

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: **Badania toksyczności RNA w neurodegeneracyjnych chorobach poliglutaminowych na mysich modelach choroby Huntingtona**

2. Czas trwania projektu: 01.11.2017 – 31.10.2022

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): choroba Huntingtona, toksyczność RNA, myszy knock-in, polyQ, TRED

4. Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych): **B. Badania translacyjne, Zaburzenia układu nerwowego i zaburzenia psychiczne u człowieka.**

A. Badania podstawowe

B. Badania translacyjne lub stosowane

C. Badania mające na celu zachowanie gatunku

D. Badania z zakresu medycyny sądowej

E. Badania zapewniające poprawę dobrostanu zwierząt lub warunków chowu lub hodowli zwierząt gospodarskich

F. Badania w celu opracowania i produkcji produktów leczniczych, środków spożywczych, pasz lub innych substancji lub produktów, lub badań ich jakości, skuteczności lub bezpieczeństwa stosowania

G. Badania w celu ochrony środowiska naturalnego

H. Badania w celu kształcenia na poziomie szkolnictwa wyższego lub szkolenia w celu nabycia lub doskonalenia kompetencji zawodowych

5. OPIS PLANOWANEGO DOŚWIADCZENIA

Należy określić cel naukowy lub edukacyjny doświadczenia, w tym przewidywane szkody, jakie może ono spowodować u wykorzystywanych zwierząt, i korzyści, jakie przyniesie ono dla rozwoju nauki i dydaktyki. Maksymalnie 250 słów, tekst musi być zrozumiały dla niespecjalisty.

Dziedziczne choroby neurodegeneracyjne z grupy chorób poliglutaminowych (polyQ) takich jak choroba Huntingtona (HD), charakteryzują się postępującymi objawami neurologicznymi, do których należą upośledzenie funkcji motorycznych oraz intelektualnych. Obraz kliniczny HD jest następstwem specyficznej mutacji polegającej na wydłużaniu się ciągów powtórzeń trójnukleotydowych w sekwencji kodującej genu huntingtyny. Deregulacja szlaków komórkowych wywołana przez produkty ekspresji zmutowanego genu prowadzi w konsekwencji do degeneracji komórek nerwowych. Pomimo faktu, iż mutacja odpowiedzialna za występowanie HD została zidentyfikowana ponad 20 lat temu, mechanizmy leżące u podstaw rozwoju tej choroby wciąż stanowią istotny problem badawczy i są tematem dyskusji naukowców na całym świecie.

Celem projektu jest identyfikacja i charakterystyka mechanizmów toksyczności RNA w patogenezie choroby Huntingtona. Wykazanie znaczącej roli transkryptu w rozwoju HD może mieć nie

tylko znaczenie poznawcze, ale również doprowadzić do rewizji proponowanych strategii terapeutycznych. W badaniach zostaną wykorzystane mysie modele HD, które zostały zaprojektowane tak aby umożliwić rozróżnienie na poziomie molekularnym patologicznej roli wydłużonego transkryptu od toksycznego oddziaływania zmutowanego białka podczas rozwoju choroby. Modele te zostaną poddane szczegółowej charakterystyce, która jest niezbędnym etapem w perspektywnym wykorzystaniu tych zwierząt do przeprowadzenia eksperymentalnej terapii. Zadaniem projektu jest poznanie możliwie jak najszerszego spektrum cech molekularnych i fenotypowych zwierzęcia i określenie objawów modelowej choroby. Testowane będą zarówno zmiany behawioralne za pomocą analizy funkcji motorycznych oraz zmiany molekularne w poszukiwaniu nowych mechanizmów i markerów toksyczności w patogenezie HD. Zwierzęta użyte w doświadczeniu stanowią nowe modele choroby Huntingtona, zatem trudno jest przewidzieć całokształt zaburzeń jakie wprowadzony transgen może u niego wywołać. Przewiduje się wystąpienie zmian fenotypowych charakterystycznych dla analizowanej choroby u osobników wykazujących ekspresję zmutowanego genu Htt zarówno na poziomie mRNA oraz białka. Do takich objawów mogą należeć: zaburzenia motoryczne, zaburzenia psychosomatyczne, zmiana wagi ciała. Użyte w doświadczeniu zwierzęta otoczone będą szczególną opieką weterynaryjną.

Planowane badania wniosą nowe informacje dotyczące skali i stopnia zaangażowania transkryptu w patogenezę chorób poliglutaminowych. Wiedza ta może wpłynąć na wybór optymalnej terapii, w której prawdopodobnie nie wystarczy skuteczna inhibicja syntezy zmutowanego białka, a konieczna jest również blokada toksycznych właściwości transkryptu.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

W doświadczeniu użytych zostanie 118 myszy obojga płci.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

ZASTĄPIENIE: Przed podjęciem decyzji o wykorzystaniu zwierząt w planowanych doświadczeniach, dokonano szczegółowego przeglądu dostępnej literatury naukowej w zakresie patogenezы choroby Huntingtona z użyciem modeli komórkowych i zwierzęcych. Wykorzystano do tego bazy danych jak: PUBMED, EBSCO oraz Web of Science Przeanalizowano wszystkie możliwości wykorzystania niższych organizmów takich jak modele muszki owocowej, nicieni czy rybek z rodzaju danio. Są one wprawdzie stosowane do modelowania chorób człowieka, jednak nie wykazują złożonych fenotypów behawioralnych, co stanowi znaczne ograniczenie w ocenie rozwoju choroby czy stosowanej strategii terapeutycznej. Dlatego też zastosowanie ich w prezentowanym projekcie badawczym nie zapewniłoby wiarygodnych i miarodajnych wyników, udzielających jasnej odpowiedzi na postawione pytania. Aby w pełni scharakteryzować patomechanizm choroby zarówno w aspekcie toksycznego oddziaływania białka

¹ Przy wypełnianiu wzorować się na instrukcji wypełniania wniosku W1 punkt. 8

jak i transkryptu, konieczne jest użycie kręgowców o złożonym układzie nerwowym, dla których dostępne są wyspecjalizowane testy behawioralne. W odniesieniu do obecnego stanu wiedzy i hipotezy przedstawionego projektu stwierdzamy, iż nie jest możliwe zastąpienie modelu gryzoni innym. Dane literaturowe wskazują, że myszy laboratoryjne są najczęściej wykorzystywanym obiektem do testowania założeń zarówno odnośnie patogenezy jak i testowania nowych metod leczenia w chorobie Huntingtona.

OGRANICZENIE: Tworzone nowe mysie modele choroby Huntingtona umożliwiają odseparowanie patomechanizmu wywołanego przez zmutowane białko od tego generowanego przez zmutowany transkrypt, co byłoby niemożliwe z użyciem istniejących modeli mysich. Po wnikliwej analizie wszystkich znanych mysich modeli HD doszliśmy do wniosku, iż najlepszym rozwiązaniem umożliwiającym weryfikację podjętej w projekcie hipotezy jest zaplanowanie i stworzenie nowych, bardziej adekwatnych modeli. Umożliwią one pełną charakterystykę udziału transkryptu i białka w patogenezie choroby. Planując eksperyment dążono do zmniejszenia do niezbędnego minimum liczby zwierząt użytych w badaniach. Proponowane grupy badawcze prezentujące oba finalne stworzone mysie modele oraz przemyślane grupy kontrolne, zostały zaplanowane tak by jak najbardziej ograniczyć dodatkowe użycie zwierząt typu WT stanowiących często stosowane grupy kontrolne. Ponadto grupę kontrolną WT C57BL/6 zasili potomstwo pozyskane na etapie propagowania linii heterozygot wyjściowego modelu zwierząt genetycznie modyfikowanych. Dodatkowo myszy zaplanowane do scharakteryzowania pod kątem behawioralnym i molekularnym późnego fenotypu choroby we wszystkich grupach badawczych, zasila również wcześniejsze etapy analizy progresji choroby w ocenie behawioralnej. Pozwala to znacznie ograniczyć liczbę zwierząt użytych w poszczególnych punktach czasowych doświadczeń. Liczba zwierząt na grupę została określona na podstawie dostępnego piśmiennictwa oraz bazując na doświadczeniu zdobytym podczas charakterystyki poprzedniego modelu tak by można było przeprowadzić racjonalne analizy statystyczne.

UDOSKONALENIE: Spełniając zasadę udoskonalenia, nasze doświadczenie zostało zaplanowane tak, by maksymalnie ograniczyć dyskomfort zwierząt. Podczas realizacji zaplanowanych procedur myszy będą utrzymywane w warunkach laboratoryjnych odpowiednich dla tego gatunku. W klatkach zastosowane zostaną elementy wzbogacające środowisko bytowania jak: papierowe tulejki, materiał do gniazdowania i zgryzania. Zastosowanie tego typu urozmaiceń środowiska poszerzy zakres czynności, jakie mogą wykonywać zwierzęta redukując stres. Posiadamy już doświadczenie oraz zaawansowany warsztat badawczy, który został opracowany podczas charakterystyki mysiego modelu SCA3, stworzonego również na zlecenie naszego Zakładu. Czynności w procedurach zostały zaplanowane tak, aby zmniejszały do minimum lub eliminowały ból, cierpienie oraz dystres. Były one także z powodzeniem stosowane u myszy laboratoryjnych wykorzystywanych w tego typu analizach przez inne zespoły badawcze. Planowane w projekcie testy behawioralno-motoryczne oraz ogólne obserwacje zwierząt stanowią łagodne, dobrze scharakteryzowane jak również łatwo wykonywalne czynności w pracy ze zwierzętami. Posiadane doświadczenie członków zespołu badawczego, umożliwi przeprowadzenie wymienionych czynności sprawnie i szybko, przez co zwierzęta objęte procedurami nie będą narażone na stres czy ból.