

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: **Badanie funkcji czynników transkrypcyjnych LEF1 i TCF7L2 w rozwoju wzgórza u myszy przy użyciu techniki edytowania genomu opartej na systemie CRISPR/Cas9**

2. Czas trwania projektu: **01.08.2016 – 01.08.2021 (5 lat)**

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): **mózg; wzgórze; embriogeneza; czynniki transkrypcyjne**

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.

Celem doświadczenia jest poznanie mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za rozwój wzgórza. Szczegółowym celem jest ustalenie, jaką rolę w tym procesie odgrywa czynnik transkrypcyjny TCF7L2. Wzgórze stanowi niezwykle istotną część mózgu, odpowiedzialną za wstępną ocenę, modulację, i przesyłanie większości bodźców zmysłowych do kory mózgowej. Wzgórze uważa się za miejsce, gdzie powstaje świadomość, a jego zaburzenia rozwojowe związane są z rozwojem schizofrenii. Niestety, słabo poznane są mechanizmy molekularne odpowiedzialne za prawidłowy rozwój wzgórza. Poznanie tych mechanizmów pomogłoby w lepszym zrozumieniu działania mózgu. Mogłoby także wskazać nowe cele terapeutyczne w zaburzeniach psychicznych.

Projekt jest kontynuacją badań, które doprowadziły do zidentyfikowania potencjalnie kluczowych regulatorów dojrzewania neuronów wzgórzowych. Doświadczenia zakładają zastosowanie

nowoczesnej techniki inżynierii genetycznej do edycji genomu. Modyfikacje będą wywoływane bezpośrednio i specyficznie w mózgu w rozwijających się mysich embrionach i myszach dorosłych. Pozwoli to uzyskać zwierzęta pozbawione w obrębie wzgórza wytypowanych białek. Następnie zostanie przeprowadzona analiza wpływu tych modyfikacji na różne aspekty anatomii i biochemii mózgu.

Projekt został tak skonstruowany, żeby możliwie ograniczyć dystres i dyskomfort zwierząt oraz wyeliminować ból. Dotyczy to głównie procedur obejmujących podanie do mózgu sekwencji DNA modyfikujących genom, które wykonane zostaną przez przeszkoloną do tego osobę. Zwierzęta otrzymają w czasie procedury stosowne znieczulenie, środki przeciwbólowe i środki zapobiegające zakażeniu, zostaną im także zapewnione warunki dla spokojnej rekonwalescencji po zabiegu. Dotychczasowe obserwacje pokazują, że stosowana procedura nie wywołuje trwałego stresu u zwierząt.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

W doświadczeniu wykorzystane zostaną osobniki myszy domowej (*Mus musculus*) linii wyrażającej określone, nietoksyczne białka, których obecność w komórkach umożliwia aktywację wykorzystywanego systemu modyfikacji genetycznych, a przez to późniejszą ocenę tych modyfikacji na badane aspekty rozwoju mózgu (904 osobniki).

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Badanie rozwoju wzgórza nie jest możliwe na zwierzętach bezkręgowych, ponieważ wykształcany u nich układ nerwowy (jeśli obecny) jest zbyt prosty i nie daje odniesienia do układu zwierząt kręgowych - przeprowadzone na takim modelu badania nie miałyby żadnego faktycznego przełożenia na rozwój mózgowia u ssaków. Nie jest też możliwe wykorzystanie ustalonych linii komórek nerwowych, ponieważ brak im kontekstu tkankowego, nie prowadzą do rozwoju faktycznych struktur układu nerwowego i nie pozwalają na ocenę np. mikroanatomii połączeń nerwowych między poszczególnymi, zdefiniowanymi funkcjonalnie rejonami mózgu. Tym niemniej optymalizacja działania wykorzystywanego systemu inżynierii genetycznej odbędzie się z wykorzystaniem hodowli komórek

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

szczurzych i mysich *in vitro*, tak aby doświadczenia na zwierzętach odbyły się jedynie po uprzedniej weryfikacji skuteczności metody na poziomie molekularnym.

W projekcie wykorzystana zostanie jedna z najnowszych technik przyżyciowej manipulacji genetycznej. Pozwala ona na ograniczenie zmienności między grupą doświadczalną a kontrolą do minimum. Jednocześnie technika ta znacząco ułatwia uzyskiwanie myszy transgenicznych z nokautami badanych genów. To z kolei pozwala z większą pewnością weryfikować hipotezy badawcze na podstawie uzyskiwanych danych, jak i ograniczyć niezbędną liczbę zwierząt dla każdego z planowanych eksperymentów.

Zwierzęta poddane procedurom chirurgicznym otrzymają stosowne znieczulenie, środki przeciwbólowe i środki zapobiegające zakażeniu. Wszystkie inwazyjne interwencje operacyjne zostaną przeprowadzone z możliwie największym ograniczeniem dystresu, dyskomfortu i bólu jakie odczuwać może badane zwierzę. Podczas operacji uwzględnione zostaną także takie czynniki, jak m.in. warunki cieplne optymalne dla danego gatunku, czy zapewnienie myszom spokojnego otoczenia do rekonwalescencji.