

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: „Pax7 jako "przełącznik" regulujący wczesne i zaawansowane etapy miogenicznego różnicowania komórek pluripotencjalnych *in vivo*”

2. Czas trwania projektu: 01.10.2017 - 01.05.2022

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): miogeneza, Pax7, ESC, iPSC, potworniaki

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.

Zarodkowe komórki macierzyste ssaków (ESC, embryonic stem cells) oraz indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (iPSC, induced pluripotent stem cells), charakteryzuje pluripotencja czyli zdolność do różnicowania we wszystkie komórki pochodzące z trzech listków zarodkowych oraz nieograniczony potencjał do odnowy swojej populacji. W prowadzonych badaniach skupiamy się na analizach różnicowania i potencjalnego zastosowania komórek macierzystych w regeneracji mięśni szkieletowych. Wiedza na temat regulacji uzyskiwania mioblastów z komórek pluripotencjalnych, takich jak ESC czy iPSC, jest jednak niewystarczająca, co uniemożliwia ich zastosowanie kliniczne. ESC oraz iPSC wszczepione pod skórę myszy tworzą potworniaki - łagodne nienowotworowe guzy, w których komórki mogą osiągać bardzo zaawansowane etapy formowania tkanek tworząc np. włókna mięśniowe. Obiektem moich badań jest gen Pax7 kodujący czynnik transkrypcyjny kluczowy dla powstawania komórek prekursorowych mięśni szkieletowych podczas rozwoju zarodkowego oraz komórek macierzystych obecnych w dojrzałych mięśniach szkieletowych –

komórek satelitowych. Celem mojego projektu jest stwierdzenie jaką funkcję pełni Pax7 podczas wczesnych i zaawansowanych etapów miogenicznego różnicowania ESC/iPSC *in vivo* aż do stadium „dojrzałych” włókien mięśniowych, których uzyskanie w warunkach *in vitro* jest niemożliwe. **Pod skórę myszy wstrzyknę punktowo ESC lub iPSC linii Pax7+/+ lub Pax7-/-**. Po około 30 dniach komórki uformują guzy o średnicy 1 cm, które nie powinny powodować żadnych dolegliwości u zwierząt. **Jedynie błędne rozproszenie komórek podczas wstrzykiwania może spowodować naciekanie narządów przez powstający guz. Myszy zostaną uśmiercone a guzy wyizolowane do dalszych analiz.** Badanie różnicowania ESC może przybliżyć ich zastosowanie w medycynie regeneracyjnej oraz pozwoli zrozumieć dlaczego metody różnicowania miogenicznego komórek pluripotencjalnych *in vitro* są jak na razie tak mało wydajne.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

160 samców myszy krzyżówki F1 (C57Bl/6 x 129sv).

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

ZASADA ZASTĄPIENIA:

Przed zaplanowaniem doświadczenia sprawdziłam aktualny stan wiedzy na temat różnicowania komórek pluripotencjalnych do etapu włókien mięśniowych. Wykorzystałam bazy PubMed, GoogleScholar używając słów kluczowych: pluripotent stem cells, ESC, iPSC, muscle fiber, myogenesis, satellite cells, teratoma.

Na podstawie przeszukania istniejącej literatury, stwierdzam, że proponowane badania dotyczą aktualnych problemów związanych z pełnym zrozumieniem różnicowania komórek macierzystych. W literaturze istnieją sprzeczne doniesienia dotyczące funkcji czynnika Pax7 podczas różnicowania komórek miogenicznych. W pracy Collins i współpracowników wykazano, że nadekspresja Pax7 zwiększa proliferację hodowanych *in vitro* mioblastów. Natomiast inne dane dowodzą, że nadekspresja Pax7 w mioblastach linii MM14 hamuje cykl komórkowy. Również w przypadku anty-apoptotycznej funkcji czynnika Pax7 zdania są podzielone. Pax7 ma więc wiele funkcji a wiedza na temat jego roli w miogenezie i cyklu komórkowym nie jest jednoznaczna i w pełni zbadana. Ponadto większość analiz ESC przeprowadza się wykorzystując modele różnicowania *in vitro*. Takie podejście nie odzwierciedla zachowania się komórek *in vivo*. Nawet najbardziej złożony układ *in vitro* nie jest w stanie w pełni odwzorować złożonych interakcji panujących w tkance. Różnicowanie ESC oraz iPSC *in vitro* pozwala tylko na uzyskanie mioblastów oraz miotub. W 2015 roku opublikowano pracę, w której opisano metodę różnicowania ESC zapewniającą uzyskanie włókien mięśniowych w hodowli *in vitro*. Metoda

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

ta ma jednak swoje ograniczenia, gdyż uzyskane przez badaczy włókna mięśniowe nie były unerwione. Powstanie połączeń nerwowo-mięśniowych jest warunkiem pełnej „dojrzałości” i funkcjonalności włókien mięśniowych. Miotuby tworzą bowiem włókna mięśniowe dopiero gdy ulegną unerwieniu. Utkanie nerwowe, gwarantujące powstanie włókien mięśniowych, towarzyszy miotubom powstającym w mięśniach szkieletowych, jak również w potworniakach. W badaniach nad komórkami macierzystymi potworniaki postrzegane są jako "złoty standard" do oceny pluripotencji *in vivo*, gdyż skomplikowane mikrośrodowisko wewnątrz guza (niemożliwe do uzyskania w warunkach *in vitro*) jest odzwierciedleniem warunków panujących w rozwijającym się zarodku. Ponadto, obecność w oddzielnych niszach guza komórek na różnych etapach różnicowania zapewnia wyjątkową możliwość badania w jednym "układzie" szerokiego spektrum efektów.

Poza różnicowaniem komórek w potworniakach, jedynym dostępnym modelem badawczym, umożliwiającym eksperymentalne uzyskanie tkanek na końcowych etapach różnicowania, np. włókna mięśni szkieletowych, jest uzyskiwanie zwierząt chimerowych. Jednakże uzyskiwanie chimer wiąże się ze znacznie większą liczbą zwierząt potrzebnych do przeprowadzenia eksperymentu oraz znacznie dotkliwszymi/cieęższymi procedurami przez które muszą przejść w porównaniu do zaproponowanych przeze mnie procedur z wykorzystaniem potworniaków. Dlatego uważam za zasadne zastąpienie uzyskiwania myszy chimerowych, mniej obciążającym dla zwierząt, modelem potworniaków. Wybrany przeze mnie model pełnego różnicowania ESC oraz iPSC aż do stadium, „dojrzałych” włókien mięśniowych z całą pewnością umożliwi uzyskanie i analizę mioblastów, miotub oraz co najważniejsze unerwionych włókien mięśniowych i towarzyszących im komórek satelitowych. Z tego powodu do określenia potencjału ESC oraz iPSC do różnicowania we włókna mięśniowe postanowiliśmy zastosować model *in vivo*.

ZASADA OGRANICZENIA:

Eksperyment jest zaplanowany w ten sposób, aby użyte było jak najmniej zwierząt przy zachowaniu liczebności grupy umożliwiającej otrzymanie wyników istotnych statystycznie.

ZASADA UDOSKONALENIA:

Doświadczenia będą wykonywane przez osoby z wieloletnim doświadczeniem w pracy ze zwierzętami, które będą dbały o ich dobrostan. W trakcie zabiegu zastosowane zostaną środki znieczulające i przeciwbólowe, co pozwoli na ograniczenie bólu i cierpienia zwierząt.

Zaplanowane doświadczenie było poprzedzone doświadczeniami *in vitro* oraz *in vivo* w uszkodzonym mięśniu szkieletowym. Uzyskanie danych z nowego projektu pozwoli na pełniejsze zdefiniowanie roli Pax7 i innych regulatorów miogenezy, podczas zaawansowanych etapów różnicowania miogenicznego komórek ESC oraz iPSC w mioblasty i włókna mięśniowe. Dodatkowo uzyskane wyniki badań mogą przyczynić się do bardziej świadomego wykorzystania komórek macierzystych w terapiach rozległych uszkodzeń czy też dysfunkcji mięśni wywołanych przez choroby o podłożu genetycznym, np. dystrofii.