

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1.Tytuł projektu: Wyprowadzenie linii myszy wyrażających rekombinazę Cre pod promotorem genu CD XXXXXXXXXX

2.Czas trwania projektu: 2 lata ()

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 wyrażającej rekombinazę CRE pod promotorem genu, będącego markerem komórek mających właściwości miogeniczne, czyli różnicują w mioblasty (komórki mięśniowe) oraz tworzą wielojądrowe miotuby w warunkach hodowli *in vitro*. Linia to następnie będzie krzyżowana dostępną już z linią reporterową LoxP/Tomato. Ostatecznie otrzymamy linię, w której komórki posiadające na swojej powierzchni badane białko markerowe i ich komórki potomne będą wyrażały białko czerwonej fluorescencji.

Starzenie się organizmu, rozległe uszkodzenia tkanki bądź choroby takie jak dystrofie mięśniowe (np. dystrofia mięśniowa Duchenne'a; DMD) mogą prowadzić do ograniczenia lub wyczerpania populacji komórek macierzystych obecnych w mięśniach szkieletowych, co skutkuje nieprawidłowym funkcjonowaniem mięśni szkieletowych, a w skrajnych przypadkach (np.DMD) może prowadzić do śmierci pacjenta. Z tego powodu prowadzi się badania nad różnymi strategiami wspierania regenerujących mięśni szkieletowych. Jedną z nich są terapie komórkowe, czyli zabieg przeszczepienia komórek mogących wziąć udział w odnawianiu uszkodzonej

tkanki. Ważne jest, aby takie egzogennie dostarczone komórki posiadały zdolność do różnicowania w kierunku mioblastów, fuzji, tworzenia miotub, a ostatecznie włókien mięśniowych. Oczywiście komórkami pierwszego

wyboru w takich testach były same mioblasty, jednak badania pokazały, że niski odsetek tych komórek przeżywa sam przeszczep, a te obecne w uszkodzonym mięśniu szkieletowym mają ograniczony potencjał do jego zasiedlania i podziałów.

Wyprowadzona linia myszy będzie służyła do analizy pochodzenia rozwojowego komórek wyrażających badany marker, ich dokładnej charakterystyce, roli jaką odgrywają podczas regeneracji mięśni szkieletowych oraz potencjalnych właściwościach terapeutycznych po ich przeszczepieniu do uszkodzonych mięśni szkieletowych. Rekombinaza Cre zostanie wprowadzona do genomu poniżej sekwencji genu, przez połączenie sekwencją IRES. Dzięki temu translacja białek będzie przebiegać niezależnie, i produkcja białka markerowego **nie będzie zaburzona**. W związku z tym myszy **nie będą wykazywały szkodliwego fenotypu**.

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.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Mus musculus:

C57BL/6JRj – samice - 40 osobników

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

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

Łącznie 62 myszy

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

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

Pubmed, Google Scholar, ScienceDirect, Ebsco, OMIM

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

Wykorzystałam/em słowa kluczowe: CD XXXX, CD XXXX-Cre, melanoma cell adhesion molecule, skeletal mouse regeneration

Na podstawie przeszukania istniejącej literatury, stwierdzam że:

A. Nagromadzony materiał badawczy pozwala na stwierdzenie, że: badane komórki potencjalnie mogą być wykorzystane jako komórki „naprawcze” mięśni szkieletowych;

B. Brak jest danych dotyczących: nie jest znana rola badanych komórek w regeneracji mięśni szkieletowych, nie wiadomo jakie jest pochodzenie badanych komórek obecnych w mięśniach szkieletowych, nie istnieje linia analogiczna linia myszy.

Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na:

Rozwinięcie teoretyczne/poznawcze istniejącej wiedzy w kierunku: wyprowadzenie linii myszy, w której badane komórki będą wyznakowane fluorescencyjnie docelowo pozwoli na prześledzenie pochodzenia rozwojowego badanych komórek oraz ich udziału w odtwarzaniu uszkodzonej tkanki.

Zastosowanie uzyskanej wiedzy polegające na: jeśli potwierdzą się założenia projektu, będziemy mogli zaobserwować poprawę w regeneracji mięśni szkieletowych w skutek transplantacji badanych komórek mogą one zostać w przyszłości wykorzystane w terapii uszkodzonych mięśni szkieletowych, które utraciły swoją zdolność do regeneracji i wspomóc ich leczenie i poprawę funkcji.

Zastąpienie: Przedstawiony projekt dotyczy badania linii rozwojowych komórek mięśni szkieletowych, w związku z czym nie jest możliwe przeprowadzenie go 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