

NETECHNICKÉ SHRUTÍ PROJEKTU POKUSŮ 45/2018

Název projektu pokusů

Molekulární a genetické interakce adaptorového proteinu PSTPIP2 a jejich role ve zdraví a nemoci

Doba trvání projektu pokusů

5 let

Klíčová slova - *maximálně 5*

PSTPIP2, chronická multifokální osteomyelitida, autoinflatorní choroba, IL-1, signální transdukce

Účel projektu pokusů - *označte jej křížkem (x) do prázdného políčka*

x	základní výzkum
	translační nebo aplikovaný výzkum
	vývoj, výroba nebo zkoušení kvality, účinnosti a nezávadnosti léčiv, potravin, krmiv a jiných látek nebo výrobků
	ochrana přírodního prostředí v zájmu zdraví a dobrých životních podmínek lidí nebo zvířat
	zachování druhů
	vyšší vzdělávání nebo odborná příprava
	trestní řízení a jiné soudní řízení

Cíle projektu pokusů (např. řešené vědecké neznámé nebo vědecké či klinické potřeby)

Cílem projektu je charakterizace molekulárních mechanismů, kterými adaptorový protein PSTPIP2 reguluje prozánětlivou signalizaci v neutrofilních granulocytech a dalších typech leukocytů. Budeme se též snažit objasnit, jak se deregulace signálních drah v PSTPIP2 deficientních neutrofilech promítá do následných procesů vedoucích ke sterilním zánětům myších kmene cmo. Budeme se zabývat analýzou vazebných partnerů PSTPIP2 a genetickými interakcemi mezi mutacemi Pstpip2 a dalších genů a jejich vlivem na rozvoj zánětlivého onemocnění. Půjde zejména o objasnění jejich role v signálních drahách a funkcích neutrofilů a v dalších mechanismech regulace zánětlivé odpovědi se zaměřením na regulaci exprese a štěpení IL-1.

Pravděpodobné potenciální přínosy projektu pokusů (jak by mohlo být dosaženo pokroku ve vašem vědním oboru nebo jaký přínos by z něj člověk či zvířata mohli mít)

Hlavním přínosem bude rozšíření našich poznatků o molekulárních mechanismech a patofyziologii autoinflatorních chorob, zejména těch s postižením kostí. Výsledky mohou být důležité i pro budoucí vývoj nových léčebných strategií. Poznatky získané v rámci tohoto projektu budou také přispívat k našemu obecnému chápání regulace zánětu na molekulární úrovni a přispějí k poznání, jakými mechanismy IL-1 způsobuje a reguluje zánětlivou odpověď.

Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá

V projektu pokusů bude využito několik unikátních inbredních kmenů myši domácí (*Mus musculus*) a jejich kříženci konkrétně půjde o (přibližně za rok):

- 1) Mutantní myši kmen CMO (Cg-Pstpip2cmo/J) s bodovou mutací v genu Pstpip2 (c.293T→C), jeho varianta vzniklá zpětným křížením na genetické pozadí C57BL/6 a jejich kříženci s kmeny uvedenými v bodech 2-14: 300-550
- 2) Mutantní myši kmeny s bodovými mutacemi v genu Pstpip2, které vedou k záměně tyrozinů v C-koncové části proteinu PSTPIP2 (Y323, Y329, Y333) za fenylalaniny. Půjde o jednotlivé mutace i jejich kombinace: 150-350.
- 3) Mutantní myši kmeny s delecemi v genu Pstpip2, v části kódující C-koncové oblasti proteinu PSTPIP2 zahrnující Y323, Y329 a Y333 a jejich bezprostřední okolí nebo delci celé C-koncové části obsahující tyto tyroziny: 150-350.
- 4) Mutantní myši kmeny s bodovou mutací v genu Pstpip2 vedoucí k záměně W232 za A nebo delece v bezprostředním okolí W232 (včetně): 150-400.
- 5) Kontrolní kmeny C57BL/6 a Balb/C: 30-150.
- 6) Knock-out (KO) myši s inaktivovaným genem Pstpip2: 100.
- 7) Knock-out myši s inaktivovaným genem Ptpcr kódujícím receptorovou fosfatázu CD45:150.
- 8) Knock-out myši s inaktivovaným genem Cybb kódujícím Nox2 podjednotku NADPH oxidasy: 150.
- 9) Knock-out myši s inaktivovaným genem Myd88 kódujícím adaptorový protein MyD88:100.
- 10) Knock-out myši s inaktivovaným genem Lst1 kódujícím adaptorový protein LST1/A: 20-50.
- 11) Knock-out myši s inaktivovaným genem pro IL-1 β nebo jeho receptor: 150.
- 12) Knock-out myši s kondicionálně inaktivovaným genem Myd88 kódujícím adaptorový protein MyD88 a jejich kříženci s kmeny uvedenými v bodě 12: 60-200.
- 13) Transgenní myši kmeny nesoucí gen kódující Cre rekombinázu pod různými promotory (MRP8-Cre, Vav-Cre, OC-Cre): 30.
- 14) Transgenní myši kmen DTA-MRP8-Cre, nesoucí receptor pro diphtheria toxin na granulocytech a jeho kříženec s kmenem CMO: 30-150.

Uvedeny jsou pouze odhady počtů zvířat. Vzhledem k tomu, že nelze předvídat výsledky jednotlivých experimentů tohoto projektu, skutečné počty zvířat se mohou v závislosti na průběžných výsledcích od těchto odhadů lišit. Vždy však bude uplatňována maximální snaha o minimalizaci počtu využitých zvířat.

Jaké jsou očekávané nežádoucí účinky u zvířat? Jaká je navrhovaná míra závažnosti? Jak bude se zvířaty naloženo po skončení pokusu?

Tento projekt pokusů zahrnuje experimenty, které by mohly způsobit zvířatům utrpení, bolest nebo nadměrný stres maximálně v mírné nebo střední míře. Zvířata budou pravidelně monitorována tak, aby byla minimalizována bolest a utrpení a taktéž bude kontrolováno, jestli mají snadný přístup k potravě a vodě. Pro pokusy se nebudou využívat

prostředky snižující bolest. Po skončení pokusu budou zvířata usmrcena odpovídající metodou (cervikální dislokace). Likvidace zvířat bude provedena asanační službou, se kterou má pracoviště smlouvu.

Uplatňování 3R (replacement, reduction, refinement)

Nahrazení používání zvířat: Uveďte, proč je nutné použít zvířata a proč nemohou být využity alternativy bez použití zvířat.

Alternativní metody nepostihují složitost zkoumané problematiky, a proto nemohou nahradit navrhované pokusy. Pokud se objeví nová alternativní metoda nezahrnující použití zvířat, bude použit tento přístup. Při plánování tohoto projektu pokusů byly pro vyhledávání možných alternativ využity následující zdroje: vědecké publikace, databáze 3R (<http://www.nc3rs.org.uk/category.asp?catID=3>), a ALTWEB (<http://altweb.jhsph.edu/resources/searchalt/index.html>). Pro případ, že by se objevily nové alternativní metody, bude vyhledávání pokračovat také v průběhu projektu pokusu. Pro omezení experimentů na myších budou využity alternativní metody jako buněčné kultury, tkáňové kultury a in vitro modely. V případě analýz na buněčné a molekulární úrovni budou v maximální možné míře využívány imortalizované leukocytární progenitory a buňky z nich diferencované in vitro. Primární buňky z usmrcených zvířat budou použity jen v míře nezbytně nutné pro potvrzení získaných výsledků a pro experimenty, které na progenitorech nebude možné provést.

Omezení používání zvířat: Vysvětlete, jak lze zajistit použití co nejmenšího počtu zvířat.

Počet zvířat použitých pro jednotlivé experimenty bude omezen na minimum. Experimenty budou pečlivě plánovány a bude použit minimální počet myší potřebný pro dosažení biologické a statistické signifikance a udržování jednotlivých myších linií v chovu. Všude, kde to bude možné, budeme u in vivo experimentů po usmrcení zvířat zároveň získávat tkáň pro další analýzy in vitro (takto redukuje celkový počet použitých myší na minimum).

Šetrné zacházení se zvířaty: Vysvětlete volbu druhu zvířat a proč se v případě tohoto zvířecího modelu jedná o nejšetrnější použití z hlediska vědeckých cílů.

Vysvětlete obecná opatření, která budou přijata za účelem snížení újmy způsobené zvířatům na minimum.

Utrpení, bolest a stres myší budou vždy omezeny na minimum. Myši budou chovány v optimálních podmínkách, které jsou stanoveny současnými regulacemi EU a místními zákony a vyhláškami. Myši budou pravidelně kontrolovány a ošetřovány proškolenými ošetřovateli. V případě zjevného utrpení, stresu nebo projevu nemoci přesahující deklarovanou závažnost pokusu budou pokusná zvířata okamžitě usmrcena odpovídající metodou (tedy cervikální dislokace podle Nařízení z roku 2010/63/EU Evropského parlamentu a Rady pro ochranu zvířat použitých pro vědecké účely) a následně budou analyzována. Odběr krve bude prováděn jenom zkušenými výzkumnými pracovníky. Při transplantačních studiích budou myši transplantovány při orální anestezii prostřednictvím retroorbitální injekce nebo injekcí do ocasní žíly bez anestezie. Transplantace bude provádět opět jenom osoba zkušená a trénovaná, čímž se míra utrpení a bolesti omezí na minimum. Podávání léčiv a dalších pokusných látek myším bude prováděno jenom zkušenými pracovníky injikováním látky do peritonea nebo podkožně.