

NETECHNICKÉ SHRUTÍ PROJEKTU POKUSŮ 3/2020

Název projektu pokusů

Molekulární mechanismy regulace signální transdukce v leukocytech kinázami a adaptorovými proteiny

Doba trvání projektu pokusů 5 let

Klíčová slova - *maximálně 5* signální transdukce, imunitní odpověď, hematopoeza

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 stanovit, jakou funkci mají vybrané signalizační molekuly leukocytů (LST1, Wbp11, Hck) v hematopoeze, v regulaci fyziologie leukocytů a ve funkci imunitního systému. Cílem je též analýza toho, jak deficeience nebo hyperaktivita těchto proteinů mohou přispět k poruchám imunitní odpovědi a onemocněním imunitního systému (imunodeficeience, zánětlivá onemocnění). U proteinů LST1 a Wbp11 budeme studovat jejich funkci v hematopoeze, v imunitní odpovědi a reakci organismu na různé imunologicky relevantní stimuly. Funkce proteinu LST1 je zatím na organismální úrovni téměř neznámá. Naše předběžné výsledky ukazují možnou roli v regulaci receptorové signalizace ovlivňující vývoj a funkce myeloidních buněk a T lymfocytů. Wbp11 pravděpodobně reguluje hematopoezu a ovlivňuje úspěšnost transplantace kostní dřeně. Má také zvýšenou expresi u některých typů leukemií. Hck je velmi důležitá kináza rodiny Src. Mutace v C-koncové části u tohoto proteinu u dětské pacientky trpící neznámým zánětlivým onemocněním byla diagnostikována na spolupracujícím klinickém pracovišti. Vzhledem k povaze mutace předpokládáme, že kináza Hck je u této pacientky hyperaktivní. Cílem této části projektu bude provedení omezené série pokusů, kdy u inbredních myší kmene C57BL/6 nebo NOD-scid-gamma (NSG) provedeme transplantaci hematopoetických kmenových a progenitorových buněk exprimujících Hck s patientskou mutací včetně patientských buněk (budou-li k dispozici) nebo kontrolních buněk, a následně budeme sledovat, zda u těchto myší dojde k rozvoji podobné choroby jako u pacientky. Výsledky budou důležité pro potvrzení že choroba již pacientka trpí je způsobena mutací v Hck a pro stanovení, zda je způsobena hematopoetickými buňkami. Výsledky in vivo experimentů (1) určí důležitost role výše zmíněných molekul v procesu vývoje leukocytů a v průběhu imunitní a zánětlivé odpovědi (2) definují jejich funkci v signální transdukcii leukocytů (3) stanoví, jakou roli mají v průběhu imunitní odpovědi proti modelovým antigenům a umožní tak charakterizovat příslušné signální dráhy a najít vhodné klíčové body vhodné pro potenciální terapeutické zásahy, (4) umožní charakterizovat důsledky jejich deficeience, případně i dysregulace (Hck). V případě Hck mohou i přímo vést ke zlepšení terapie.

Typ znalostí, které získáme těmito experimenty je nezbytný pro vývoj účinnějších terapií ovlivňujících funkci imunitního systému u lidí.

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)

Znalosti, které získáme v rámci těchto pokusů nám umožní lépe porozumět mechanismům, kterými je regulován vývoj leukocytů a imunitní odpověď. Detailní znalosti těchto procesů jsou klíčové pro vývoj terapií ovlivňujících hematopoezu a funkci imunitního systému u lidí.

Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá

V projektu pokusů bude ročně využito přibližně:

1. knock-out myši (KO) s inaktivovaným genem Lst1: 450
2. knock-out myši (KO) s inaktivovaným genem Wbp11 (OPAL1): 150
3. transgenní myši kmen exprimující transgenní TCR OTII:40
4. transgenní myši kmen exprimující transgenní TCR OTI:40
5. imunodeficientní myši kmen NOD-scid-gamma (NSG): 50
6. kontrolní kmen C57BL/6: 200
7. hybridní kmen F1 B10A×Balb/C:20
8. Kontrolní kmen B6.SJL-*Ptprc^aPepc^b*/BoyJ: 50
9. Kříženci vybraných kmenů uvedených výše 200

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. Očekáváme, že maximální celkový počet zvířat ročně použitých v tomto projektu pokusů nepřekročí 1200.
Jaké jsou očekávané nežádoucí účinky u zvířat? Jaká je navrhovaná míra závažnosti? Jak bude se zvířaty naloženo po skončení pokusu?
Většina zvířat bude chována pouze pro účely usmrcení a odběru orgánů pro analýzu. Všechny kmeny používané v tomto projektu nevykazují v klidovém stavu viditelný fenotyp nebo utrpení. Některé z kmenů jsou imunodeficientní a mají zvýšenou citlivost k infekcím. V podmínkách velmi čistých SPF chovů, kde budou tato zvířata chována, to ale obvykle nepozorujeme. V případě patrných známek nemoci budou zvířata utracena. Jen malé množství zvířat bude zařazeno do experimentů, které by mohly způsobit zvířatům utrpení, bolest nebo nadměrný stres, a to maximálně v mírné nebo střední míře. Zvířata používaná pro transplantace kostní dřeně nebo pro imunizace budou pravidelně monitorována tak, aby byla minimalizována bolest a utrpení a taktéž bude kontrolováno, jestli mají snadný přístup k potravě a vodě. V případě patrných známek nemoci budou zvířata utracena. 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: Uved'te, 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. Hlavním důvodem pro použití zvířat v tomto projektu je potřeba sledovat vliv ztráty nebo dysregulace signálních molekul LST1 a Wbp11/OPAL1 a Hck na vývoj a fyziologické funkce leukocytů a imunitního systému, které lze sledovat pouze na organismální úrovni a na primárních buňkách. Imunitní systém je extrémně složitý a zatím jeho funkce není možné modelovat in vitro. Primární buňky jsou také v mnoha případech nenahraditelné, protože rakovinné a jinak imortalizované linie mají často výrazně pozměněné fyziologické funkce a vypovídací hodnota experimentů na těchto buňkách je jen omezená. Pokud tedy mají naše výsledky mít vysokou vypovídací hodnotu, potenciál pro využití v klinické praxi a šanci na publikaci v renomovaných časopisech, bude nezbytné i pro experimenty na molekulární a buněčné úrovni využívat primární buňky izolované z myší krve a lymfatických orgánů.
Omezení používání zvířat: Vysvětlete, jak lze zajistit použití co nejmenšího počtu zvířat.
Pokud existuje alternativní metoda nezahrnující použití zvířat, bude použit tento přístup. 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 nebo buněčných liniích nebude možné provést tak, aby výsledky měly dostatečnou informační hodnotu. V pokusech bude použito pouze takové množství zvířat, které zajistí statistickou průkaznost získaných dat.
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.
Využití myši domácí (Mus Musculus) v tomto projektu pokusu je odůvodněné genetickou příbuzností myši a člověka a podobností hematopoietického systému. Myši jsou nejlepším nepřimátním modelem vhodným pro studium poruch krvetvorby a imunitní odpovědi. Jde oširoce používaný model, se kterým máme dostatek zkušeností z hlediska chovu, šetrného zacházení, detekce špatného zdravotního stavu a zmírnění utrpení. Utrpení, bolest a stres myši 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 analyzovány. Odběr krve bude prováděn jenom zkušenými výzkumnými pracovníky. Při transplantacích studiích budou myši transplantovány injekčně do ocasní žíly. Transplantace bude provádět opět jenom osoba zkušená a trénovaná, čímž se míra utrpení a bolesti omezí na minimum. Podávání látek myším bude prováděno jenom zkušenými pracovníky injikováním látky do peritonea, intradermálně nebo do podkoží. Imunizace za účelem přípravy protilátek bude provádět také jen osoba se zkušenostmi s tímto postupem a její operační část bude prováděna v narkóze.