

NETECHNICKÉ SHRNUÍ PROJEKTU POKUSŮ 70/2018

Název projektu pokusů

piRNA function in the germline – ERC Consolidator project

Doba trvání projektu pokusů Do 31. 12. 2021

Klíčová slova - maximálně 5 piRNA, spermatogeneze, oogeneze

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 analýza posttranskripčních regulací kontrolovaných malými RNA molekulami a identifikace těch vlastností zmíněné regulace, které jsou společné pro savce, respektive specifické pro myší model. Tyto mechanismy jsou biologicky významné, neboť poskytují zárodečné dráze ochranu před parazitickými repetitivními sekvencemi, které ohrožují integritu genomu. Pro experimenty plánujeme analyzovat piRNA a siRNA produkci v zárodečné linii křečka na základě genetického modelu s vyřazeným piRNA mechanismem, který je primárním obranným mechanismem proti endogenním retrovirům a LINE elementům. U myši vyřazení piRNA mechanismu způsobí samčí sterilitu, ale samice jsou na rozdíl od ostatních experimentálních modelů (*Drosophila*, *Danio*) plodné. Vzhledem k tomu, že myší vejce mají abnormálně silnou produkci siRNA, je nezbytné otestovat, zda samičí plodnost piRNA mutantů je unikátní vlastnost myšího modelu, anebo je možné ji pozorovat i u jiných savců. Z výše uvedených důvodů se chceme zaměřit na genetický model křečka (*Mesocricetus auratus*), který má pomocí CRISPR/Cas9 systému geneticky vyřazenou piRNA dráhu. Předpokládáme, že na rozdíl od myši nemá křeček tak vysokou siRNA produkci v samičí zárodečné linii, jako je tomu u myši. Je však jasné, že vzhledem ke genetickým vlastnostem a na základě dostupné literatury je křeček vhodnější model pro studium vlivu ablace piRNA dráhy, a to především z hlediska přenositelnosti možných výsledků na člověka.

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)

Bude dosaženo významného pokroku ve vědních oborech biologie zárodečné dráhy, v oboru malých RNA a kontrole genomové integrity u savců.

Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá

Mesocricetus auratus, celkově plánujeme během projektu využití přibližně 250 zvířat

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

Genetická úprava nemá vliv na komfort zvířat, somatický fenotyp není popsán. Toto tvrzení vychází z toho, že všechny známé mutanty piRNA dráhy obratlovců vykazují sterilitu, ale nemají žádný somatický fenotyp. Po skončení pokusu budou zvířata utracena.

Uplatňování 3R (replacement, reduction, refinement)

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

Pro experimenty vyžadující studium fenotypu v zárodečných buňkách bohužel neexistuje vhodná alternativa.

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

Pro experimenty vyžadující studium fenotypu v zárodečných buňkách bohužel neexistuje vhodná alternativa. Jediná možná opatření spočívají v rozvržení pokusů, plánování křížení a omezení nadprodukce zvířat a v maximalizaci počtu analýz připadajících na jeden vzorek.

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.

Vzhledem k cílům výzkumu mohou být uvedené postupy chápány jako jediné možné. Všechny popsané zákroky bude provádět vysoce proškolený a zkušený personál, což povede ke snížení počtu využitých zvířat a minimalizaci stresu a dlouhotrvajících důsledků.