

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: **Badanie roli czynnika transkrypcyjnego TCF7L2 w rozwoju mysich astrocytów przy użyciu techniki edytowania genomu opartej na systemie Cre-loxP zależnej od tamoksifenu**

2. Czas trwania projektu **15.01.2019– 31.12.2023 (5 lat)**

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) **astrocyty; astrogeneza; czynniki transkrypcyjne, TCF7L2**

4. Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych) **A**

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.

Celem naukowym zaplanowanych przeze mnie doświadczeń jest wyjaśnienie roli jednego z najważniejszych w rozwoju organizmu szlaku sygnalizacyjnego - WNT/ β katena w funkcjonowaniu astrocytów. Szczegółowym celem jest ustalenie roli efektora tego szlaku - czynnika transkrypcyjnego TCF7L2. Wyłączenie wspomnianego czynnika będzie prowadzić do zmian ekspresji genów w astrocytach. W związku z tym, że w zaplanowanych doświadczeniach wyłączenie *Tcf7l2* nastąpi wyłącznie w astrocytach, pozostałe komórki organizmu nie zostaną zmodyfikowane. Nie wpłynie to na rozwój zwierzęcia tj. innych narządów oraz układów np. układu naczyniowego etc. Zatem eksperyment nie będzie prowadził do dyskomfortu oraz stresu u zmodyfikowanych zwierząt. Jedynym organem na który wpływ będzie mieć wspomniana modyfikacja będzie mózg. Możliwe jest, że zmienione astrocyty, będą wpływać na neurony inaczej niż u myszy kontrolnych. Nie powinno jednak prowadzić to do

systemowej zmiany funkcjonowania mózgu a więc skutkować stresem lub dyskomfortem użytych w doświadczeniu zwierząt.

W związku z tym, że planuję wyłączyć *Tcf7l2* na różnych etapach rozwoju oczekuję, że ekspresja różnych genów zostanie zmieniona na różnych etapach rozwoju. Dowiem się dzięki temu jaką rolę czynnik ten, a pośrednio cały szlak WNT/ β kateninam, pełniom w astrocytach na wszystkich etapach rozwoju mysiego mózgu. Ze względu na molekularne i morfologiczne podobieństwo między mysimi i ludzkimi astrocytami można wnioskować, że rola białka TCF7L2 w astrocytach u myszy będzie podobna do roli TCF7L2 u ludzi. Zatem korzyści, jakie przyniesie mój projekt dla rozwoju nauki to zrozumieniu podstaw procesu astrogenezy nie tylko u myszy ale szerzej u ssaków, w tym człowieka. To z kolei może przybliżyć nas do opracowania terapii chorób zależnych od działania astrocytów.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Mus Musculus (804 osobniki).

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując projekt badawczy oraz planując opisane procedury przeszukałem istniejącą literaturę w zakresie objętym wnioskiem badawczym. W tym celu wykorzystałem dostępne artykuły naukowe w bazach danych PUBMED oraz ScienceDirect.

Użyte słowa kluczowe: Astrocytes, TCF7L2; TCF7L2 knockout; mental disorders; astrocytes psychiatric disorders, astrocyte differentiation.

Na podstawie istniejącej literatury można stwierdzić, że w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych i psychicznych obserwuje się patologiczne zmiany w astrocytach. Przykładem takich zaburzeń jest zaobserwowana w chorobie Alzheimera atrofia astrogleju, skutkująca m. in. zaburzeniem przekazywania synaptycznego i homeostazy neurotransmiterów u chorych, a w konsekwencji śmiercią neuronów. Wiele badań wskazuje także na wynikający z zaburzeń różnicowania i proliferacji astrocytów rozwój najczęstszych nowotworów układu nerwowego - gwiaździaków. W

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

perspektywie, wiedza wynikająca z moich badań może poprowadzić do lepszego zrozumienia etiologii tych zaburzeń i opracowania metod ich zapobiegania i leczenia.

Mimo krytycznego znaczenia astrocytów, w porównaniu z mechanizmami regulującymi procesy neurogenezy i oligodendrogenezy, mechanizmy koordynujące ich różnicowanie są bardzo słabo poznane. Dopiero w ostatnich kilku latach podjęto intensywne badania zmierzające do identyfikacji czynników transkrypcyjnych kontrolujących kolejne stadia rozwoju astrocytów. Analiza dostępnych baz danych o ekspresji genów w astrocytach oraz własne badania wstępne pozwoliły mi na postawienie hipotezy, że w astrogenezę zaangażowane są czynniki transkrypcyjne z rodziny LEF1/TCF do których należy czynnik TCF7L2. Celem niniejszego projektu jest weryfikacja tej hipotezy

Dostępna literatura wskazuje na Tcf7l2 jako gen ryzyka cierpiących na takie choroby psychiczne jak depresja czy schizofrenia. Niemniej jednak wiedza na temat udziału zarówno szlaku WNT/ β katenu oraz wspomnianego genu jest fragmentaryczna. Moje wstępne wyniki oraz dostępne dane literaturowe wskazują, że proces astrogenezy także może być regulowany i koordynowany przez wspomniany czynnik transkrypcyjny. Przeprowadzone profilowania transkryptomu ludzkich astrocytów wykazały, że poziom ekspresji Tcf7l2 rośnie po urodzeniu. W przeprowadzonych przez siebie badaniach wykazałem, że na etapie specyfikacji komórek neuroepitlialnych poziom białka TCF7L2 rośnie oraz utrzymuje się na względnie wysokim poziomie w dojrzałych astrocytach. Zaobserwowałem również, że myszy pozbawione Tcf7l2 we wszystkich komórkach organizmu (tzw. całkowity nokaut) mają znacznie niższy poziom głównego markera astrocytów - białka GFAP oraz niższą intensywność jego barwienia immunohistochemicznego w porównaniu do myszy kontrolnych. Wyniki te sugerują znaczne zaburzenia w procesie różnicowania astrocytów u myszy pozbawionych Tcf7l2. Zatem możliwe jest, że odpowiedni poziom czynnika TCF7L2 na różnych etapach astrogenezy jest konieczny aby proces ten mógł przebiegać prawidłowo

Mając na uwadze dobrostan zwierząt będziemy stosowali zasadę 3 R. Ma to na celu możliwie jak największe zredukowanie liczby użytych zwierząt oraz zminimalizowanie ich cierpienia i dyskomfortu w trakcie trwania proponowanych procedur doświadczalnych. Ze względu na cel badawczy nie można zastąpić modeli zwierzęcych metodami *in vitro* takimi jak hodowle komórkowe czy tkankowe. Mało użytecznym jest wykorzystanie ustalonych linii komórek astrocytarnych ze względu na brak kontekstu tkankowego. Astrocyty m.in. regulują poziom neuroprzekazników w synapsach neuronalnych, w hodowlach nie jest to możliwe. Ponadto, rozwój astrocytów nie jest możliwe u zwierząt bezkręgowych dlatego, że wykształcony u nich układ nerwowy jest zbyt prosty i nie ma odniesienia do układu zwierząt

kręgowych. Przeprowadzone z wykorzystaniem takich modeli eksperymenty miałyby bardzo małą wartość poznawczą i słabe, jeśli w ogóle, przełożenie na rozwój mózgu i astrocytów u ssaków. Zaplanowane w badaniach myszy jako modelu zwierzęcego jest optymalnym rozwiązaniem m. in. ze względu na molekularne ale także i anatomiczne podobieństwo między mysimi i ludzkimi astrocytami. TCF7L2 występuje zarówno w komórkach neuroepitelialnych ludzkich oraz mysich. Podobnie, różnicujące astrocyty oraz dojrzałe komórki również charakteryzują się ekspresją Tcf7l2. Rezultaty przeprowadzonych badań pozwolą z większą pewnością przełożyć wnioski płynące z doświadczeń na myszach na mechanizmy molekularne i biochemię mózgu ludzkiego.

Wykorzystanie techniki edytowania genomu opartej na systemie Cre-loxP zależnej od tamoksifenu jest jedną z najczęściej wykorzystywanych obecnie technik manipulacji genetycznej. Pozwala ona na przeprowadzenie dokładnie tej samej procedury tj. wstrzyknięcia tamoksifenu myszom kontrolnym i eksperymentalnym w obrębie tego samego miotu. Pozwala to na ograniczenie do minimum zmienności technicznej między grupą eksperymentalną a kontrolą. Technika ta, pozwala ponadto na uzyskanie myszy z tkankowo-specyficznym nokautem genu Tcf7l2 jednocześnie obniżając do minimum prawdopodobieństwo letalnego fenotypu.

Wszystkie osoby wykonujące procedurę iniekcji tamoksifenu zostaną uprzednio przeszkolone z przeprowadzania zastrzyku przez osoby posiadające w tym zakresie stosowne doświadczenie praktyczne.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną²

- ☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 1 ustawy
- ☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 3 ustawy

X NIE

² Wypełnia właściwa lokalna komisja etyczna ds. doświadczeń na zwierzętach. Należy zaznaczyć właściwe pole.