Zpráva z tříměsíční pracovní stáže u prof. Gabriele Lignani

Působím na 2. lékařské fakultě Univerzity Karlovy na Ústavu fyziologie vedeném prof. Přemyslem Jiruškou. V období od května do konce července 2024 jsem absolvovala odbornou stáž v laboratoři profesora Gabriele Lignani (Department of Clinical and Experimental Epilepsy, University College London), která mi byla umožněna i díky finanční podpoře Českе Ligy proti epilepsii v podobě stipendia Epi99 ve výši 90000 Kč.

Během této stáže jsem se zaměřila na proveditelnost a bezpečnost použití technologie editace genů CRISPR-Cas9 k umlčení (knockout) genu PCDH19 in vivo, který je spojován s epilepsií, především u žen. PCDH19 je členem rodiny protocadherinů, které se podílí na interakcích mezi buňkami a ovlivňují migraci neuronů během vývoje mozku. Téměř výhradní výskyt příznaků u žen je způsoben tím, že se gen nachází na chromozomu X a v důsledku jeho náhodné inaktivace některé neurony exprimují protein divokého typu, zatímco jiné exprimují jeho mutovanou formu. Jedním ze strukturálních projevů této vrozené mutace může být fokální kortikální dysplazie, která je také předmětem našeho studia na Ústavu fyziologie. Přesný mechanismus patofyziologie založené na mutacích genu PCDH19 není dosud znám a existující zvířecí modely plně nereplikují lidský fenotyp, zejména pokud jde o spontánní výskyt záchvatů. Hlavním cílem projektu proto bylo vytvořit další model tohoto onemocnění, který by přispěl k pochopení epileptogeneze.

Technologie CRISPR-Cas9 dokáže lokálně upravit genetickou informaci v malém množství buněk, čímž lépe simuluje vznik de novo mutací, které se vyskytují u pacientů. Podstatou knockoutu s pomocí CRISPR-Cas9 je zavedení náhodných mutací na různých místech genu, což vede k jeho nestabilitě a degradaci. Vzhledem k tomu, že konstrukt je do vyvíjejícího se plodu vnášen pomocí *in utero* elektroporace, dosáhneme umlčení genu PCDH19 pouze u malého počtu nervových prekurzorů za vzniku léze.

Během stáže jsem získala znalosti v oblasti molekulární biologie, konkrétně jak navrhovat naváděcí RNA (gRNA) pro daný účel s využitím různých bioinformatických nástrojů. Tyto gRNA jsem pak klonovala do vhodných vektorů a podílela se na jejich testování v buněčných kulturách neuroblastomu (N2A). Velká část mé práce byla věnována optimalizaci těchto experimentů pro dosažení co nejvyšší účinnosti knockoutu. Validace výsledků pomocí analýzy ICE (Interference of CRISPR Edits) odhalila dvě naváděcí RNA, které v některých případech dosahovaly účinnosti knockoutu až 60 %, což je činí vhodnými kandidáty pro další testování.

V další fázi experimentů bude třeba ověřit, zda došlo ke změnám na transkripční i translační úrovni (tj. snížení hladin mRNA a proteinů) pomocí technik RT-PCR a Western blot. Tyto konstrukty budou poté testovány *in vivo* pomocí *in utero* elektroporace. Bohužel jsem se však již těchto experimentů nemohla zúčastnit z časových důvodů.

Zkušenosti získané s technologií CRISPR-Cas9 a zahájení spolupráce s laboratoří prof. Gabriele Lignaniho budou přínosem pro celý náš tým a pomohou nám tuto technologii lépe začlenit do našich projektů, stejně jako ke studiu nových a spolehlivějších modelů fokální kortikální dysplazie či dalších modelů epilepsie.

Věřím, že dovednosti, které jsem získala, se pozitivně odrazí v kvalitě mé vědecké práce a přispějí k nalezení nových léčebných strategií.

Děkuji České lize proti epilepsii za podporu a doufám, že finanční situace umožní podpořit výjezd dalším epileptologům, ať už klinickým nebo experimentálním.

V Praze 6.8.2024

Salome Kylarová, Ph.D.