

# NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu Wyprowadzenie linii myszy z mutacją w genie [REDACTED] przy pomocy metody CRISPR/Cas9

2. Czas trwania projektu 15.10.2019-15.10.2021 (2 lata)

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) Mózgowe porażenie dziecięce, spastyczność, mielinizacja, mutacja non-stop

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 wyprowadzenie linii myszy niosących mutację heterozygotyczną mutację typu *non-stop* w genie związanym z prawidłową adhezją komórek, analogiczną do tej znalezionej niezależnie u 3 różnych pacjentów. Linia zostanie wyprowadzona przy użyciu metody CRISPR-Cas9. Pacjenci wykazują podobny obraz kliniczny na który składają się:

- objawy przypominające mózgowe porażenie dziecięce, jednak bez występowania zmian niedotlenieniowych
- duża spastyczność
- nieprawidłowy rozwój lokomotoryczny

- obraz MRI wskazujący na opóźnioną mielinizację

- brak zaburzeń metabolicznych, które mogłyby powodować zmiany o charakterze neurodegeneracyjnym.

W doświadczeniach wykorzystane zostaną zygoty myszy. Będą one izolowane z układu rozrodczego samic, stymulowanych hormonalnie i uśmiercanych. Zastosowane hormony, indukujące wzrost pęcherzyków jajnikowych i owulację, są substancjami niedrażniącymi. Iniekcje hormonów 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 biorecznych, pokrytych uprzednio przez samce poddane wazektomii. Przeszczepianie zarodków u samic i wazektomia u samców będą wykonywane w znieczuleniu ogólnym, a ewentualny ból pooperacyjny będzie uśmierczany środkami przeciwbólowymi.

Możemy jedynie przewidywać fenotyp wyprowadzanej linii. Przypuszczamy, że myszy mogą wykazywać objawy podobne do pacjentów, w szczególności zaburzenia lokomotoryczne. Zakładamy, że fenotyp będzie znacznie mniej poważny niż w przypadku linii myszy z całkowitą delecją badanego genu, ze względu na fakt, że w wyprowadzanej linii wciąż w pełni funkcjonalna będzie jedna kopia genu. Wstępnie, bazując na fenotypie pacjentów oceniamy, że myszy będą wykazywać szkodliwy fenotyp na poziomie nie wyższym niż umiarkowany.

Do wyprowadzenia linii myszy transgenicznych i wstępnej oceny ich fenotypu niezbędne są 4 procedury:

1. Wazektomia u samców, które będą następnie użyte do pokryć samic-biorecznych.
2. Podanie egzogennych hormonów gonadotropowych w iniekcji dootrzewnowej w celu wywołania owulacji u samic-dawczyń, skojarzenie ich z samcami i uzyskanie zygot, które zostaną następnie nastrzyknięte mieszaniną CRISPR i hodowane do osiągnięcia stadium dwukomórkowego.
3. Transfer zarodków poddanych CRISPR do jajowodów samic-biorecznych w ciąży rzekomej.
4. Hodowla myszy mogących wykazywać szkodliwy fenotyp, w celu określenia jego stopnia.

## 6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Mus musculus, samice C57BL6/J /cmdb – 16

Mus musculus, samice F1(C57BL6/J /cmdb x BALB/ccmdb) – 6

Mus musculus, samce F1(C57BL6/J /cmdb x BALB/ccmdb) -2

Mus musculus, C57BL6/J /cmdb (heterozygotyczne względem badanego genu) – 14

Łącznie **38 myszy**

## 7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA<sup>1</sup>

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

---

<sup>1</sup> Przy wypełnianiu wzorować się na instrukcji wypełniania wniosku W1 punkt. 8

Pubmed, Google Scholar, ScienceDirect, Ebsco, OMIM

**Wykorzystałam/em słowa kluczowe:** (nazwa badanego genu), demyelination, spasticity, **Na**

**podstawie przeszukania istniejącej literatury, stwierdzam że:**

**A. Nagromadzony materiał badawczy pozwala na stwierdzenie, że:** mutacja typu *non-stop* w badanym genie dużym prawdopodobieństwem jest przyczyną fenotypu przypominającego mózgowie porażenie dziecięce; mutację znaleziono niezależnie u 3 różnych pacjentów prezentujących podobny obraz kliniczny;

**B. Brak jest danych dotyczących:** nie istnieje linia myszy z mutacją typu *non-stop* w badanym genie powodująca powstanie białka o wydłużonej długości; nie są znane molekularne konsekwencje tego typu mutacji; nieznany jest wpływ wydłużonej formy białka na opóźnienie mielinizacji.

**Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na:**

**Rozwinięcie teoretyczne/poznawcze istniejącej wiedzy w kierunku:**

- potwierdzenie, że mutacja w badanym genie jest odpowiedzialna za objawy obserwowane u pacjentów
- potwierdzenie, że mutacja w badanym genie powoduje opóźnienie mielinizacji neuronów i zbadanie kinetyki zmian
- zrozumienie molekularnych podstaw mechanizmu istnienia efektu negatywno dominującego w przypadku powstania wydłużonej formy białka

**Zastosowanie uzyskanej wiedzy polegające na:** wyodrębnienie nowej podjednostki chorobowej obejmującej chorych z objawami mózgowego porażenia dziecięcego, bez zmian niedotlenieniowych; w przyszłości potencjalne wskazanie nowej strategii terapeutycznej

**Zastąpienie:** badanie zjawisk związanych z mineralizacją w kontekście ludzkich chorób możliwe jest jedynie u organizmów, u których przebieg tego procesu jest analogiczny jak u ludzi, a więc w tym przypadku u zuchwów. Nie jest więc możliwe wykonanie tego typu doświadczeń na niższych eukariontach. Nie są też dostępne metody *in vitro* umożliwiające odwzorowanie procesów mielinizacji w ludzkim mózgu bez udziału zwierząt.

**Ograniczenie:** 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. Linia myszy będzie utrzymywana w stanie heterozygotycznym (klatki rozrodcze WT x heterozygota).

**Udoskonalenie:** Zarodki będą nastrzykiwane przy użyciu wysokiej klasy mikroiniektora, a zabieg będzie wykonywany przez wytrenowany personel, dzięki czemu znacznie zwiększona będzie przeżywalność zarodków.

Myszy będą utrzymywane w systemie IVC, co zwiększa ich dobrobyt. Wszystkie myszy po operacjach otrzymują kompleksową ochronę przeciwbólową.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną<sup>2</sup>

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

TAK - na podstawie art. 53 ust. 3 ustawy

X NIE

---

<sup>2</sup> Wypełnia właściwa lokalna komisja etyczna ds. doświadczeń na zwierzętach. Należy zaznaczyć właściwe pole.