

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu Wyprowadzenie linii myszy z delecją genu *Tent2* przy pomocy metody CRISPR/Cas9

2. Czas trwania projektu: 2 lata

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) niekanoniczna polimeraza poli(A), TENT2, GLD2, infekcja wirusowa

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 proponowanego doświadczenia jest wyprowadzenie linii myszy z delecją (usunięciem) genu *TENT2* (*GLD2*). Gen ten koduje enzym odpowiedzialny za dodawanie ogonów poli(A) do mRNA w obszarze cytoplazmy (polimerazę poli(A)), dzięki czemu „uśpione” transkrypty stają się aktywne translacyjnie.

Najnowsze dane z bezpośrednich sekwencjonowań RNA wskazują, że tego typu enzymy mogą odgrywać istotną rolę w rozwoju infekcji wirusowej wirusów, w tym SARS-COV2. Odkryto, że długość ogonów poli(A) wirusowych cząsteczek RNA zwiększa się w trakcie infekcji z 30 na 60 nukleotydów – tego typu zmiany nie mogą być losowe. Wydłużenie ogona poli(A) wiąże się ze zwiększeniem stabilności mRNA, a co za tym idzie, z większą produkcją białek wirusowych. Co istotne, genom wirusa SARS-Cov2 nie koduje żadnego białka, które mogłoby wydłużać ogon poli(A).. Oznacza to, że wirus najprawdopodobniej korzysta z

enzymów gospodarza (chorego). Stawiamy hipotezę, że czasowe zablokowanie aktywności enzymów dodających ogon poli(A) może spowodować mniejszą aktywność wirusa, a co za tym idzie łagodniejszą infekcję.

Znanych jest 5 ssaczych niekanonicznych polimeraz poli(A), z czego jedna (TENT5D) eksprymowana jest wyłącznie w jądrach, z związku z czym pozostają 4 enzymy, które mogą modulować poziom infekcji wirusowej. Dysponujemy już liniami myszy z delecjami w genach *TENT5A-TENT5C*, w przedstawianym projekcie prosimy o zgodę na wyprowadzenie linii z mutacją w genie *TENT2*. Po wyprowadzeniu linii myszy, ze zwierząt wyizolujemy makrofagi, które następnie zakażane będą mysim koronawirusem i monitorowany będzie poziom zakażenia, a w celu oceny długości ogonów poli(A) przeprowadzone zostanie bezpośrednie sekwencjonowanie RNA. Nie przewidujemy, żeby wyprowadzona linia myszy wykazywała szkodliwy fenotyp.

W doświadczeniach wykorzystane zostaną zygoty myszy, izolowane z układu rozrodczego samic, stymulowanych hormonalnie i uśmiercanych. Zastosowane hormony, indukujące wzrost pęcherzyków jajnikowych i owulację, są substancjami niedrażniącymi. Oba zastrzyki będą wykonywane w dolnym rejonie brzucha, w miejscu, które nie jest specjalnie uwrażliwione na ból, zatem źródłem bólu będzie jedynie ukłucie igłą. W celu uzyskania zwierząt transgenicznych zarodki będą transplantowane do jajowodów samic biorecipient, pokrytych uprzednio przez samce poddane wazektomii. Przeszczepianie zarodków u samic i wazektomia u samców będą wykonywane w znieczuleniu ogólnym, a ewentualny ból pooperacyjny będzie uśmierzany środkami przeciwbólowymi.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Mus musculus, samice - C57BL6/J/Tar x CBA/Tar – 12 osobników

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując projekt badawczy, sprawdziłam/sprawdziłem istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazach danych:

Pubmed, Google Scholar, ScienceDirect, Ebsco, OMIM

Wykorzystałam/em słowa kluczowe: poly(A) polymerases, TENT2, viral infection, genomic viral RNA

Na podstawie przeszukania istniejącej literatury, stwierdzam że:

A. Nagromadzony materiał badawczy pozwala na stwierdzenie, że: regulacja długości ogona poli(A) jest jednym ze sposobów postranskrypcyjnej regulacji genów. Dłuższy ogon poli(A) koreluje ze zwiększoną stabilnością mRNA, a co za tym idzie wyższą ekspresją białek. Po infekcji przez wirusy RNA o dodatniej polaryzacji, w tym SARS-COV2 długość ogona poli(A) RNA wirusowego jest znacznie zwiększana. Genom

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

wirusowy nie koduje żadnego białka o potencjalnej aktywności cytoplazmatycznej poli(A) polimerazy. Potencjalnymi enzymami odpowiedzialnymi za wydłużanie ogona poli(A) RNA wirusa, a więc za modulację poziomu infekcji wirusowej są cytoplazmatyczne polimerazy poli(A) gospodarza, w tym TENT2.

B. Brak jest danych dotyczących: nie istnieją bezpośrednie doniesienia na temat roli polimerazy TENT2 w przebiegu infekcji wirusowej

Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na:

Rozwinięcie teoretyczne/poznawcze istniejącej wiedzy w kierunku: Biorąc po uwagę, że dysponujemy liniami z delecjami genów TENT5A-D, wyprowadzenie linii z delecją genu TENT2 pozwoli na zbadanie wpływu wszystkich niekanonicznych polimeraz poli(A) na przebieg infekcji wirusowej przez wirusy z rodziny *Coronaviridae*.

Zastosowanie uzyskanej wiedzy polegające na: zrozumienie mechanizmu wydłużania ogona poli(A) RNA wirusa podczas infekcji, a w szczególności identyfikacja białek gospodarza biorących w tym udział, pozwoli w przyszłości na opracowanie inhibitorów, mogących być lekami przeciwwirusowymi.

Zastąpienie: Przebieg infekcji wirusowej może być wiarygodnie zbadany jedynie przy użyciu zwierząt lub wyprowadzonych z nich pierwotnych linii komórkowych.

Ograniczenie: Wyprowadzenie linii myszy z mutacją w genie TENT2 pozwoli zmniejszyć liczbę użytych zwierząt w porównaniu do każdorazowego wyciszania genu w liniach pierwotnych. Wedle naszej wiedzy jesteśmy pierwszym i jedynym zespołem w Polsce wyprowadzającym myszy transgeniczne metodą CRISPR-Cas9. Metoda ta pozwala na znaczne zmniejszenie liczby wykorzystanych zwierząt, w stosunku to klasycznej inżynierii genetycznej opierającej się o embrionalne komórki macierzyste. Dzięki zastosowaniu tej metody modyfikacje genetyczne wprowadzane są ze znacznie większą częstością oraz dodatkowo pozwala ona na pominięcie etapu tworzenia chimer. Zastosowanie innowacyjnej mieszaniny do iniekcji zwiększa częstość wprowadzanych modyfikacji, a tym samym zmniejsza liczbę myszy niezbędnych do wyprowadzenia linii transgenicznej.

Udoskonalenie: Zarodki będą nastrzykiwane przy użyciu wysokiej klasy mikroiniektora, a zabieg będzie wykonywany przez wytrenowany personel, dzięki czemu znacznie zwiększona będzie przeżywalność zarodków. myszy po operacjach otrzymują kompleksową ochronę przeciwbólową.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną²

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

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

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

☒ NIE