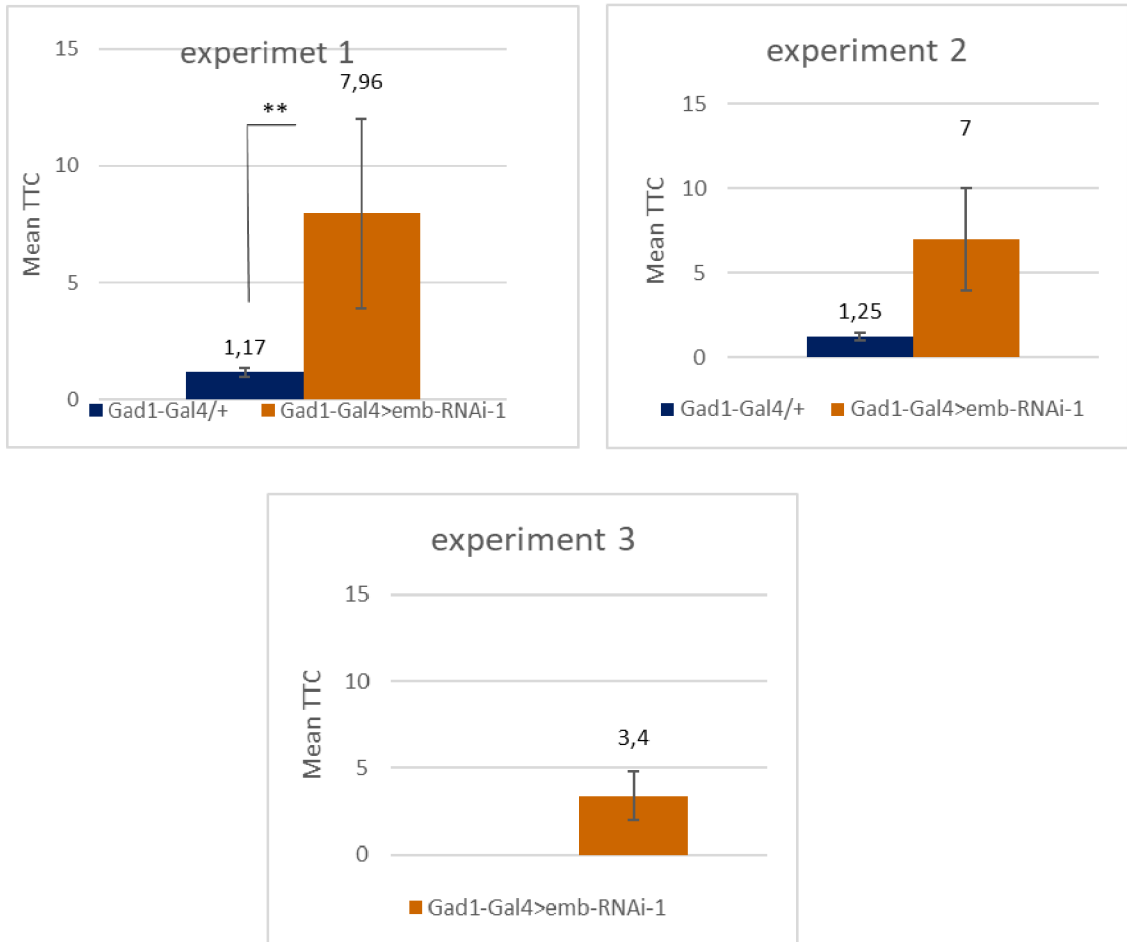
Příloha 1: Konsenzuální sekvence k genu *emb* (Emb_F1,R1) získaná z FlyBase (FB2024_01).

```
TGGAATCGGTAAAAGgtaagcttgatatgtgaattacatgttcatgattgtaattaattacacactgcgtcctcgct
ggcgcgtttgaaaagctaagaaaattgggaaatgccgccgagcttgtcgcattgcggcggcgatgcgttcgcctgtgc
cagtggtgcgtatgtgtggtgtgccgagcgttgatatgtgtgcgagtgcgaaaaagttagcgcgcgaggaacagcgtg
cgctttagttgtgtttcaaaaaatgaaacaagaaaacaaaaagaaatatggttcctgtcgcacaggcgtaaaagtacg
caatatgtataaccaacggtcttatttccacagCTTCAGGTCCAGTCCCGGCACCAGATCCAGAT
CCCGATCCAGATCGAGAGTCGCCGCTCCTCACCGTCATCATAGTGCGAAGAA
GAAGAAGCTGAAGCAGAAGCCGCCGCGCACTTTCGATAAATAAAGTGGA
AAAAAACAGCAAAAACAAGAAATCCAAAGGGAA
```

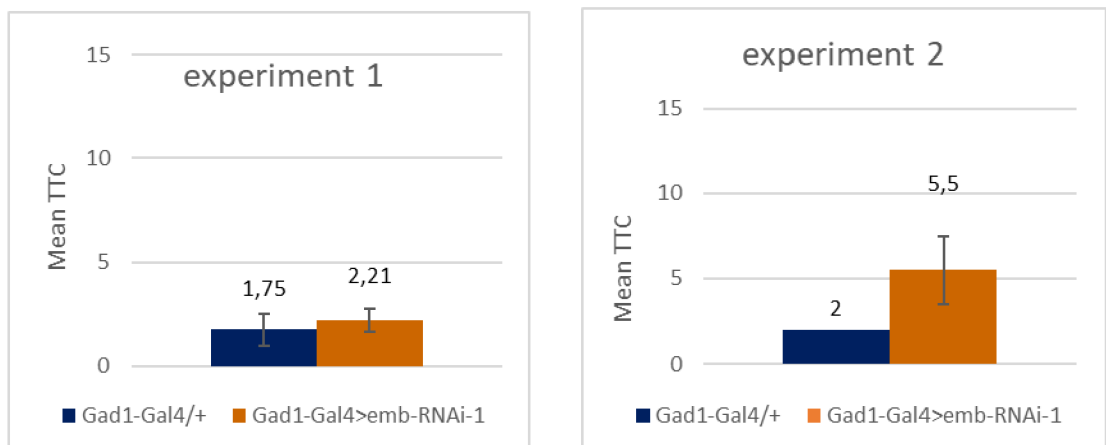
Příloha 2: Konsenzuální sekvence k genu *puf* (Usp_F4,R4) získaná z FlyBase (FB2024_01).

```
ACATGTACTACATGGGTCAACAATTGCGCCTGGAGAAGGAGTTCGTTTCACA
GTGTATGGAAAACCTAGTTCAAGCGGCCACGGCTTTGGAAAGgtgagttgaaataaat
aattgccttttcattattttctatttctgtattctttcagCATCGATGA
```

Příloha 3: Hodnoty TTC pro 3 měření habituace po GABA knockdownu genu *embargoed* (*Gad1-Gal4>emb-RNAi-1*).



Příloha 4: Hodnoty TTC pro 2 opakovaná měření habituace po GABA knockdownu genu *embargoed* (*Gad1-Gal4>emb-RNAi-1*).



Příloha 5: qPCR *emb-RNAi-1*

	emb Fw1 + Rev1		Rp49	
Ctrl	24,32		20,21	
	24,56	24,43	20,21	20,16
	24,42		20,05	
Ctrl	23,82		19,45	
	24,05	24,14	19,49	19,46
	24,56		19,44	
Ctrl	23,79		19,36	
	24,01	24,02	19,36	19,37
	24,27		19,38	
Ctrl	23,72		19,09	
	23,66	23,65	19,13	19,06
	23,56		18,97	
Ctrl	23,62		19,24	
	23,7	23,66	19,27	19,28
	23,66		19,33	
RNAi	25,32		17,83	
	25,33	25,49	18,36	18,12
	25,83		18,16	
RNAi		25,28		17,86
	25,28		17,86	
RNAi	25,21		17,7	
	25,16	25,14	17,77	17,73
	25,06		17,71	
RNAi	25,17		17,55	
	25,19	25,17	17,76	17,67
	25,15		17,71	
RNAi	25,02		18,09	
	24,89	25,02	17,84	17,95
	25,14		17,92	

Δ Ct	
	emb - Rp49
Ctrl	4,28
	4,68
	4,66
	4,58
	4,38
RNAi	7,38
	7,42
	7,42
	7,50
	7,07

kalibrační hodnota
4,516

ΔΔCt	
Ctrl	-0,24
	0,17
	0,14
	0,07
	-0,14
RNAi	2,86
	2,90
	2,90
	2,98
	2,55

2 ^{ΔΔCt}	
Ctrl	1,18
	0,89
	0,91
	0,95
	1,10
RNAi	0,14
	0,13
	0,13
	0,13
	0,17

Příloha 6: qPCR *emb-RNAi-2*

	emb Fw1 + Rev1		Rp49		ΔCt	
					emb1 - Rp49	
Ctrl	26,17		20,7		Ctrl	5,58
	26,17	26,19	20,5	20,62		5,77
	26,24		20,65			5,88
Ctrl	25,51		19,9		RNAi	7,64
	25,98	25,77	20,02	20		7,82
	25,82		20,08			7,74
Ctrl	26,05		19,97		Kalibrační hodnota	
	25,5	25,78	20,05	19,9	5,74	
	25,79		19,69			
RNAi	28,04		20,19			
	28,1	27,99	20,51	20,35		
	27,84		20,36			
RNAi	28,34		20,63			
	28,09	28,31	20,34	20,49		
	28,51		20,51			
RNAi	27,71		20,14			
	28,1	27,91	20,12	20,17		
	27,91		20,25			

$\Delta\Delta Ct$	
Ctrl	-0,16
	0,03
	0,14
RNAi	1,9
	2,08
	2

$2^{-\Delta\Delta Ct}$	
Ctrl	1,121
	0,98
	0,91
RNAi	0,268
	0,237
	0,251

Příloha 7: qPCR *puf-RNAi-1*

	usp Fw1 + Rev1		Polr2A		actin	
Ctrl	26,67		25,40		18,68	
	26,97	26,78	25,36	25,38	18,97	18,83
	26,71		25,37		18,85	
Ctrl	27,98		26,16		18,91	
	28,03	27,97	26,16	26,23	18,75	18,88
	27,89		26,38		18,99	
Ctrl	28,07		26,47		19,70	
	28,08	28,12	26,34	26,37	19,46	19,53
	28,20		26,29		19,43	
RNAi	29,52		27,28		20,25	
	29,73	29,59	27,32	27,25	20,24	20,28
	29,52		27,14		20,34	
RNAi	28,19		25,02		18,68	
	28	28,17	25,16	25,2	18,44	18,5
	28,33		25,42		18,39	
RNAi	28,29		25,57		18,61	
	28,52	28,37	26,09	25,71	18,60	18,74
	28,31		25,47		19	

ΔCt		
	usp-actin	usp - Polr2A
Ctrl	7,95	1,41
Ctrl	9,08	1,73
Ctrl	8,59	1,75
RNAi	9,31	2,34
RNAi	9,67	2,97
RNAi	9,64	2,66

kalibrační hodnoty	
8,84	1,63

ΔΔCt			2 ^{-ΔΔCt}		
	usp-actin	usp - Polr2A		usp-actin	usp - Polr2A
Ctrl	-0,89	-0,22	Ctrl	1,847	1,167
Ctrl	0,25	0,1	Ctrl	0,842	0,931
Ctrl	-0,25	0,12	Ctrl	1,188	0,92
RNAi	0,48	0,71	RNAi	0,718	0,61
RNAi	0,83	1,34	RNAi	0,561	0,394
RNAi	0,8	1,03	RNAi	0,574	0,489

Příloha 8: qPCR *puf-RNAi-2*

	usp Fw1 + Rev1		Polr2A		actin	
Ctrl	29,22		26,88		19,69	
	29,15	29,16	26,66	26,79	19,88	19,77
	29,11		26,82		19,74	
Ctrl	29,44		26,74		19,45	
	29,16	29,32	26,5	26,63	19,18	19,28
	29,35		26,66		19,22	
Ctrl	29,25		27,3		19,37	
	29,06	29,12	27,32	27,32	19,47	19,43
	29,06		27,33		19,46	
RNAi	31,38		27,81		20,61	
	31,52	31,4	27,91	27,9	20,75	20,86
	31,3		27,98		21,22	
RNAi	29,66		27		19,32	
	29,93	29,66	27,05	27,03	19,01	19,08
	29,39		27,03		18,91	
RNAi	31,21		28,62		21,6	
	30,27	30,51	28,76	28,82	21,57	21,63
	30,75		29,07		21,73	

ΔCt		
	usp - actin	usp-Polr2A
Ctrl	9,39	2,37
	10,03	2,68
	9,69	1,81
RNAi	10,54	3,5
	10,58	2,63
	8,88	1,69

Kalibrační hodnoty	
9,7	2,53

ΔΔCt			2 ^{-ΔΔCt}		
	usp-actin	usp - Polr2A		usp-actin	usp - Polr2A
Ctrl	-0,31	-0,16	Ctrl	1,244	1,113
	0,33	0,16		0,796	0,898
	-0,01	-0,72		1,01	1,649
RNAi	0,84	0,97	RNAi	0,56	0,51
	0,88	0,1		0,545	0,93
	-0,83	-0,84			