

NETECHNICKÉ SHRNUÍ PROJEKTU POKUSŮ 8/2018

Název projektu pokusů

Role ubikvitin ligázy SCF-FBXO28 v nádorové progresi

Doba trvání projektu pokusů 5 let

Klíčová slova - *maximálně 5* funkce genů; genetické modifikace; proteinové komplexy; metastáze; proteazom

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

☒	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)

Buňky odstraňují nepotřebné nebo poškozené proteiny pomocí proteasomu, který rozeznává proteiny kovalentně modifikované řetězcem ubiquitinů. Ubiquitin ligázy představují enzymy zodpovědné za specifický výběr substrátu a jeho následnou degradaci. Využitím afinitní chromatografie a hmotnostní spektrometrie se nám podařilo identifikovat nové substráty ubiquitin ligázy z rodiny FBOX proteinů, které hrají významnou roli v buněčné homeostázi. Cílem tohoto projektu je objasnit *in vivo* roli této ubikvitin ligázy a potvrdit mechanismus jejího účinku na myším modelu. Vzhledem k výsledkům, jichž jsme dosáhli v lidských nádorových liniích, předpokládáme letální fenotyp genetické inaktivace této ligázy v myším modelu. V prvním kroku tedy inaktivujeme její gen v celém organismu, a to během vývoje a poté v dospělosti s využitím Cre-ER myši, která umožňuje rekombinaci a inaktivaci floxovaného genu v přítomnosti tamoxifenu. Tamoxifen u pokusných zvířat aktivuje rekombinázu Cre, která následně vyštěpí sekvenci ohraničenou loxP místy z chromozomální DNA. V dalších experimentech, které budou následovat po podrobné analýze fenotypu pokusných zvířat, inaktivujeme gen pro tuto ligázu pomocí křížení s myšími kmeny exprimující Cre rekombinázu v různých tkáních. Funkci této ligázy budeme dále studovat v kontextu buněčné migrace, a to zejména během vzniku a distribuce metastáz nádorů prsní žlázy. K tomu využijeme dva myší modely, a to ortotopické transplantace a xenotransplantace. Očekáváme, že takto získané výsledky přinesou nové poznatky pro potenciální cílenou léčbu rakoviny prsní žlázy.

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)

Očekáváme, že pokusy popsané v tomto projektu povedou k získání nových informací o nádorech prsní žlázy a vznik jejich metastáz a že tyto informace budou potenciálně využitelné v cílené léčbě a tvorbě prognózy u jednotlivých typů prsních karcinomu u člověka.

Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá

Množství využitých jedinců jednotlivých kmenů je obtížné odhadnout, ale předpokládáme následující celkovou „spotřebu“ pokusných zvířat: rok 2019 – 75; rok 2020 – 75. Bude se jednat o dospělé zvířata různého stáří. Myši, které jsou určeny na přípravu podmíněné delece, nejsou ve výčtu uvedeny, jelikož se na ně vztahuje plán pokusů transgenní jednotky (CCP)

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

Navrhovaná míra závažnosti je mírná. Navrhované metody aplikace látek jsou pro zvířata šetrné a nezpůsobují výraznou či dlouhodobou bolest. Vyvolání zánětu či nádorů v tukovém tělisku mléčné žlázy může zhoršit některé fyziologické funkce, nicméně zvířata budou usmrcena dřív, než dojde k výrazným patologickým změnám působícím utrpení. Růst lidského nádoru v tukovém polštářku mléčné žlázy imunodeficientních myši způsobuje pouze nepohodlí, nádor nezasahuje do funkce orgánů a zvíře je usmrceno, jakmile dosáhne léze potřebné velikosti.

Uplatňování 3R (replacement, reduction, refinement)

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

Studium fyziologické funkce ubikvitin ligázy FBXO28 a její role v buněčné migraci vyžaduje z podstaty myši *in vivo* model. Také zachování fenotypu lidských nádorových buněk při jejich expanzi mimo pacienta vyžaduje živé pokusné zvíře. Vznik a vývoje nádoru a s tím spojenou signalizaci v organismu nelze sledovat jinak než *in vivo*. Data získaná *in vitro* je vždy třeba ověřit s použitím statisticky významného množství pokusných zvířat.

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

V pokusech použijeme vždy nejmenší statisticky významné množství zvířat. Experimenty budou pečlivě plánovány, což zamezí nutnosti 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.

Pro účely tohoto projektu byla jako modelový organismus vybrána myš a to z toho důvodu, že se jedná o nejčastěji používaný savčí model, který je z genetického i fyziologického hlediska blízký člověku a tudíž poznatky získané studiem myši jsou potenciálně aplikovatelné i v lidské medicíně. Zvířata budou chována ve speciálně upraveném zvěřinci

v prostorných chovných nádobách s neustálým přístupem k vodě i potravě. Šetrnou manipulaci se zvířaty zajistí dohled zkušených vědeckých pracovníků. Manipulace se zvířaty za účelem vyvolání zánětů či nádorů v tukovém tělísku mléčné žlázy budou probíhat co nejkratší dobu. U metod, které způsobují větší nepohodlí či bolest, bude použita krátkodobá celková anestezie.