

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

Tytuł projektu: **Badanie wpływu czynników transkrypcyjnych TCF7L1 i TCF7L2 oraz cząsteczki WNT7A na rozwój i funkcjonowanie mysich astrocytów oraz ich komórek progenitorowych przy użyciu techniki edytowania genomu opartej na systemie CRISPR/Cas9**

1. Czas trwania projektu **15.05.2019– 14.04.2023 (5 lat)**

2. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) TCF7L1, TCF7L2, WNTA, astrocyty; astrogeneza;

3. 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 jaką pełnią w funkcjonowaniu astrocytów 2 efekторы oraz 1 modulator szlaku WNT. Szczegółowym celem jest ustalenie roli dwóch efektora tego szlaku - czynnika transkrypcyjnego TCF7L1 oraz TCF7L2, oraz modulatora tego szlaku – cząsteczki WNT7A. Wyłączenie wspomnianych czynników będzie prowadzić do zmian ekspresji genów w astrocytach, z kolei wyłączenie genu dla Wnt7a wpłynie na zmiany aktywacji szlaku WNT. W związku z tym, że w zaplanowanych doświadczeniach wyłączenie *wspomnianych genów* 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 *Tcf7l1*, *Tcf7l2* oraz *Wnt7a* na różnych etapach rozwoju oczekuję, że ekspresja różnych genów zostanie zmieniona na różnych etapach rozwoju. Pozwoli mi to na odpowiedź jak modulacja szlaku WNT poprzez wyłączenie aktywacji zależnej od receptora oraz blokowanie aktywności szlaku poprzez usunięcie jego efektorów wpływa na rozwój astrocytów i ich działanie w dorosłym mózgu myszy. Ze względu na molekularne i morfologiczne podobieństwo między mysimi i ludzkimi astrocytami można wnioskować, że rola badanych białek w astrocytach u myszy będzie podobna do ich roli 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 (208 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:

TCF7L1, TCF7L2, WNT7A, Astrocytes, WNT pathway, mental disorders; psychiatric disorders,

Istniejąca literatura wskazuje że w przebiegu chorób psychicznych i neurodegeneracyjnych 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

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

nowotworów układu nerwowego - gwiaździaków. Liczne badania wskazują także ich nieprawidłowe działanie w takich chorobach psychicznych jak schizofrenia, depresja, ADHD czy choroba dwubiegunowa.

Mimo krytycznego znaczenia astrocytów, w porównaniu z mechanizmami regulującymi procesy neurogenezy i oligodendrogenezy, mechanizmy koordynujące ich różnicowanie są bardzo słabo poznane. W ostatnich latach zintensyfikowano badania zmierzające do identyfikacji tego jakie czynniki transkrypcyjne kontrolują kolejne stadia rozwoju astrocytów jak i ich funkcjonowanie. Moje wstępne wyniki badań jak również analiza dostępnych baz danych dotyczących ekspresji genów w astrocytach pozwoliły mi na postawienie hipotezy, że w astrogenezę zaangażowane są efektory szlaku WNT: czynniki transkrypcyjne TCF7L1 oraz TCF7L2 oraz modulator tego szlaku – cząsteczka WNT7A. 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 katenuina oraz wspomnianych jego efektorów TCF7L1, TCF7L2 oraz modulatora WNT7A jest fragmentaryczna. Moje wstępne wyniki oraz dostępne dane literaturowe wskazują, że proces astrogenezy także może być modulowany przez poziom ekspresji białka WNT7A oraz regulowany przez wspomniane czynniki transkrypcyjne. Przeprowadzone profilowania transkryptomu ludzkich astrocytów wykazały, że poziom ekspresji *Tcf7l2* oraz *Tcf7l1* rośnie po urodzeniu, podobnie poziom *Wnt7a*. W przeprowadzonych przez siebie badaniach wykazałem, że na etapie specyfikacji komórek neuroepitelialnych poziom białka TCF7L2 oraz TCF7L1 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. Z kolei traktowanie astrocytów w warunkach *in vitro* cząsteczką WNT7A prowadziło do wydłużenia się wypustek astrocytarnych. Wyniki te sugerują istotną rolę badanych czynników oraz modulatora zarówno w trakcie rozwoju astrocytów jak u dojrzałych komórek. Zatem możliwe jest, że odpowiedni poziom modulatora WNT7A oraz czynników TCF7L1 oraz 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 możliwy 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, TCF7L1 oraz WNT7A występują zarówno w komórkach neuroepitelialnych ludzkich oraz mysich. Podobnie, różnicujące astrocyty oraz dojrzałe komórki również charakteryzują się ekspresją wszystkich 3 genów. Rezultaty przeprowadzonych badań pozwolą z większą pewnością przełożyć wnioski płynące z doświadczeń na myszach na mechanizmy molekularne i biochemię mózgu ludzkiego. Technika CRISPR-Cas9 pozwala w wyniku operacji otrzymać myszy z tkankowo-specyficznym nokautem wybranego genu lub większej liczby genów na raz. To z kolei pozwala z większą pewnością weryfikować hipotezy badawcze na podstawie uzyskiwanych danych, jak i ograniczyć niezbędną liczbę zwierząt dla każdego z planowanych eksperymentów. 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*, *Tcf7l1* oraz *Wnt7a* jednocześnie obniżając do minimum prawdopodobieństwo letalnego fenotypu.

Wszystkie osoby wykonujące procedurę mają już odpowiednie przeszkolenie oraz posiadają właściwe wyznaczenia.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną²

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

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