

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu Wyprowadzenie serii linii myszy mających na celu zbadanie roli genu *InhβA* w rozwoju zarodkowym ssaków.

2. Czas trwania projektu 3 lata

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) *InhβA*, zarodek mysi, rozwój przedimplantacyjny, myszy transgeniczne

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.

Przedimplantacyjny zarodek myszy i innych ssaków, w tym człowieka, charakteryzuje się rozwojem regulacyjnym. Oznacza to, że los początkowo niezróżnicowanych komórek, czyli kierunek ich różnicowania albo w epiblast będący prekursorem ciała zarodka albo w linii pozazarodkowe budujące łożysko i błony płodowe zależy od wzajemnych interakcji pomiędzy komórkami w zarodku. Komunikacja ta polega na wysyłaniu informacji w postaci wydzielanych białek, które łącząc się ze swoimi receptorami na powierzchni sąsiednich komórek kierują je na określoną drogę różnicowania. Ten typ embriogenezy umożliwia zarodkowi ssaków kontynuowanie prawidłowego rozwoju aż do urodzenia nawet w obliczu bardzo ciężkich zaburzeń, takich jak np. nadmiar, brak czy zmiana pozycji budujących go komórek. Pomimo wielu dowodów na regulacyjny charakter rozwoju zarodków ssaków, mechanizmy odpowiedzialne za ten fenomen nie są do końca poznane. Jednym z genów potencjalnie zaangażowanych w regulację rozwoju zarodka myszy (i innych ssaków) może być *InhβA* kodująca białko należące do rodziny TGFβ (*transforming growth factor*). Celem proponowanego projektu jest wyprowadzenie linii myszy transgenicznych, z

których po kilku rundach krzyżowań można będzie uzyskać zarodki zawierające zygotyczny, matczyno-zygotyczny lub wyłącznie matczyny knockout genu *InhβA*. Wyprowadzone linie heterozygotyczne:

InhβAKO, *InhβALoxP* oraz *InhβACre* nie będą wykazywały żadnych anomalii rozwojowych. Uzyskanie tych linii umożliwi wyjaśnienie czy produkt genu *InhβA* odgrywa rolę w tworzeniu i segregacji linii komórkowych w zarodku ssaka, gwarantując powstanie prawidłowej blastocysty zdolnej do implantacji w macicy matki. Dodatkowo, będzie można ustalić czy rolę w tych procesach odgrywa gen pochodzenia matczynego czy zygotycznego.

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 ułucie igłą. W celu uzyskania zwierząt transgeniczných zarodki będą transplantowane do jajowodów samic biorecipientów, 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, samice C57BL6/J/cmdb – 57 osobników

Mus musculus, samice F1(C57BL6/Tar x CBA/Tar) – 61 osobników

Mus musculus, samce F1(C57BL6/Tar x CBA/Tar) – 5 osobników

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

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

Przygotowując projekt badawczy, sprawdziłam/sprawdziłem istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazach danych: PUBMED; Google Scholar; ScienceDirect

Wykorzystałam/em słowa kluczowe:

InhβA/mouse/knockout/preimplantation/embryo

Na podstawie przeszukania istniejącej literatury stwierdzam, że: pomimo obecności produktu genu *InhβA* w przedimplantacyjnym zarodku jego znaczenie w tym wczesnym okresie embriogenezy nie jest znane.

A. Nagromadzony materiał badawczy pozwala na stwierdzenie, że:

produkt genu *InhβA* jest obecny w oocycie, a następnie jego poziom spada podczas bruzdkowania. Po aktywacji genomu zarodkowego obserwuje się stopniowy wzrost poziomu białka kodowanego przez ten gen. W blastocyście jest ono obecne w węźle zarodkowym (z którego powstaną wszystkie tkanki zarodka), a w okresie okołoimplantacyjnym w trofektodermie, odpowiedzialnej za wytworzenie łożyska (Albano *et al.*, 1993; Lu *et al.*, 1993).

Ponadto zaobserwowano, że przedimplantacyjne zarodki gryzoni i bydła rozwijają się lepiej *in vitro*, gdy hoduje się je w obecności białka kodowanego przez *InhβA* (Lu *et al.*, 1990; Orimo *et al.*, 1996; Yoshioka *et al.*, 1998). Dodatkowo wykazano, że zarodkowe komórki macierzyste (komórki ES), wydzielając produkt genu *InhβA* hamują różnicowanie komórek zarodkowych w epiblast, a promują ich różnicowanie w trofektodermę (Xiang *et al.*, 2017).

Myszy z delecją genu *InhβA* rodzą się, ale umierają krótko po urodzeniu z powodu defektów w rozwoju twarzoczaszki. Sugeruje się, że brak fenotypu związanego z delecją badanego genu w okresie przedimplantacyjnym może wynikać m.in. z wpływu egzogenego białka, które jest wydzielane również przez komórki jajnika, jajowodu oraz nabłonka macicy. Ewentualny fenotyp może być także maskowany dzięki obecności białka matczynego. Wiadomo bowiem, że początkowo synteza białek zależna jest od matczynego mRNA i białek, nagromadzonych w oocycie w trakcie oogenezy. Aktywacja genomu zarodkowego rozpoczyna się pod koniec stadium jednokomórkowego, a do jego masowej aktywacji dochodzi w zarodku 2-komórkowym. Towarzyszy temu degradacja większości matczynego mRNA (Sha *et al.*, 2019). Obecność matczynego białka może znacznie opóźnić pojawienie się zmutowanego fenotypu w zarodkach z nokautem zygotycznym. Dlatego tak ważne jest zbadanie roli genów zarówno matczynych, jak i zygotycznych w rozwoju zarodka, szczególnie na etapach przed implantacją.

B. Brak jest danych dotyczących znaczenia *InhβA* w przedimplantacyjnym okresie rozwoju zarodka myszy.

Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na:

A/ wyprowadzenie linii myszy zawierających knockout oraz knockout warunkowy *InhβA* pozwoli na uzyskanie zarodków zawierających zygotyczny, matczyno-zygotyczny oraz wyłącznie matczyny knockout genu i poznanie roli tego genu w przedimplantacyjnym okresie rozwoju myszy. B/ Zastosowanie uzyskanej wiedzy pozwoli na poszerzenie wiedzy na temat mechanizmów odpowiedzialnych za niezwykle zdolności regulacyjne przedimplantacyjnych zarodków myszy oraz

innych ssaków.

Zasada ZASTĄPIENIA: Badanie przedimplantacyjnego rozwoju myszy, który jest regulowany przez wiele mechanizmów, jest możliwe tylko z użyciem żywych zarodków uzyskiwanych z dróg rodnych samicy. Nie istnieje obecnie metoda pozwalająca na uzyskanie zarodków bez użycia zwierząt. Mysz jest podstawowym modelem zwierzęcym w badaniach embriologicznych. Myszy pozbawione zygotycznego *InhβA* są komercyjnie dostępne, ale aby można było porównać rozwój myszy z zygotycznym, matczyno-zygotycznym oraz wyłącznie matczynym knockoutem *InhβA* muszą być one wyprowadzone w tym samym szczepie myszy.

Zasada OGRANICZENIA:

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. Ponadto, stymulacja hormonalna samic zapewnia zwiększoną liczbę samic pokrytych przez samce oraz samych zygot (po stymulacji hormonalnej uzyskuje się od dwu- do trzykrotnie więcej zygot niż od samic niestymulowanych).

Zasada UDOSKONALENIA: Procedury (iniekcje dootrzewnowe hormonów, transplantacja zarodków oraz wazektomia) oraz uśmiercanie przez dyslokację kręgów szyjnych będą wykonywane przez osoby posiadające odpowiednie kwalifikacje i wieloletnie doświadczenie w pracy ze zwierzętami. Osoby te będą również kontrolowały dobrostan zwierząt. Iniekcje dootrzewnowe hormonów są kwalifikowane jako łagodne pod względem stopnia dotkliwości, dlatego nie ma powodu do stosowania znieczulenia przy ich wykonywaniu. Dodatkowy zastrzyk zwiększyłby jedynie stres zwierzęcia. Wazektomia przeprowadzona będzie najmniej inwazyjną znaną metodą, czyli przez mosznę. W przypadku zwierząt przeznaczonych na transplantację lub wazektomię, zastosowanie środka usypiającego i przeciwbólowego/przeciwzapalnego oraz znieczulającego w miejscu pola operacyjnego zapewni przeprowadzenie zabiegu jak najmniej boleśnie, minimalizując stres, któremu będą poddawane.

Zarodki będą nastrzykiwane przy użyciu wysokiej klasy mikroiniektora, a zabieg będzie wykonywany przez wytrenowany personel, dzięki czemu znacznie zwiększona będzie przeżywalność zarodków.

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.

