

# NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu Wyprowadzenie linii myszy z „humanizowanym” genem Prm1 przy pomocy metody CRISPR/Cas9

2. Czas trwania projektu 2 lata

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): spermatogeneza, plemnik, główka, kondensacja chormatyny, protaminy

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 przedstawianego projektu jest wyprowadzenie linii myszy transgeniczných z mutacjami punktowymi w genie Prm1, kodującym protaminę 1 – białko zastępujące histony podczas późnych etapów spermatogenezy. Linia myszy transgeniczna zostanie wyprowadzona przy pomocy metody CRISPR/Cas9.

W końcowych etapach spermatogenezy jądro plemnika ulega drastycznej reorganizacji i kondensacji. Protaminy odgrywają ważną rolę w zagęszczaniu chromatyny, a zatem może także odgrywać ważną rolę w kształtowaniu jąder. Kształt plemników różni się znacząco między gatunkami ssaków, również między człowiekiem a myszą – plemniki człowieka mają okrągłą główkę, podczas gdy mysie są haczykowate. Nie jest jasne skąd wynika różnica w kształcie pomiędzy plemnikami.

Sekwencja genu kodującego protaminę różni się pomiędzy myszami a ludźmi. Postawiono hipotezę, że różnice w budowie białka mysiego i ludzkiego mają bezpośredni wpływ na kształt główki plemnika. Aby potwierdzić hipotezę

planujemy wyprowadzić linię myszy transgenicznych z genem protaminy zmutowanym tak, by sekwencja była jak najbardziej podobna do sekwencji ludzkiej.

Mimo wieloletnich badań, dokładny wpływ protaminy na kształtowanie główki plemnika pozostaje niejasny. Samce myszy z heterozygotyczną mutacją *Prm1* mają ograniczoną płodność – zapłodnienie spontaniczne nie zachodzi, natomiast możliwe jest zapłodnienie *in vitro* po usunięciu osłonki przejrzystej oocytu. Kształt plemników jest często nieprawidłowy, lecz większość nieprawidłowości dotyczy ogonu plemnika, kształt główki nie odbiega od normy częściej, niż w przypadku myszy dzikich. Co bardzo istotne, mutacje i polimorfizmy w genie *Prm1* związane są z męską niepłodnością u ludzi. Interesujące jest, że niektóre z polimorfizmów wydają się być związane z niepłodnością idiopatyczną, w której parametry spermy nie odbiegają od normy. Istnieją również doniesienia o kluczowym wpływie niektórych z mutacji genu *Prm1* na rozwój ludzkich zarodków powstałych podczas procedury ICSI. Stąd zrozumienie dokładnej roli protaminy 1 w zapłodnieniu i pre-implantacyjnym rozwoju zarodka jest niezwykle ważne.

Uważamy, że wyprowadzenie linii myszy z „humanizowanym” genem *Prm1* jest istotne z kilku powodów. Po pierwsze, na podstawie wyników badań spermy myszy będziemy mogli sprawdzić czy zagęszczenie jądrowe i przebudowa podczas spermatogenezy są wynikiem działania sił zewnętrznych (przeważający pogląd), czy też siły wewnętrzne, czyli działanie protaminy może odgrywać istotną rolę. Po drugie, sprawdzimy czy subtelne zmiany w sekwencji protaminy 1 mogą mieć dramatyczny wpływ na wzór zagęszczenia jądrowego. Po trzecie, wyprowadzenie linii myszy z mutacjami punktowymi w genie *Prm1* pozwoli na weryfikację użyteczności wykorzystania fibroblastów wyrażających protaminę jako modelu do badania reorganizacji DNA podczas tworzenia gamet. Potwierdzenie zmiany kształtu plemników oznaczałoby, że dalsze doświadczenia dotyczące mechanizmów leżących u podstaw przemodelowania jądrowego podczas spermatogenezy mogłoby być prowadzone na takim uproszczonym systemie komórkowym, co w przyszłości ograniczyłoby konieczność wykorzystywania modeli mysich.

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 biorczyń, 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.

Samice-biorczynie nie będą uśmiercane, po odchowaniu młodych będą hotelowane lub (jeśli lekarz weterynarii wyrazi zgodę) wykorzystywane w innych doświadczeniach. Wazektomowane samce będą utrzymywane w zwierzętarni do naturalnej śmierci lub zaobserwowania niepokojących objawów; będą wykorzystywane do krycia samic-biorczyń w tym i kolejnych doświadczeniach (procedury hodowlane). Samice-dawczynie, w celu izolacji zarodków, będą uśmiercane przez dyslokację kręgów szyjnych.

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

Mus musculus, samice C57BL6/J/cmdb – 16 osobników

Mus musculus, samice F1(C57BL6/J /cmdb x BALB/ccmdb) – 7 osobników

Mus musculus, samce F1(C57BL6/J /cmdb x BALB/ccmdb) – 5 osobników

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

---

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

**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:** Protamine 1, Prm1, humanized Prm1 gene, spermatogenesis

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

**A. Nagromadzony materiał badawczy pozwala na stwierdzenie, że:** protaminy jako białka biorące udział w kondensacji chromatyny jądra plemników są kluczowe dla prawidłowego przebiegu spermatogenezy. Bardzo prawdopodobnym jest że od sekwencji aminokwasowej białka Prm1 zależy kształt jąder mysich plemników.

**B. Brak jest danych dotyczących:** nie istnieje linia myszy ekspresująca „humanizowaną” protaminę 1, nie jest znany mechanizm regulacji kształtu główki plemnika **Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na:**

**Rozwinięcie teoretyczne/poznawcze istniejącej wiedzy w kierunku:** proponowany projekt pozwoli lepiej zrozumieć mechanizm formowania się główki plemnika ssaczego, w szczególności roli protaminy 1 w determinacji jego kształtu

**Zastosowanie uzyskanej wiedzy polegające na:** zrozumienie mechanizmów formowania główki plemników ssaczych może w przyszłości pozwolić na nowe podejścia do problemu męskiej niepłodności wśród ludzi; dodatkowo, wyprowadzenie linii myszy z mutacjami punktowymi w genie Prm1 pozwoli na weryfikację użyteczności wykorzystania fibroblastów wyrażających protaminę jako modelu do badania reorganizacji DNA podczas tworzenia gamet.

**Zastąpienie:** Spermatogeneza jest skomplikowanym procesem, w który zaangażowane jest wiele typów komórek, nie jest możliwe odwzorowanie jej *in vitro*, bez użycia modelu zwierzęcego; użycie zwierząt jest niezbędne w celu weryfikacji użyteczności uproszczonego modelu komórkowego, który w przyszłości mógłby mieć zastosowanie w celu badania kondensacji DNA

**Ograniczenie:** Metoda CRISPR-Cas9 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 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

☐ NIE

---

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