

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: Funkcja białka PML i ciałek jądrowych PML w zakręcie zębatym hipokampa dorosłych myszy z nadekspresją bądź wyciszeniem (knock-out) genu PML.

2. Czas trwania projektu: 3 lata

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): PML, nadekspresja, knock-out, Cas9, mysz

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.

Białko PML jest istotnym regulatorem neurogenezy w życiu zarodkowym zwierząt. Wiadomo również, że białko PML ulega ekspresji w mózgu dorosłej myszy tworząc charakterystyczne sferyczne ciała jądrowe, zwane ciałkami PML. Mimo tego, **rola PML w układzie nerwowym dorosłych zwierząt nie została jak dotąd dobrze poznana**. Opisane w literaturze wyniki badań oparte są na doświadczeniach przeprowadzonych na myszach z konstytutywną formą (tj. obecną od początku życia) genu PML, a jako że białko PML jest jednym z kluczowych regulatorów rozwoju mózgu w stadium embrionalnym, i jego brak jest przyczyną zaburzeń prawidłowej neurogenezy, takie zwierzęta nie są odpowiednim modelem do zrozumienia roli białka PML w dojrzałym układzie nerwowym. Z powyższych powodów głównym celem projektu jest zbadanie funkcji białka PML i ciałek jądrowych PML w zakręcie zębatym hipokampa dorosłych myszy. W naszym projekcie skupiamy się przede wszystkim na zmianach plastyczności neuronalnej wywołanej wprowadzanymi modyfikacjami genu PML. Takie podejście badawcze pozwoli na uzyskanie wiarygodnych wyników. Korzyści wynikające z przeprowadzonych doświadczeń to wyjaśnienie roli białka PML w zakręcie zębatym hipokampa. Spodziewamy się, że PML może mieć

istotny wpływ w procesie uczenia się i pamięci będącym ważnym i złożonym mechanizmem niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania układu nerwowego.

W projekcie istnieje ryzyko wystąpienia szkód u wykorzystywanych zwierząt, które głównie związane są z powikłaniami pooperacyjnymi domózgowego wstrzykiwania wirusów AAV. Zdarza się, że myszy źle reagują na stosowane anestetyki co łączy się z problemami związanymi z wybudzeniem (wielogodzinne wybudzanie) się po operacji, problemy z prawidłowym oddychaniem, brak koordynacji ruchowej/paraliż mięśni bądź bardzo długim czasem rekonwalescencji uniemożliwiający samodzielne przyjmowanie wody i pokarmu. W przypadku braku skuteczności w podejmowanych próbach ratowania zwierzęcia (dodatkowe podawanie środków przeciwbólowych/przeciwzapalnych/antybiotyków) myszy będą poddawane wcześniejszej eutanazji przy użyciu izofluranu.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Myszy C57BL6/J grupa doświadczalna + myszy C57BL6/J grupa kontrolna: **300 myszy** (obie płcie)

Myszy transgeniczne: C57BL/6N CRISPR^{Cas9/CreERT2} + C57BL/6N CRISPR^{Cas9/Cre-}: **300 myszy** (obie płcie)

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Białko PML jest istotnym regulatorem neurogenezy w życiu zarodkowym zwierząt. Wiadomo również, że białko PML ulega ekspresji w mózgu dorosłej myszy tworząc charakterystyczne sferyczne ciała jądrowe, zwane ciałkami PML. Mimo tego, **rola PML w układzie nerwowym dorosłych zwierząt nie została jak dotąd dobrze poznana**. Opisane w literaturze wyniki badań oparte są na doświadczeniach przeprowadzonych na myszach z konstytutywną formą (tj. obecną od początku życia) genu PML, a jako że białko PML jest jednym z kluczowych regulatorów rozwoju mózgu w stadium embrionalnym, i jego brak jest przyczyną zaburzeń prawidłowej neurogenezy, takie zwierzęta nie są odpowiednim modelem do zrozumienia roli białka PML w dojrzałym układzie nerwowym. Z powyższych powodów głównym celem projektu jest poznanie i opisanie funkcji białka PML i ciałek jądrowych PML w zakręcie zębatym hipokampa u dorosłych myszy z nadekspresją bądź wyciszeniem tego genu.

Zachowując wprowadzoną w 1959 roku, przez W. Russela i R. Burcha zasadę 3R uzasadniam podjęte we wniosku wybory dotyczące tematyki, modelu, procedur:

UDOSKONALENIE (ang. refinement) - Nadrzędnym celem jest ograniczenie cierpienia i stresu zwierząt, związanego z przeprowadzanymi procedurami. Czynniki, które mogą być dla zwierząt, możliwym do zredukowania, źródłem dyskomfortu, to zabieg operacyjny oraz odseparowanie od stada. Udoskonaleniem w tej

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

materii będzie podawanie odpowiednich, zgodnych z powszechnie przyjętymi normami weterynaryjnymi, środków usypiających (Ketamina/Medetomidyna), przeciwzapalnych i uśmierzających ból środ- i pooperacyjny (Butomidor, Tolfine). Ponadto zwierzęta farmakologiczne wyprowadzane z narkozy (Revertor) przetrzymywane będą do czasu całkowitego wybudzenia na płycie grzejnej. Następnie odkładane będą do klatek o wzbogaconym środowisku, umożliwiającym budowanie gniazda (chusteczki, skompresowane bawełniane płatki/wałeczki) i zabawę (drewniane kołeczki). Dodatkowo klatki, w których zwierzęta będą przetrzymywane mają transparentne ścianki, co umożliwi kontakt wzrokowy z innymi osobnikami. Kolejnym działaniem zmniejszającym stres zwierząt będzie przestrzeganie ograniczonej, do eksperymentatora i opiekuna, liczby osób pracującej z badanymi zwierzętami.

ZASTĄPIENIE (ang. replacement) – W celu uzyskania rzetelnych wyników niezbędne jest przeprowadzenie eksperymentu *in vivo*, ponieważ badania na hodowlach *in vitro* nie są w stanie odzwierciedlić zachodzących zmian podczas procesów uczenia się. Model zwierzęcy jest niezbędny do zaobserwowania zmian behawioralnych po przeprowadzonych modyfikacjach jakimi są: nadekspresja bądź wyciszenie genu dla białka PML. Przed rozpoczęciem doświadczeń *in vivo*, stosowane wektory wirusowe zawsze wcześniej sprawdzane są na hodowlach komórkowych lub hodowlach neuronalnych *in vitro*.

OGRANICZENIE (ang. reduction) – Spełniając “zasadę ograniczenia” zredukowana do koniecznego minimum została liczba zwierząt planowanych do wykorzystania w eksperymencie. Wielkość grupy pozwoli na wiarygodną analizę statystyczną i weryfikację postawionego problemu badawczego. Po zakończeniu doświadczenia zwierzęta zostaną poddane humanitarnej procedurze eutanazji redukującej stres i uczucie bólu.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną²

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

☐ ~~TAK na podstawie art. 53 ust. 3 ustawy~~

☒ **NIE**

² Wypełnia właściwa lokalna komisja etyczna ds. doświadczeń na zwierzętach. Należy zaznaczyć właściwe pole.