

# NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu Wyprowadzenie linii myszy będącej warunkowym modelem zespołu szpikowotrzustkowego Pearsona

2. Czas trwania projektu 2 lata

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) Zespół szpikowo-trzustkowy, choroby mitochondrialne, CRISPR/Cas9

Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych) B. Badania translacyjne lub stosowane

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.

Mitochondria są głównym źródłem trifosforanu adenozy (ATP), cząsteczki, która jest syntetyzowana przez mitochondrialny łańcuch oddechowy. ATP jest głównym substratem energetycznym wymaganym dla wszystkich aktywnych procesów zachodzących w komórce, a jego niedobór prowadzi do dysfunkcji komórkowej i ostatecznie śmierci komórki.

Nieprawidłowe zaopatrzenie komórek w energię jest wspólną cechą wszystkich zaburzeń mitochondrialnych, grupy poważnych chorób ludzi, dla których obecnie **nie jest dostępne skuteczne leczenie**. Zaburzenia mitochondrialne dotyczą 1 na 5000 osób, wpływając na układ nerwowy i mięśnie szkieletowe, powodując poważne objawy chorobowe i często przedwczesną śmierć.

Zespół szpikowo-trzustkowy Pearsona jest rzadką chorobą mitochondrialną spowodowaną delecjami w obrębie mitochondrialnego DNA (mtDNA) i klonalnej ekspansji jego zmutowanej wersji. Delecje pojawiają się podczas dojrzewania oocyta lub na wczesnych etapach rozwoju zarodka i obejmują geny kodujące tRNA mitochondrialne.

W chorobie tej występuje heteroplazmia – w obrębie jednej komórki występują zarówno prawidłowe, jak i zmutowane cząsteczki mtDNA, a ich stosunek jest zmienny. Wadliwe kopie mtDNA są nieaktywne translacyjnie, a translacja mitochondrialna opiera się na pozostałych kopiach mtDNA. Ciężkość symptomów pacjentów jest wprost skorelowana ze stosunkiem zmutowanej frakcji mtDNA do prawidłowych kopii.

W początkowym etapie choroby ujawniającym się w niedługim czasie po narodzinach jedynym dostępnym leczeniem są częste transfuzje i przeszczep hematopoetycznych komórek macierzystych. Mimo wprowadzanego leczenia rokowania są niepomyślne i większość pacjentów umiera w wieku niemowlęcym. U pacjentów, którzy przeżyją wiek niemowlęcy, progresywnie pojawiają się kolejne objawy – zaburzenia funkcjonowania gałek ocznych, bloki w obrębie mięśnia sercowego, mioklonie, napady drgawek, głuchota i ośpienie.

Rozsądnym podejściem terapeutycznym wydaje się być próba eliminacji zmutowanego mitochondrialnego DNA, by w ten sposób zwiększyć frakcję prawidłowych kopii. W niniejszym projekcie prosimy o zgodę na wyprowadzenie nowej linii myszy będącej modelem dla zespołu Pearsona, który pozwoli nam przetestować nowe podejścia terapeutyczne mające na celu zmniejszenie frakcji zmutowanego mtDNA. Ostatnie postępy technologiczne powinny umożliwić nam wprowadzenie ukierunkowanych manipulacji w mtDNA i zmniejszenia ilości zmutowanego mtDNA poniżej progu krytycznego dla klinicznej manifestacji choroby.

Mitochondrialne DNA nie poddaje się manipulacjom przy pomocy klasycznej metodologii CRISPR-Cas9. Do zaindukowania mutacji zostanie więc użyta specyficzna nukleaza, której sekwencja wprowadzona zostanie w locus ROSA26 przy pomocy systemu CRISPR-Cas9. Wyprowadzenie modelu obejmuje więc następujące etapy: **Ekspresja nukleazy będzie warunkowa i indukowalna przy pomocy systemu Tet-ON, a więc myszy jakiegokolwiek objawy chorobowe mogą wykazywać dopiero po podaniu tetracykliny.** Ten system ekspresyjny został z sukcesem przetestowany przy pomocy linii komórkowych.

Proponowany wniosek obejmuje wyłącznie wyprowadzenie linii myszy, która **nie będzie wykazywała żadnych objawów chorobowych**, gdyż ekspresja nukleazy będzie nieaktywna, a kasetę insercyjną wprowadzona będzie w klasycznie wykorzystywane locus.

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

Mus musculus:

- C57BL6/J samice – 36
- F1(C57BL6/J /cmdb x BALB/cmdb) samice – 54
- F1(C57BL6/J /cmdb x BALB/cmdb) samce – 20

Łącznie: 110 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:** Pearsons syndrome, mouse model, mitochondrial disease, heteroplasm

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

**A. Nagromadzony materiał badawczy pozwala na stwierdzenie, że:** zespół Pearsona jest powodowany przez specyficzne mutacje w obrębie DNA mitochondrialnego; jego objawy są bardzo poważne i często powodują śmierć w niemowlęctwie.

**B. Brak jest danych dotyczących:** nie istnieje zwierzęcy model zespołu Pearsona; wprowadzenie mutacji do genomu mitochondrialnego nie jest możliwe przy zastosowaniu klasycznej metodologii CRISPR-Cas, niezbędne jest wykorzystanie do tego specyficznych nukleaz wprowadzanych w neutralnej loci w obrębie genomu

**Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na:**

**Rozwinięcie teoretyczne/poznawcze istniejącej wiedzy w kierunku:** wyprowadzenie warunkowego modelu zespołu Pearsona pozwoli na dokładne opisanie wpływu obecności zmutowanej frakcji mtDNA na funkcjonowanie poszczególnych tkanek organizmu

**Zastosowanie uzyskanej wiedzy polegające na:** Wyprowadzenie modelu zwierzęcego zespołu Pearsona pozwoli na zbadanie nowych podejść terapeutycznych polegających na próbie zmniejszenia frakcji zmutowanego mtDNA.

**Zastąpienie:** Działanie systemu zostało potwierdzone przy pomocy linii komórkowych, jednak przeprowadzenie docelowego eksperymentu bez użycia modelu zwierzęcego nie jest możliwe ze względu na rozległość fenotypów związanych z chorobami mitochondrialnymi. W przebiegu chorób mitochondrialnych najbardziej narażone są tkanki o dużym zapotrzebowaniu energetycznym. Nie jest możliwe oddanie tego zjawiska przy użyciu wyłącznie linii komórkowych.

**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 będą utrzymywane w systemie IVC, co zwiększa ich dobrobyt. Wszystkie myszy po operacjach otrzymują kompleksową ochronę przeciwbólową.

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.