

NETECHNICKÉ SHRUTÍ PROJEKTU POKUSŮ 101/2020

upravené podle PR 2020/569

Název projektu pokusů

Produkce transgenních myší pomocí adeno-asociovaných virů a jejich fenotypizace

Doba trvání projektu pokusů - v měsících

60

Klíčová slova - *maximálně pět¹⁾*

Adeno-asociovaný virus, CRISPRa, CRISPRi, Angelman, Prader-Willi

Účel projektu pokusů - zaškrtněte políčko; možno i více možností

☒ základní výzkum

☐ translační a aplikovaný výzkum

☐ kontrola kvality (včetně zkoušení bezpečnosti a účinnosti šarže)

☐ legislativní účely jiné zkoušení účinnosti a tolerance

☐ a běžná výroba zkoušení toxicity a jiné zkoušky bezpečnosti včetně farmakologie

☐ běžná výroba

☐ ochrana přírodního prostředí v zájmu zdraví a dobrých životních podmínek lidí nebo zvířat

☐ zachování druhů

☐ vyšší vzdělávání

☐ odborná příprava za účelem získání, udržení nebo zlepšení odborných znalostí

☐ trestní řízení a jiné soudní řízení

☐ udržování populací ustálených geneticky upravených zvířat, která nebyla použita v jiných pokusech

Cíle projektu pokusů - např. řešení některých vědeckých neznámých nebo vědeckých či klinických potřeb

Hlavním cílem projektu je produkce transgenních myších modelů pomocí kombinace partikulí odvozených z adeno-asociovaných virů (AAV) a CRISPR technologie (konkrétně CRISPRa a CRISPRi). Jmenované systémy budou využity za účelem studia funkce genů a jejich vlivu na fenotyp myšího modelu s Angelmanovým (AS) a Prader-Williho syndromem (PWS). AS a PWS jsou podmíněny mikrolecí maternálního či paternálního chromozomu 15 (člověk)/chromozomu 7 (myš). Mikrolece na jedné z alel vede epigenetické disregulaci alely druhé. Výzkum AS a PWS ukázal, že kompenzace dávky chybějících genů pomocí AAV vektorů je účinnějším přístupem než chemická léčba, a to v kontextu jak léčby, tak i studia těchto syndromů.

AAV systém umožňuje orgánově specifický přenos a expresi transgenů v myších modelech v průběhu postnatálního vývoje. Tuto technologii v kombinaci s technologií CRISPR bychom využili ke studiu AS a PWS myších modelů za účelem odhalení regulace a kompenzace deletovaných genů. Později pak k podrobnému popisu regulace genů v lokusu AS/PWS u myších modelů s AS a PWS. Očekávaným výsledkem je podrobný popis funkce a regulace genů v AS/PWS lokusu a jejich možná modulace za účelem zmírnění příznaků AS a PWS v myších modelech.

Pravděpodobné potenciální přínosy projektu pokusů - jak by mohlo být dosaženo vědeckého pokroku nebo jaký přínos by z něj člověk, zvířata či životní prostředí mohli mít; v příslušných případech rozlišujte mezi krátkodobými (v době trvání projektu) a dlouhodobými přínosy (mohou se projevit až po skončení projektu)

Projekt je zaměřen na studium molekulárních příčin Angelmanova (AS) a Prader-Williho syndromu (PWS) a jejich možné léčby pomocí AAV vektorů v kombinaci s CRISPR technologií. Z krátkodobého hlediska jde o zmírnění až potlačení příznaků Angelmanova a Prader-Williho syndromu v myších modelech.

Z dlouhodobého hlediska lze poznatky tohoto projektu pokusů rozvíjet dále do oblasti translačního a aplikovaného výzkumu, tyto aplikace ale už nejsou předmětem tohoto projektu pokusů.

Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány (např. injekční aplikace, chirurgické zákroky) - uveďte počet těchto postupů a dobu jejich trvání

Aplikace AAV partikul nesoucí komponenty CRISPRa/CRISPRi a kontrolních systémů budou jednorázové. Intracerebrální, intraokulární, retroorbitální, intraoseální, intrapulmonární aplikace či přímá injekce do konkrétních orgánů bude provedena pod celkovou anestézií zvířete. Rektální aplikace bude v sedací kanylou do recta.

Fenotypizační testy: V průběhu následující testů budou myši pod vlivem anestezie či sedativ aplikovaných injekčně: Echokardiografie (anestezie, IP), Plicní vyšetření (anestezie, IP), Intraperitoneální glukózový toleranční test (drobná incise na ocasu, použití anestetického krému), Tomografická analýza morfologie kostry a složení těla (probíhá pod plnou anestézií, IP), Vyšetření sluchových funkcí (anestezie, IP). Streptozotocinem indukovaný diabetes (aplikace intraperitoneálně, streptozotocin), Indukce akutního srdečního stresu pomocí dobutaminu (anestezovaných myších, IP), Odběr krve z očního plexu (odebíráno jemnou skleněnou kapilárou a to v celkové inhalační anestezii – isofluran), Echografie (inhalační anestezii, isofluran), Plicní funkce během metacholinové zátěže (celková anestezie, IP) u intubovaných myší, metacholin vdechovaný ve formě aerosolu, pro měření jsou myši intubovány nebo je provedena tracheotomie.

Předpokládané dopady / nepříznivé účinky na zvířata (např. bolest, ztráta hmotnosti, nečinnost / snížená hybnost, stres, neobvyklé chování) **a doba trvání těchto účinků**

Většina experimentů a aplikací převážně představuje krátkodobý stres v souvislosti s manipulací a neočekává se rozvinutí zdravotních komplikací. V případě registrace bolesti u zvířete bezprostředně po experimentu budou podána analgetika a antiflogistika. Pokud budou komplikace budou přetrvávat bude zvíře usmrceno. Zejména je tak očekáváno po intracerebrální aplikaci, budou-li zvířata vykazovat bolest, zkroutená pater, apatie, naježení, zastavení příjmu potravy, ztrátu hmotnosti, nečinnost, snížení hybnosti, neobvyklé nebo dezorientované chování budou zvířata usmrcena. Laboratorní myši budou každý týden váženy v případě ztráty hmotnosti o 20% podstoupí euthanazii.

Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá, a předpokládaná závažnost pokusu

Druh zvířat ²⁾ - vyberte ze seznamu	Odhadovaný počet	Odhadovaný počet zvířat podle závažnosti			
		Nenabude vědomí	Mírná	Střední	Závažná
Myš laboratorní (Mus musculus)	1340				x
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					

Nakládání se zvířaty, která nebudou na konci pokusu usmrcena

Odhadovaný počet zvířat k opětovnému použití	0
Odhadovaný počet zvířat, která budou navracena do přírodního stanoviště či systému chovu	0
Odhadovaný počet zvířat k umístění do zájmového chovu	0

Důvody pro výše uvedené nakládání se zvířaty - *uveďte*

Po ukončení pokusu budou všechna zvířata usmrcena nebo výjimečně přenesena do specializované laboratoře pro terminální analýzu, která není možná v rámci UMG. Terminální zpracování bude probíhat v rámci projektu pokusů cílové laboratoře.

Uplatňování 3R

Nahrazení používání zvířat - uveďte, jaké alternativy bez použití zvířat jsou v této oblasti dostupné a proč nemohou být použity pro účely tohoto projektu

Alternativu mohou jsou buněčné kultury zejména buňky neuroblastomu (Neuro-2a), kmenové buňky či indukované kmenové buňky. Tyto systémy poskytují obecný náhled na molekulární mechanismy spojené s AS a PWS, ale postrádají možnost studia lokusu spojeného s AS a PWS v orgánovém a systémovém kontextu. Dále buněčné kultury vylučují pohlavní křížení a tím tvorbu nových genotypů.

Omezení používání zvířat - vysvětlíte, jaký počet zvířat byl pro tento projekt stanoven. Popište kroky, které byly podniknuty ke snížení počtu používaných zvířat, a zásady použité k vytvoření studie; případně popište postupy, které budou používány po celou dobu trvání projektu za účelem minimalizace počtu používaných zvířat a které odpovídají vědeckým cílům (mezi tyto postupy mohou patřit např. pilotní studie, počítačové modelování, sdílení tkání a opakované použití).

Celková spotřeba laboratorních zvířat (zahrnující rezervu) na projekt zavedení a provoz AAV zprostředkované transgeneze myších modelů je 1340 myší/5let.

Skupiny budou čítat 10+10 v průběhu primárního testování a 15+15 v průběhu sekundárního a terciárního (primární testování intracerebrální a intrapulmonární aplikace) v závislosti na trvání experimentu, který bude

trvat 14-90 dní. Počet experimentální zvířat bude minimalizován na nejnižší počet umožňující validní statistické vyhodnocení dat s ohledem na zkušenosti z předchozích pokusů a podobných studií.

Primární *in vitro* experimenty již byly na našem pracovišti provedeny. Ověření funkčnosti celkového přístupu *in vivo* bude předmětem tohoto projektu. Všechny potřebné kroky pro minimalizaci počtu použitých zvířat jsou uvedeny v bodě 9, kde testování bylo rozděleno na primární, sekundární a terciární. Primární testování s kontrolními kmeny má za cíl najít neúčinnější způsob aplikace AAV vektorů konkrétních serotypů. Sekundární a terciární má pak za cíl odhalení podstaty molekulární regulace AS/PWS lokusu ve vybraných myších modelech.

Šetrné zacházení se zvířaty - uveďte příklady konkrétních opatření (např. zvýšené pozorování, pooperační péče, tlumení bolesti, výcvik zvířat) přijatých v souvislosti s postupy k minimalizaci dopadů na dobré životní podmínky zvířat; popište mechanismy k přijímání vznikajících zmírňujících postupů v době trvání projektu

Kontrola zvířat na denní bázi, používání analgetik a anestetik, u sterilní injekční aplikace, používání oční masti při anestezii, pravidelné vážení v týdenních intervalech,

Použité druhy zvířat - vysvětlete výběr druhů a souvisejících životních stadií

Mus musculus, myši sdílejí s člověkem AS/PWS lokus, jehož delece se podílí na rozvinutí Angelmanův a Prader-Williho syndromu. Angelmanův a Prader-Williho syndrom se přirozeně u myší nevyskytuje, lze jej ale uměle v myších modelech vytvořit. Výzkum AS/PWS v posledních letech ukázal, že myší modely vytvořené pro účely studia AS a PWS disponují regulačními mechanismy AS/PWS lokusu, které jsou analogické s regulačními mechanismy lidského AS/PWS lokusu. A proto lze v rámci studia regulace genů asociovaných s Angelmanovým a Prader-Willi syndromem lze využít těchto myších modelů, které navíc disponují definovaným genetickým pozadím. Pokusy budou prováděny hlavně postnatálně (P0.5; P2,5, P15, dospělí).

¹⁾ Včetně vědeckých pojmů, které se mohou skládat z více než pěti jednotlivých slov, a s výjimkou druhů zvířat a účelů uvedených jinde v dokumentu

²⁾ Druhy zvířat v souladu s kategoriemi statistického vykazování v příloze III prováděcího rozhodnutí Komise 2020/569 s doplňkovou možností „nespecifikovaného savce“ pro zachování anonymity ve výjimečných případech