

# NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: Charakterystyka myszy z mutacją typu „knock-out” genu Pten pod kątem plastyczności neuronalnej oraz społecznych funkcji poznawczych

2. Czas trwania projektu 3 lata

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) Pten knock-out, plastyczność synaptyczna, PI3K-Akt-mTOR, hipokamp, autyzm

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.

W naszym projekcie chcemy zbadać jak knock-out genu Pten w dojrzałych neuronach glutaminergicznych formacji hipokampa (struktura odpowiedzialna za formowanie pamięci i konsolidację) wpływa na plastyczność neuronalną oraz społeczne funkcje poznawcze. Zjawisko plastyczności stanowi molekularną podstawę procesów uczenia się i pamięci, które można zaobserwować w postaci zmian w pobudzeniu neuronalnym, zwiększeniu ilości i gęstości rozgałęzień dendrytów oraz liczby synaps. Aby odpowiedzieć na to pytanie, zdecydowaliśmy się na wyciszenie ekspresji genu Pten w dojrzałych, zróżnicowanych neuronach pobudzających za pomocą efektywnych i bezpiecznych dla zwierząt wektorów wirusowych AAV. Wiadome jest z literatury jak i z naszych doświadczeń pilotażowych, że mutacja w genie Pten wywołuje wzmożoną i ciągłą aktywację szlaku sygnalizacyjny

PI3K-Akt-mTor, który zaangażowany jest podczas procesów plastyczności. Ponadto odnotowaliśmy polepszenie pamięci u mutantów w testach kognitywnych zaprojektowanych w klatkach IntelliCage. Zaobserwowaliśmy, że długotrwała aktywacja jednej grupy neuronów wywołuje brak równowagi w przekazywaniu informacji między neuronami, które może powodować szereg zmian na poziomie molekularnym jak i zmiany w zachowaniu mutantów.

Korzyści wynikające z eksperymentu jest przede wszystkim lepsze poznanie i zrozumienie mechanizmu szlaku PI3K-Akt-mTOR w warunkach wzmożonej aktywności podczas uczenia się i formowania pamięci w hipokampie. Zgromadzona wiedza może przysłużyć się w przyszłości do zaprojektowania cząsteczek terapeutycznych, usprawniających pamięć osób z zaburzeniami neurologicznymi powodowanymi zahamowaniem lub nadmierną aktywnością szlaku PI3K-Akt-mTOR. Chcemy także odpowiedzieć na pytanie czy ciągła stymulacja dojrzałych neuronów glutaminergicznych w hipokampie może doprowadzić do zmiany w zachowaniu badanych zwierząt o charakterze podobnym do spektrum zaburzeń autystycznych.

Przewidziane szkody jakie może wywołać nasze doświadczenie to przede wszystkim mogą być zaburzenia społeczne u badanych zwierząt wywołane długotrwałą stymulacją szlaku PI3K-Akt-mTOR w wyniku mutacji w genie Pten oraz krótkotrwały stres związany z przeprowadzonymi czynnościami w opisanych procedurach. Z zaplanowanych 4 procedur, 3 podlegają kategorii dotkliwości „umiarkowana”, które rozpoczynają się operacją stereotaktyczną – domózgowe podanie wektorów AAV (która może wywołać chwilowy dyskomfort po anestezji – ketamina jest substancją psychoaktywną) oraz kończą się eutanazją zwierząt. Po zakończeniu procedury 4 i 5 o kategorii dotkliwości „łagodna”, zwierzęta w spokoju dożywają starości w klatkach domowych.

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

Gatunek/szczep	Liczba
Mysz (Mus musculus), szczep C57BL6/J, linia transgeniczna Pten flox/flox – osobniki <b>zmienione genetycznie</b> w wyniku podania wektorów rAAV umożliwiających delecję w genie Pten	180
Mysz (Mus musculus), szczep C57BL6/J linia transgeniczna Pten flox/flox –	180

osobniki <b>niezmienione genetycznie</b> (grupa kontrolna), którym podano wektory rAAV z kontrolnym genem reporterowym	
Mysz ( Mus musculus), szczep C57BL6/J kontrolna	64

## 7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA<sup>1</sup>

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

Wykorzystano słowa kluczowe: Pten-knock-out, AKT, mTOR, hippocampus, glutamatergic neurons, learning and memory, IntelliCage, autism, mTor up-regulation, USV Pten

Na podstawie istniejącej literatury, stwierdziliśmy że:

-Ekspresja fosfatazy Pten negatywnie reguluje szlak sygnalizacyjny PI3K-Akt-mTOR, który odrywa ważną rolę w regulacji transdukcji sygnału i procesów biologicznych, takich jak proliferacja komórek, apoptoza, metabolizm, angiogeneza (Fei Xu i wsp. 2020) a także zaangażowany jest w regulację procesów neuroplastycznych (Raymond J Kelleher 3rd i wsp, 2004; Charles A. Hoeffler and Eric Klann, 2010Li Sui i wsp., 2008; Tyson E Graber i wsp.,2013)

-Badania na warunkowych mysich modelach knockout genu Pten (conditional knockout) opisują szereg zmian na podłożu morfologicznym neuronów, elektrofizjologicznym komórek a także kognitywnym czy behawioralnym, natomiast warto pamiętać, że zasięg mutacji obejmuje nie tylko hipokamp ale także struktury takie jak kora mózgowa, mózdzek czy wzgórze i podwzgórze (Kwon i wsp.2003; M. Sperow i wsp., 2012; K. Takeuchi i wsp.,2013; J.N. Lugo i wsp., 2014). Mutacja może dotyczyć nie tylko populacji neuronów ale także komórek glejowych (Fraser i wsp., 2008). Ponadto manipulacja genetyczna przeprowadzona w momencie, gdy neurogeneza w zakręcie zębatym nie została w pełni zakończona, niesie ze sobą poważniejsze konsekwencje (Smitch i wsp., 2016). Neurogeneza u myszy domowej rozpoczyna się od 10 dnia stadium embrionalnego a kończy się około 3 tygodnie po urodzeniu (F. Stagni i wsp.,2015-figura nr 4).

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

Opisany w niniejszym wniosku model  $Pten^{flox/flox}$  stanowi unikatowy model do badania funkcji genu *Pten* w dojrzałych, w pełni zróżnicowanych neuronach podbudzających hipokampa. Ze względu na to, że interwencja genetyczna w stosunku do genu *Pten* dokonywana jest u osobników dorosłych, rozwój zwierzęcia wraz z długim procesem różnicowania się wszystkich typów komórek pozostaje nienaruszona, aż do momentu rozpoczęcia doświadczenia. Model taki pozwala zatem (podobnie jak model opisany w poprzednim wniosku *Pten/CaMKCreET2* – wiele struktur mózgu) na rzeczywiste zbadanie funkcji genu *Pten* i regulowanej przez niego ścieżki PI3K-Akt-mTor w neuronach glutaminergicznych.

Mimo, że w literaturze naukowej można odnaleźć doniesienia dotyczące badania funkcji *Pten* w kontekście plastyczności neuronalnej nawet sprzed 20 lat, żadne z tych doniesień nie pozwala na jednoznaczne określenie roli genu *Pten* w zróżnicowanych neuronach. Zazwyczaj badanie takie były przeprowadzane z wykorzystaniem systemu *Cre/lox*, gdzie promotor kierujący ekspresją genu rekombinazy *Cre* (używanej do indukcji mutacji) rozpoczynał swoją aktywność w komórkach progenitorowych (*NSE-Cre*) lub na początku procesu różnicowania (*CaMK-Cre*). Zastosowanie takich modeli powoduje, że mamy do czynienia z badaniem funkcji *Pten* w szeroko rozumianym procesie różnicowania, a nie właściwej funkcji genu *Pten* regulującej aktywność neuronów (wiedza podstawowa). Porównanie natomiast obu podejść badawczych może przyczynić się do rozróżnienia dwóch aspektów funkcji genu *Pten* w neuronach: pierwszego tzw. rozwojowego (związanego np. z takimi schorzeniami jak autyzm) oraz drugiego czyli właściwej funkcji badanego genu (nasze podejście). Należy podkreślić, że planowane przez nas badania z unikatowym modelem, nie zostały dotychczas opisane w literaturze naukowej.

Mając na uwadze dobrostan zwierząt, zachowujemy wprowadzoną w 1959 roku, przez W. Russela i R. Burcha zasadę 3R i uzasadniamy podjęte we wniosku wybory dotyczące modelu zwierzęcego oraz procedur:

Refinement (udoskonalenie) - Nadrzędnym celem jest ograniczenie cierpienia i stresu zwierząt, związanego z przeprowadzanymi procedurami. Podczas eksperymentów behawioralnych zwierzętom zapewniamy warunki jak najbardziej zbliżone do naturalnych aby efektywnie zmniejszyć odczucie stresu. Myszy przebywają w cichych pokojach z ograniczonym dostępem dla personelu i odpowiednim oświetleniem. Pokoje behawioralne są zaprojektowane w sposób umożliwiający regulację temperatury (optymalna dla myszy 20-23 °C) i cykl dobowy. Klatki zapewniają stały dostęp do pożywienia i wody, zaopatrzone są w domki oraz suchą ściółkę regularnie zmienianą. Przed wykonywaniem operacji lub

drobnych zabiegów, zwierzęta są poddane znieczuleniu ogólnemu. Do anestezji stosowana jest mieszanka ketamina-medetomidyna oraz możliwie najszybciej podawany jest lek przeciwbólowy (butamidol, tolfedine) oraz antybiotyk (baytril) i lek przeciwzapalny (tolfedine). Dodatkowo w trakcie i po operacji na ranę podawana jest lidokaina (środek miejscowo znieczulający). Do wybudzania zwierząt z narkozy stosowany jest reverter (środek znoszący działanie uspokajające medetomidyny).

W celu minimalizacji liczby zgonów z powodu wychłodzenia, w trakcie trwania zabiegu i po jego zakończeniu, zwierzęta są przetrzymywane na płytce grzejnej do całkowitego wybudzenia.

Następnie są odkładane do klatek domowych o wzbogaconym środowisku umożliwiającym budowę gniazda i zabawę (chusteczki, drewniane belki, rolki od papieru). Zwierzęta przetrzymywane są w przezroczystych klatkach, umożliwiającich kontakt wzrokowy z innymi osobnikami. Po okresie rekonwalescencji myszy są trzymane razem w niewielkich grupach.

Replacement (zastąpienie) – 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 i interakcji socjalnej. Model zwierzęcy jest niezbędny do zaobserwowania zmian behawioralnych po przeprowadzonych modyfikacjach np. mutacji genu. Do hodowli komórkowych ograniczamy się w momencie, gdy sprawdzamy prawidłowe działanie wektorów wirusowych, zanim wprowadzimy je do żywego organizmu

Reduction (ograniczenie) – Do eksperymentu zostanie wykorzystana minimalna liczba zwierząt niezbędna do uzyskania wiarygodnych wyników umożliwiających weryfikację postawionego problemu badawczego. Podawanie wektorów AAV jest precyzyjną oraz efektywną metodą edycji genomu.

Po zakończeniu doświadczenia zwierzęta zostaną poddane humanitarnej procedurze eutanazji redukującej stres i uczucie bólu (z wyjątkiem zwierząt z procedury 4 i 5, które dożyją starości w swoich klatkach domowych).

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

- ☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 1 ustawy
- ☒ TAK - na podstawie art. 53 ust. 3 ustawy
- ☐ NIE

---

<sup>2</sup> Wypełnia właściwa lokalna komisja etyczna ds. doświadczeń na zwierzętach. Należy zaznaczyć właściwe pole.

