

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu Wyprowadzenie linii myszy pozwalających na warunkową delecję genu *PTRH1*

2. Czas trwania projektu: 2 lata (15.10.2020-15.10.2022)

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) mitochondria, choroby mitochondrialne, wadliwa translacja

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 proponowanego doświadczenia jest wyprowadzenie linii myszy służącej do warunkowej delecji genu *PTRH1* (umieszczenie miejsc *LoxP* dookoła jednego z eksonów genu). Warunkowa delecja oznacza, że wyprowadzona linia myszy będzie ekspresywna gen bez zmian, natomiast po skrzyżowaniu z inną linią myszy gen będzie mógł zostać usunięty w różnych tkankach lub stadiach rozwojowych.

Białko *PTRH1* jest nowo odkrytym enzymem, który najprawdopodobniej działa na terenie mitochondriów usuwając produkty uboczne wadliwej translacji. Delecja genu *PTRH1* w hodowlach *in vitro* powoduje akumulację produktów ubocznych. Nie wiadomo jaki jest wpływ mutacji *PTRH1* na funkcjonowanie organizmu. Miejsca *LoxP* zostaną dodane w obrębie intronów, ich obecność nie będzie miała wpływu na ekspresję genu, w związku z czym myszy *PTRH1^{LoxP/LoxP}* nie będą przejawiały szkodliwego fenotypu.

Zaburzenia mitochondrialne są jedną z najczęstszych przyczyn chorób genetycznych - występują z częstością 1 na

5000 urodzeń. Choroby mitochondrialne dotyczą mózg, wątrobę, mięśnie szkieletowe, serce i inne organy, często prowadząc do niepełnosprawności i śmierci. Obecnie nie ma skutecznych terapii, leczenie jest w najlepszym przypadku objawowe. Za zaburzenia mitochondrialne odpowiedzialne są nie tylko mutacje w genach genomu mitochondrialnego, ale także w genach jądrowych, gdyż genom mitochondrialny jest bardzo ograniczony i nie koduje wszystkich białek niezbędnych dla funkcjonowania tego organellum. W przypadku podejrzenia u pacjenta choroby mitochondrialnej wykonuje się sekwencjonowanie genomu mitochondrialnego oraz wybranych genów jądrowych. Dlatego też dla prawidłowej diagnozy pacjentów, niezbędne jest by wiedza na temat jądrowych genów wpływających na nieprawidłowości funkcjonowania mitochondriów była jak najpełniejsza. Możliwe jest, że mutacje w kodowanym jądrowo genie *PTRH1*, są odpowiedzialne za choroby mitochondrialne o nieznaną dotąd etiologię, jednak ze względu na ograniczoną dostępność badań całogenomowych, nie zostały jeszcze opisane.

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 uśmierczany środkami przeciwbólowymi.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Mus musculus:

Mysz C57BL/6JRj, samice 40 osobników

F1(C57BL6/JRj x CBA/Rj) – samice – 17 osobników

F1(C57BL6/JRj x CBA/Rj) – samce – 5 osobników

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

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

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

Pubmed, Google Scholar, ScienceDirect, Ebsco, OMIM

Wykorzystałam/em słowa kluczowe: PTRH1, mitochondrial disease, peptydyl-tRNA hydrolase ,

Na podstawie przeszukania istniejącej literatury, stwierdzam że:

A. Nagromadzony materiał badawczy pozwala na stwierdzenie, że: PTRH1 jest nowoodkrytym enzymem, którego delecja w hodowlach komórkowych *in vitro* powoduje akumulację produktów ubocznych translacji w mitochondriach

B. Brak jest danych dotyczących: brak jest danych na temat działania PTRH1 na poziomie organizmu, nie istnieje adekwatny model zwierzęcy.

Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na:

Rozwinięcie teoretyczne/poznawcze istniejącej wiedzy w kierunku: wyprowadzenie linii myszy pozwalającej na tkankowo i czasowo specyficzne wyłączenie ekspresji genu pozwoli zrozumieć działanie enzymu w kontekście poszczególnych tkanek. Pozwoli to na głębsze zrozumienie zarówno fenotypowych, jak i molekularnych konsekwencji akumulacji produktów ubocznych translacji na terenie mitochondriów.

Zastosowanie uzyskanej wiedzy polegające na: opisanie zaburzeń związanych z nieprawidłowym działaniem genu PTRH1 pozwoli na poznanie objawów, których możemy się spodziewać u pacjentów, a co za tym idzie skuteczniejszą diagnostykę w przyszłości.

Zastąpienie: Ze względu na złożoność patogenezy chorób mitochondrialnych, nie jest możliwe zbadanie ich przebiegu bez użycia modelu zwierzęcego.

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.

Udoskonalenie: Zarodki będą nastrzykiwane przy użyciu wysokiej klasy mikroiniektora, a zabieg będzie wykonywany przez wytrenowany personel, dzięki czemu znacznie zwiększona będzie przeżywalność zarodków. myszy po operacjach otrzymują kompleksową ochronę przeciwbólową. Myszy będą utrzymywane w systemie IVC (klatki wentylowane indywidualnie), co zwiększa ich dobrobyt.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną²

² 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

☒ NIE