

NETECHNICKÉ SHRUTÍ PROJEKTU POKUSŮ 45/2020

Název projektu pokusů

Molekulární charakterizace retinálních a cerebelárních defektů způsobených mutacemi sestřihového faktoru Prpf8

Doba trvání projektu pokusů

3 roky

Klíčová slova - *maximálně 5*

Cerebelum, neurodegenerace, granulární neurony, Prpf8, sestřih pre-mRNA

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

x

základní výzkum

x

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)

Spliceosomopathie představují skupinu lidských onemocnění, kdy jsou dědičnými mutacemi postiženy geny kódující komponenty aparátu pro sestřih pre-mRNA transkriptů. I přes ubikvitní výskyt těchto sestřihových faktorů a aktivně probíhající splicing celém organismu je pro tyto syndromy typický tzv. buněčně-autonomní fenotyp, kdy specificky degeneruje jedna konkrétní buněčná populace. Současná experimentální biologie zatím nepřinesla pro pozorovanou tkáňovou specifitu u spliceosomálních onemocnění dostatečně uspokojivé vysvětlení.

Známým příkladem spliceosomopathie je i dědičná atrofie sítnice *Retinitis pigmentosa* (RP), kdy mutace v jednom ze sestřihových proteinů PRPF3, PRPF4, PRPF6, PRPF8, PRPF31 nebo BRR2 (*SNRNP200*) vede k postupnému odumírání fotoreceptorických buněk. My jsme metodami cílené editace genů připravili tři nové, RP-relevantní alely myšího orthologu *Prpf8*. Myši nesoucí jednu ze dvou vytvořených aberantních forem proteinu Prpf8 vykazují postupné odumírání granulárních neuronů mozečku, zatímco ostatní cerebelární buněčné populace nejsou patologií zasažené. Naše experimentální modely tedy představují unikátní nástroje, které umožňují na molekulární úrovni hledat možné příčiny specifické citlivosti postižených tkání na mutace ve faktorech sestřihu pre-mRNA.

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)

Gen *PRPF8* kóduje klíčový komponent sestřihového aparátu pre-mRNA, jehož dědičné mutace jsou u člověka spojené s postupnou atrofií sítnice (RP). Současná věda nicméně nedisponuje poznatky ani vhodnými zvířecími modely, které by osvětlily molekulární příčinu těchto patologií a umožnily by tak racionální design případných léčebných strategií. My jsme technikami manipulace dědičné informace jsme získali celkem tři nové, RP-relevantní alely pro gen *Prpf8*. Myším dvou těchto kmenů spontánně degenerují granulární neurony mozečku, zatímco ostatní cerebelární populace nejsou patologií zasažené. Námi vytvořené kmeny tak představují dobrý experimentální model pro tkáňovou specifitu, která je typická pro spliceosomopathie a jejíž molekulární podstata není současnou vědou uspokojivě charakterizována.

U experimentálních myší můžeme přesně určit nástup i postup degenerativních změn a současně popsat procesy, které přítomnost degenerujících neuronů vyvolává v okolní tkáni. Dále se zaměříme na studium samotné molekulární příčiny odumírání granulárních neuronů, tedy zda v postižené tkáni dochází k nesprávnému provedení sestřihu pre-mRNA, jaké skupiny transkriptů jsou těmito aberacemi případně postižené a zda existuje nějaký sdílený sekvenční motiv předurčující špatný splicing. Tyto cenné poznatky lze pak přímo verifikovat na modelech simulujících lidskou RP podmíněnou mutacemi v genu *PRPF8*.

Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá

K plánovaným experimentům budou použiti dospělí jedinci <i>Mus musculus</i> různého stáří v intervalu 3-12 týdnů věku. Předpokládáme přibližnou spotřebu ve výši maximálně 50 zvířat ročně; celková spotřeba zvířat za tříletou dobu trvání projektu by tak neměla přesáhnout 150 jedinců. Pokud by se v běhu projektu zjistilo, že pozorovaný škodlivý fenotyp má již developmentální původ, byla by v takovém případě pro výkonné účely také použita embryonální či brzká postnatální stádia stejného druhu.
Jaké jsou očekávané nežádoucí účinky u zvířat? Jaká je navrhovaná míra závažnosti? Jak bude se zvířaty naloženo po skončení pokusu?
Škodlivý fenotyp se projevuje pouze u homozygotních jedinců genotypů <i>Prpf8^{N/N}</i> a <i>Prpf8^{delta17/delta17}</i>. Tato zvířata jsou nechávána volně stárnout pro dosažení konkrétního věku v intervalu 3-12 týdnů, kdy jsou umrcena za účelem další analýzy. V tomto časovém rozmezí dochází k postupné degeneraci granulární vrstvy buněk cerebela, jedná se ale o brzká stádia onemocnění, kdy se u zvířat ještě neprojevují symptomy ataxie. Navrhovaná míra závažnosti je tedy velice mírná.
Uplatňování 3R (replacement, reduction, refinement)
Nahrazení používání zvířat: Uved'te, proč je nutné použít zvířata a proč nemohou být využity alternativy bez použití zvířat.
Alternativní metody pro studium homeostázy a degenerativních procesů tkáně mozečku, jako například organoidové kultury, nebyly prozatím ještě uspokojivě etablované. V <i>ex vivo</i> podmínkách je navíc velice obtížné napodobit komplexní strukturu cerebelárních vrstev s mnohými buněčnými populacemi i zapojení mozečku do olivocerebelárního obvodu. Studium cerebelární neurodegenerace tak lze v současné experimentální biologii dobře provádět pouze na <i>in vivo</i> modelu a nelze ho nahradit alternativním přístupem.
Omezení používání zvířat: Vysvětlete, jak lze zajistit použití co nejmenšího počtu zvířat.
V plánu pokusů budeme počítat s minimálním počtem zvířat, který se bude řídit počty potřebnými pro statistické vyhodnocení pokusů. Experimenty budou pečlivě plánovány a evidovány, což zamezí nutnost jejich opakování.
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.
Předkládaný projekt pracuje s experimentálním modelem myši domácí <i>Mus musculus</i>. V současné vědecké komunitě se jedná o nejčastěji používaný savčí zvířecí model, u kterého jsou nejen dobře etablované metody editace dědičné informace a chovu pokusných zvířat, ale jsou pro něj k dispozici i rozsáhlé sekvenační a histologické databáze, databáze mutantních fenotypů a ke sdílení jsou pro akademickou obec uvolňovány i mnohé experimentální výstupy. Myší model je z genetického i fyziologického pohledu blízký člověku, proto jsou získané poznatky dobře extrapolovatelné na lidská onemocnění. Zvířata jsou chována v experimentálním zvěřinci ÚMG AV ČR, v.v.i., kde mají optimální chovné podmínky a jsou vystavena minimu stresových impulsů. Zvířata pak budou pouze po dosažení konkrétního věku umrcena, v rámci projektu nenavrhujeme žádné invazivní manipulace.