

# NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: Wyprowadzenie linii myszy z mutacją w rejonie 3'UTR genu przy użyciu metody CRISPR-Cas9

2. Czas trwania projektu: 2 lata (10.10.2018-10.10.2020)

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): translacja synaptyczna, miRNA, rozwój synaps, kolce dendrytyczne

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 transgeniczných z mutacją w rejonie 3'UTR (rejon 3' niepodlegający translacji) badanego genu. Wprowadzona mutacja ma za zadanie usunąć miejsce wiązania jednego z miRNA, które znajduje się w tym rejonie. Wstępne badania przeprowadzone na pierwotnych hodowlach neuronalnych wskazują, że miRNA mogą regulować synaptyczną translację badanego genu.

Badane białko odgrywa kluczową rolę w plastyczności synaptycznej, która leży u podłoża funkcjonowania mózgu. Zaburzenia ekspresji synaptycznej badanego białka są związane z różnymi schorzeniami mózgu, takimi jak padaczka, zaburzenia ze spektrum autyzmu, schizofrenia czy uzależnienie od alkoholu i kokainy. Badane białko

ulega lokalnej translacji na synapsie. Ekspresja oraz wydzielanie MMP-9 jest regulowane w odpowiedzi na pobudzenie synaptyczne.

MikroRNA (miRNA) są to małe, niekodujące cząsteczki RNA, które wiążą się do specyficznej sekwencji w docelowym mRNA, co prowadzi do zahamowania translacji białka. MiRNA zlokalizowane w neuronach w dendrytach wpływają na rozwój synaps i kolców dendrytycznych oraz aktywność synapsy poprzez regulację lokalnej syntezy białek. Ekspresja miR-132 jest indukowana po pobudzeniu neuronalnym. MiR-132 jest zaangażowany w regulację procesów plastyczności synaptycznej poprzez modulację kształtu kolców dendrytycznych oraz transmisji synaptycznej.

Aby zweryfikować czy mRNA badanego genu jest istotnie regulowane przez badane miRNA w neuronach *in vivo* oraz czy ta interakcja ma znaczenie fizjologiczne, planujemy stworzenie myszy transgenicznej. Przy użyciu metody CRISPR-Cas9 planujemy wprowadzić mutację w regionie 3'UTR badanego genu. Dzięki wprowadzonej mutacji możliwe będzie kompleksowe zbadanie wpływu miRNA na regulację ekspresji badanego genu i skutki fizjologiczne tej interakcji. W dalszych doświadczeniach planujemy skupić się szczególnie na funkcjonowaniu kory wzrokowej, gdyż w tym regionie mózgu ekspresja badanego genu jest bardzo zróżnicowana w trakcie rozwoju myszy. Z wykorzystaniem wyprowadzonej linii myszy wykonany będzie szereg doświadczeń molekularnych (w szczególności badania synaptoneurosomów), a także testy behawioralne (nieuwzględnione w proponowanym wniosku).

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

18 myszy (*Mus musculus*) F1(C57BL/6/TarxCBA/Tar)

## 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:**

Pubmed, Google Scholar, ScienceDirect, Ebsco

**Wykorzystałam/em słowa kluczowe:** (nazwa badanego genu), miR-132, matrix metalloproteinase, Gelatinase B

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

---

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

- A. Nagromadzony materiał badawczy pozwala na stwierdzenie, że:** jedno z miRNA wiąże się z rejonem 3'UTR badanego genu, przez co potencjalnie może regulować jego synaptyczną translację a co za tym idzie wpływać na plastyczność strukturalną kolców dendrytycznych. Mutacje w w badanym genie (w tym w jego rejonie 3'UTR) znajdowane są u pacjentów z różnymi zaburzeniami psychiatrycznymi i neurologicznymi.
- B. Brak jest danych dotyczących:** nie istnieje linia myszy transgeniczna, w której wprowadzono analogiczną mutację. Nieznana jest rola badanego miRNA w regulacji translacji badanego genu na poziomie organizmu.
- Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na:**

- A. Rozwinięcie teoretyczne/poznawcze istniejącej wiedzy w kierunku :** wyprowadzenie linii myszy, które mogą przyczynić się do poznania mechanizmów molekularnych wpływających na plastyczność synaptyczną.
- B. Zastosowanie uzyskanej wiedzy polegające na:** zaburzenia ekspresji badanego genu związane są z występowaniem takich chorób jak schizofrenia, choroba afektywna dwubiegunowa czy zaburzenia ze spektrum autyzmu. Poznanie mechanizmów ekspresji badanego genu i ich związku z plastycznością synaptyczną może przyczynić się do lepszego zrozumienia patogenezy tych chorób.

**Zastąpienie:** Badania z zakresu fizjologii mózgu nie są możliwe na zwierzętach bezkręgowych, ponieważ wykształcany u nich układ nerwowy (jeśli obecny) jest zbyt prosty i nie daje odniesienia do układu zwierząt kręgowych.

**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. Modyfikacje wprowadzane są ze znacznie większą częstością oraz omijamy etap chimer. Zastosowanie innowacyjnej mieszaniny do iniekcji zwiększa częstość wprowadzanych modyfikacji, a tym samym zmniejsza liczbę myszy niezbędnych do wyprowadzenia linii transgenicznej. Używamy hybryd F1(C57BL/6/TarxCBA/Tar), które bardzo dobrze odpowiadają na stymulację hormonalną, dzięki czemu zmniejszymy liczbę niezbędnych dawczyń zarodków.

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

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

---

<sup>2</sup> 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

x NIE