

NETECHNICKÉ SHRNUÍ PROJEKTU POKUSŮ – 109/2013

Název projektu: Wnt signaling - from molecules to disease

Vedoucí projektu pokusů: RNDr. Vladimír Kořínek, CSc.; číslo osvědčení ČZU 161/99

Doba trvání projektu: 2014-2018

Cílem pokusu je identifikovat geny a mechanismy, které řídí obnovu a diferenciaci buněk v myších nebo rybích tkáních. Budou využity pokusné myši umožňující podmíněnou inaktivaci tohoto genů v různých buněčných typech (viz dále). Pokusným zvířatům bude jednorázově aplikována malá netoxická dávka tamoxifenu (syntetický analog estrogenu). Tamoxifen u pokusných zvířat aktivuje rekombinázu Cre, která následně vyštěpí sledovaný gen z chromozomální DNA. Po aplikaci tamoxifenu tak u pokusného zvířete vznikají tkáně, které nejsou schopny produkovat (exprimovat) studovaný gen. Při intraperitoneální injekci tamoxifenu se využívá velmi tenká jehla. Aplikace látky je velmi šetrná a lokální znečistlivění se neprovádí. Dále budou použity tzv. reportérové myší kmeny umožňující sledovat různé buněčné typy pomocí produkce enzymu lacZ nebo fluorescenčních proteinů. Před odběrem studovaných tkání budou zvířata usmrcena cervikální dislokací. Bolest utišující prostředky není nutné podávat.

V rámci projektu budou využity myši s inaktivovanými geny (tzv. kompletní knockout), myší kmeny umožňující podmíněnou delecí genů a dále kmeny exprimující rekombinázu Cre v různých myších tkáních. Bude se jednat o tyto kmeny: (1) APC-CKO (podmíněný knockout genu APC); (2) Lgr5-Cre (tzv. knockin genu pro rekombinázu Cre/CreERT do lokusu Lgr5); (3) Villin-Cre (transgen produkující rekombinázu Cre/CreERT z promotoru genu villin); (4) Nkd1-Cre (transgen produkující rekombinázu CreERT z lokusu Nkd1); (5) Troy-Cre (transgen produkující rekombinázu CreERT z lokusu Troy); (6) Axin2-lacZ (knockin genu pro enzym lacZ do lokusu Axin2); (7) ROSA26-CreERT2 (knockin genu pro rekombinázu CreERT do lokusu ROSA 26); (8) ROSA26R-lacZ (tzv. reportérová myš produkující enzym lacZ); (9) ROSAR-EYFP (tzv. reportérová myš produkující žlutý fluorescenční protein EYFP). Dále budou použity myši kmenů C57BL/6 a BALB (popřípadě jejich hybridy), a to zejména pro přípravu dalších modifikovaných genů (identita těchto genů vyplývá z řešení projektu) a pro potřeby křížení při udržování myších modelových kmenů, pro imunizace a pro odběr kontrolních vzorků z různých tkání.

U pokusů s rybami bude vlastní test spočívat v injekci DNA, RNA a morpholino oligonukleotidů do rybiho vajíčka a následné analýze fenotypu. Pro testování regulačních závislostí budou využity reportérové kmeny ryby medaka a danio nesoucí geny GFP. Případně bude provedena fluorescenční analýza exprese sledovaného genu pomocí GFP v průběhu embryonálního vývoje. Před vyhodnocováním není nutné zvířata usmrcovat. Jelikož jim není působena ani bolest, utišující prostředky není nutné podávat. Po ukončení experimentu budou ryby usmrceny předávkováním anestetikem.

Jak vyplývá s výše uvedeného souhrnu, budeme studovat úlohu vytypovaných genů při diferenciaci buněk, a to v „kontextu“ živého savčího organismu. Bez využití pokusných ryb a myší se tento typ pro moderní experimentální biologii běžných experimentů nedá provádět. Alternativní metody postihující složitost zkoumané problematiky tak neexistují. Množství využitých jedinců jednotlivých kmenů je obtížné odhadnout, ale předpokládáme následující celkovou „spotřebu“ pokusných zvířat: rok 2014 – 250; rok 2015 350; rok 2016 – 350; rok 2017 – 450; rok 2018 - 450 dospělých jedinců a embryí a přibližně 300 rybích embryí ročně.