

NETECHNICKÉ SHRUTÍ PROJEKTU POKUSŮ 9/2018

Název projektu pokusů

Charakterizace nového genu důležitého v epigenetickém umlčování genů

Doba trvání projektu pokusů 3 roky

Klíčová slova - *maximálně 5* Umlčování genů (*gene silencing*), remodelování chromatinu, pluripotence

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)

Tento vědecký projekt se zabývá charakterizací role genu *Fam208a*, dříve známý jako *D14abbl1e*, a jeho mutací při regulaci formace heterochromatinu a umlčování genů (*gene silencing*). Přínosem studie bude porozumění mechanismu umlčování genů (*gene silencing*) v oblastech, které souvisí s patogenezí komplexních lidských chorob, restrikcí a aktivací virů a onkogenů. Část experimentů by měla přispět k dalšímu porozumění reprogramování kmenových buněk.

Počet a druh použitých pokusných zvířat:

Mutantní modely v tomto projektu byly vytvořeny na genetickém pozadí kmene C57BL/6 a nesou homozygotní transgenní alelu obsahující promotor lidského alfa-globinu, který řídí expresi GFP (green fluorescent protein). V projektu charakterizujeme 2 mutace (mutace: *MommeD6* a *MommeD20*). Jelikož je genu *Fam208a* velký, je nutné při jeho zkoumání použít obou mutantů samostatně a v kombinaci.

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)

Projekt bude kombinovat matematické modelování s technologiemi funkční genetiky, abychom porozuměli heterochromatinovému genovému umlčování, a s tím souvisejícími jevy ovlivňující lidské zdraví, včetně retrovirální susceptibility a vývoje komplexních chorob.

Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá

Experimenty	využití zvířat
Křížení a příprava požadovaných genotypů	
<i>MommeD6</i> (75 null and 75 wildtype)	150
<i>MommeD20</i> (75 null and 75 wildtype)	150
Analýza mutace <i>Momme D6</i> a <i>MommeD20</i> v genu <i>D14Abble</i> ve fenotypu embryí (whole-mount histochemické analýzy, RT-PCR analýzy). Embrya budou analyzována ve dnech: 3.5, 4.5, 6.5, 7.5 a 8.5	
<i>MommeD6</i>	300
<i>MommeD20</i>	300
Izolace myších embryonálních fibroblastů, izolace kmenových buněk z embryí a fluorescenční třídění pro analýzu krevních elementů venózní krve	
<i>MommeD6</i> (75 null and 75 wildtype)	50
<i>MommeD20</i> (75 null and 75 wildtype)	50
Celkem po dobu 3 roků projektu	1000

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

U zvířat nejsou očekávány žádné nežádoucí účinky. Míra závažnosti je dána tím, že zvířata znovu nenabudou po experimentu vědomí. Po skončení pokusu budou zvířata usmrcena cervikální dislokací. 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.

U tohoto projektu bylo použito všech možností snížení negativního dopadu pokusů na pokusná zvířata. U těchto pokusů byly přehodnoceny alternativní experimentální metody. Pro určení specifické funkce genu v organismu a vytvoření modelů nemoci nelze, z důvodu vysoké komplexity pobíhajících jevů, práci se zvířaty nahradit alternativními metodami. Množství zvířat bylo zvoleno podle požadavku na minimální potřebný počet dostatečný k objektivnímu statistickému vyhodnocení pokusu při analýze zmíněných mutantů a jim odpovídajících kontrol. Dále izolace embryonálních fibroblastů a kmenových buněk z mutantních linií nám umožňuje vykonávat *in vitro* pokusy k charakterizaci několika molekulárních a buněčných parametrů. Fluorescenční třídění a analýza krevních elementů je vykonatelná z malého množství krve, snižující celkový počet použitých zvířat.

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

Minimální kohorty zvířat pro získání statisticky průkazných výsledků z plánovaných pokusů jsou zajištěny naprostým využitím všech odebraných vzorků z jednoho zvířete; odebírány budou také orgány, které budou moci být později využity k retrospektivní analýze. Zároveň také počítáme s využitím *in vitro* experimentů, které zajistí omezení počtu pokusných zvířat.

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.

U pokusných myší jsou dostupné všechny genetické informace. Navržené experimenty nezahrnují invazivní ošetření, chirurgické zákroky, ani jiné postupy způsobující bolest a stres zvířatům. Myši budou pouze produkovány a pak utráceny cervikální dislokací, takže se nepředpokládá žádné utrpení.