

# NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu Wyprowadzenie linii myszy z delecją genu *METTL15* przy pomocy metody CRISPR/Cas9

2. Czas trwania projektu: 2 lata

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) mitochondria, metylacja, choroby mitochondrialne, mitorybosom

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 z miejscami LoxP dodanymi wokół jednego z eksonów genu *METTL15*. Linia następnie będzie mogła zostać skrzyżowana z dostępnymi liniami wyrażającymi rekombinazę CRE pod różnymi promotorami, co pozwoli na czasowo i/lub tkankowo specyficzną delecję genu *METTL15*.

Mitochondria są bardzo złożonymi organellami eukariotycznymi o wielu różnych funkcjach. Obejmują one homeostazę wapnia, biosyntezę hemu, a przede wszystkim produkcję ATP przez fosforylację oksydacyjną (OxPhos). Rybosom mitochondrialny ssaków (mitorybosom) transluje 13 niezbędnych polipeptydów systemu OxPhos. Mitorybosom składa się z 82 białek kodowanych jądrowo i 2 rybosomalnych. Modyfikacje posttranskrypcyjne rRNA są niezbędne do prawidłowej biogenezy mitorybosomu. U ssaków rRNA

mitochondrialnego zidentyfikowano dziesięć zmodyfikowanych miejsc. Do niedawna nieznanym był enzym odpowiedzialny za modyfikację N4-metylocytydyny w pozycji C839 w 12S rRNA. W zeszłym roku zidentyfikowano METTL15 jako enzym niezbędny do prawidłowej biofenezy mitorybosomu. Komórki z delecją genu METTL15 wykazują zmniejszoną translację mitochondrialną. Poziomy małej podjednostki mitorybosomalnej są w tych komórkach poważnie zmniejszone.

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. Chociaż wcześniejsze prace doprowadziły do precyzyjnej diagnozy u wielu pacjentów, podstawowy paradoks pozostaje bez odpowiedzi: zaburzenia mitochondrialne wpływają na

fosforylację oksydacyjną, ale wykazują uderzającą selektywność tkanek. Zamierzamy wyprowadzić mysz, będącą warunkowym mutantem genu METTL15, która po skrzyżowaniu z liniami wyrażającymi rekombinazę CRE pozwoli na delecję genu zarówno konstytutywną, jak i narządową. Umożliwi to głębsze zrozumienie zarówno fenotypowych, jak i molekularnych konsekwencji wadliwych modyfikacji rRNA na biogenezę mitorybosomów, szczególnie w kontekście pojawiania się zaburzeń tkankowo-specyficznych. Eksperymenty na tym modelu zwierzęcym mogą zatem utorować drogę do leczenia chorób ludzkich związanych z wadliwą biogenezą i translacją mitorybosomów.

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 transgeniczných zarodki będą transplantowane do jajowodów samic bioreczny, 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:

- C57BL/6JRj – 40 osobników
- SWISS – 17 osobników
- F1(C57BL6/J /cmdb x BALB/ccmdb) – 5 osobników

Łącznie 62 myszy

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

---

<sup>1</sup> 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, Ebsco, OMIM

**Wykorzystałam/em słowa kluczowe:** METTL15, mitoribosom, modifications rRNA, mitochondrial disease

**Na podstawie przeszukania istniejącej literatury, stwierdzam że:**

**A. Nagromadzony materiał badawczy pozwala na stwierdzenie, że:** METTL15 jest nowoodkrytą metylotransferazą, która odpowiada za modyfikacje mitochondrialnego 12S rRNA. Od jej aktywności zależy prawidłowe składanie małej podjednostki mityriobosomu.

**B. Brak jest danych dotyczących:** brak jest danych na temat działania METTL15 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 wadliwych modyfikacji rRNA na biogenezę mityriobosomów

**Zastosowanie uzyskanej wiedzy polegające na:** Eksperymenty na tym modelu zwierzęcym mogą zatem utorować drogę do leczenia chorób ludzkich związanych z wadliwą biogenezą i translacją mityriobosomów.

**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 klatkach wentylowanych indywidualnie (IVC)**, co zwiększa ich dobrobyt.

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.