

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: Analiza wpływu spontanicznej mutacji punktowej w domenie α -II spektryny genu *Spna2* (*Sptan1*) na sprawność motoryczną i T-zależną odpowiedź immunologiczną.

2. Czas trwania projektu 1.10.2018 – 1.03.2019.....

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) *Spna2*, *Sptan1*, α -II spectrin, mutation, disease,

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

A. Badania podstawowe

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 projektu jest opis zaburzeń koordynacji ruchowej, ocena sprawności motorycznej, obserwacja zdolności do postępów w procesie uczenia się poruszania po nieznanym, ruchomym podłożu oraz ocena odpowiedzi odpornościowej T zależnej, a także pomiar proliferacji i wyrzutu interleukin in vitro u nowego szczepu myszy *Spna2mut*, niosącego mutację w obrębie powtórzeń spektrynowych 9-12 łańcucha alfa spektryny nieerytrocytarnej genu *Spna2* (*Sptan1*), przekładającą się na przeżycie, rozplam i różnicowanie komórek układu odpornościowego i nerwowego. **Projekt wynika z realizacji harmonogramu grantu NCN: UMO-2017/25/B/NZ3/03012.**

Mutacje powodujące niedobór ekspresji poszczególnych łańcuchów spektryn lub nieprawidłowe formowanie się heterodimerów $\alpha\beta$ prowadzą m. in. do zespołów niedokrwistości hemolitycznej (dotyczącej łańcuchów α -I lub β -I, np. sferocytoza wrodzona, eliptycytoza dziedziczna), ataksji mózdkowej typu 5 (β -III i α -II) i zespołu Westa – niemowlęca encefalopatia padaczkowa (α -II i β -III). Nokaut łańcucha α -II spektryny w innych modelach

badawczych jest letalny już na wczesnych etapach rozwoju, uniemożliwiając zbadanie roli tego białka w trakcie życia osobniczego.

Model myszy *Spna2mut* daje unikalną i niepowtarzalną okazję poznania konsekwencji dominująco-negatywnej mutacji genu *Spna2* w trakcie życia osobniczego i jego wpływu na funkcjonowanie w pełni ukształtowanego układu nerwowego oraz układu odpornościowego. Tym samym wyjaśnić molekularne podłoże zmian w wymienionych układach, spowodowane przez zaburzenia w cząsteczce łańcucha α -II spektryny. Zaobserwowane w badaniach wstępnych efekty wywołane mutacją pojedynczego aminokwasu w łańcuchu α -II spektryny dają możliwość lepszego poznania roli niebadanego wcześniej regionu tej cząsteczki na jej aktywność biologiczną poprzez poszukiwanie nowych oddziaływań, co może przełożyć się na ogromny postęp w zrozumieniu roli i mechanizmów jaką w organizmie pełnią cząsteczki spektryn, lepsze zrozumienie jednostek chorobowych, których przyczyną są mutacje w obrębie łańcucha α -II spektryny.

Podejmowany temat jest nowatorski i unikalny w skali światowej.

Procedura związana z testem behawioralnym RotaRod jest metodą nieinwazyjną i nie wywołuje u zwierzęcia większego stresu. Natomiast procedura immunizacji jest mało inwazyjna, a poziom stresu nie jest większy niż podczas uklucia igłą. Antygen w postaci białka będzie podawany w formie zawiesiny w adiuwancie - Sigma Adjuvant System (S6322 Sigma). W celu dootrzewnowego podania antygeny, myszy będą na około 15 sekund/każda wyjęta z klatki i zaszczepiona z użyciem ogrzanej zawiesiny antygeny w ilości nie przekraczającej 100 mikrolitrów, z użyciem cienkiej igły.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

W doświadczeniu użytych zostanie 20 dojrzałych (3-miesięcznych) myszy:

- 10 osobników heterozygotycznych myszy szczepu *Spna2mut* – grupa badana
- 10 osobników dzikich (homozygot dominujących) myszy szczepu *Spna2mut* – grupa kontrolna

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując projekt badawczy, sprawdzono istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazach danych: PubMed, Google Scholar

Wykorzystano słowa kluczowe takie jak: *Sptan1*, *Spna2*, α -II spectrin, mutation, disease

Na podstawie przeszukania istniejącej literatury, stwierdzam, że: wiedza w tym zakresie jest niewystarczająca do tego by odpowiedzieć na postawioną w projekcie hipotezę oraz pytanie – czy i w jaki sposób spontaniczna mutacja punktowa w obrębie domeny α -II spektryny genu *Spna2* (*Sptan1*) wpływa na przeżycie, rozplem i różnicowanie komórek układu odpornościowego i nerwowego.

Uwzględnienie zasady zastąpienia

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

Wybrano do badań gatunek myszy, ponieważ dla tych zwierząt opracowane są rutynowe i wystandaryzowane testy behawioralne. Myszy są także standardowym organizmem w badaniach układu odpornościowego, nerwowego, jak również nowotworów.

Całkowite zastąpienie użycia modelu zwierzęcego poprzez stosowanie modeli *in vitro* w proponowanym projekcie jest niemożliwe.

Uwzględnienie zasady ograniczenia:

W celu zminimalizowania liczby zwierząt biorących udział w doświadczeniu i uwzględnienia zasady ograniczenia, zarówno szczepy myszy, jak również eksperymenty zostały dobrane i zaplanowane tak, aby te same grupy zwierząt mogły wziąć udział w obu badaniach.

Planuje się wykorzystanie minimalnej liczby zwierząt potrzebnych do otrzymania założonych w projekcie danych dotyczących zmienności w 2 grupach zwierząt: kontrolnych i badanych dla myszy 3-miesięcznych ($2 \times (8+2)$ sztuk = 20). Zmniejszenie liczby zwierząt może skutkować brakiem wystarczających danych do analizy statystycznej, co może zaważyć na powodzeniu całego doświadczenia.

Uwzględnienie zasady udoskonalenia:

Myszy wykorzystywane do zaplanowanych doświadczeń utrzymywane będą w warunkach zapewniających dobrostan. Zastosowane procedury charakteryzują się niską inwazyjnością oraz będą przeprowadzane z maksymalnym ograniczeniem bólu, strachu i stresu, jaki miałyby dotyczyć badanych zwierząt. Personel sprawujący opiekę nad zwierzętami oraz przeprowadzający doświadczenia odznacza się wysokimi kwalifikacjami i kompetencjami, eliminując prawdopodobieństwo błędów.

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.