

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: Badanie wpływu szlaku mTOR na pamięć, uczenie się i zachowanie społeczne danio pręgowanego z wykorzystaniem analizy behawioralnej.
2. Czas trwania projektu: 26/04/2017-25/04/2021
3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) danio pręgowany/rozwój embrionalny/autyzm/układ nerwowy/mTOR
4. Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych): A

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.

Głównym celem proponowanych badań podstawowych jest analiza wpływu szlaku mTOR na zachowania społeczne oraz na procesy uczenia się i pamięci u danio pręgowanego. Funkcja białka mTOR w neuronach jest częściowo poznana. Wiadomo, że białko to uczestniczy w procesach proliferacji, migracji i różnicowania neuronów, a jego brak lub nadmierna aktywacja prowadzą do stanów patologicznych. Myszy bez białka mTOR umierają we wczesnym rozwoju zarodkowym.. Z kolei mutacje w genach kodujących białka TSC1 lub TSC2, które tworzą kompleks hamujący aktywność białka mTOR, prowadzą do stwardnienia guzowego u człowieka. W chorobie tej dochodzi do nadmiernej aktywacji szlaku mTOR, a głównymi objawami są epilepsja, autyzm oraz niepełnosprawność umysłowa. W jaki sposób dochodzi do

rozwoju tych symptomów (link między nadmierną aktywnością mTORa a danymi fenotypami na poziomie zachowania) jest nieznane. Dlatego też chcielibyśmy początkowo sprawdzić, czy nasze modele naśladują te symptomy, a następnie wykonać analizę behawioru i zinterpretować wyniki w kontekście (częściowo) otrzymanych już przez nas fenotypów molekularnych i komórkowych.

Dane uzyskane dzięki temu projektowi będą źródłem cennych informacji dla zrozumienia mechanizmów rozwoju neuronów kontrolowanych przez białko mTOR na poziomie behawioralnym. Wiedza zdobyta z analizy porównawczej pomiędzy mechanizmami u ryby danio pręgowanego i u człowieka otworzy nowe kierunki badań obejmujące danio pręgowanego jako model stwardnienia guzowego lub nawet autyzmu u ludzi, przyczyniając się do rozwoju diagnostyki i metod leczenia tych chorób.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

7470 larw z gatunku Danio pręgowany (łac. *Danio rerio*)

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA

Przygotowując projekt badawczy sprawdzono istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym w bazach danych: PUBMED, ScienceDirect, Web of Science (JCR).

3R: zamiana na inny model (replacement)

Nasze wcześniejsze badania opierają się o model danio pręgowanego, gdyż wyciszenie genu mTOR jest letalne w innych modelach kręgowców (mysz, szczur). Z tego też powodu chcielibyśmy kontynuować nasze badania na tym samym modelu. Testy lokomotoryczne wykonujemy na larwach do 5 dnia po zapłodnieniu, ponieważ motoryka rozwija się szybko w larwach ryby. Na podstawie analizy istniejącej literatury wynika, że procesy uczenia się i pamięci [Andersson et al. 2015] oraz zachowania społeczne [Dreosti et al. 2015] kształtują się później w rozwoju larwalnym danio pręgowanego, dlatego też testy behawioralne muszą zostać wykonane na starszych rybach. Z tego powodu zamiana na inne, młodsze larwy (do 5 dnia po zapłodnieniu) jest niestety niemożliwa.

3R: minimalizacja liczby zwierząt (reduction)

Ryby będą genotypowane na wcześniejszym stadium rozwoju (4 dni po zapłodnieniu, z użyciem anestezji MS-222), co będzie skutkowało mniejszą ich liczbą (pewniejsze pokrycie genotypów). Mendlowski rozkład genotypów wynosi $\frac{1}{4}$ typów dzikich i homozygot oraz $\frac{1}{2}$ heterozygot. Gdyby do eksperymentu brać larwy losowo, bez wcześniejszego genotypowania, pokrycie genotypów w eksperymencie nie byłoby równomierne. Dodatkowo, z naszych doświadczeń wynika, że ryby homozygotyczne TSC2^{vu242/vu242} są rzadkie (5-10%). Przyżyciowe genotypowanie na wcześniejszym stadium rozwoju pozwoli uwzględnić równomierny rozkład genotypów (równe n dla wszystkich genotypów), co pozwoli na redukcję liczby zwierząt użytych w doświadczeniu.

3R: minimalizacja dyskomfortu zwierząt (refinement)

Ryby będą hodowane razem do momentu osiągnięcia wieku potrzebnego do danej procedury. Będą karmione codziennie, woda będzie zmieniana codziennie. Procedury będą przeprowadzane na osobnych rybach, minimalizując dyskomfort. Każda procedura kończy się znieczuleniem ryby (80 mg/l MS-222) oraz eutanazją poprzez przedawkowanie środka znieczulającego (200-300 mg/l MS-222).

Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na rozszerzenie wiedzy na temat udziału szlaku mTOR w regulacji zachowań społecznych (w kontekście autyzmu) oraz uczenia się i pamięci (w kontekście poprawnego funkcjonowania układu nerwowego oraz niepełnosprawności intelektualnej).