

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu **Badanie wpływu wyciszenia ekspresji kinazy MLK4 na potencjał komórek nowotworowych raka piersi do tworzenia przerzutów**

2. Czas trwania projektu 1 rok

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): kinaza MLK4, rak piersi, przerzutowanie

4. Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych)

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 badań jest dostarczenie informacji na temat zdolności do tworzenia ognisk przerzutowych komórek raka piersi charakteryzujących się wysoką ekspresją kinazy serynowo-treoninowej MLK4. Nowotwór piersi jest heterogenną chorobą, zarówno pod względem molekularnym jak i klinicznym. Biorąc pod uwagę złożoność genomu raka piersi, istotne jest aby poznać zależności pomiędzy zmianami genetycznymi a obserwowanym fenotypem komórek nowotworowych piersi. Zrozumienie molekularnych podłoży rozwoju komórek nowotworowych jest niezbędnym krokiem w celu identyfikacji nowych terapii przeciwnowotworowych. Jedną z przyczyn powstawania i rozwoju komórek nowotworowych jest proces amplifikacji genu, którego wynikiem jest zwiększona ilość białka w komórce. Zwiększona ekspresja białka często prowadzi do rozregulowania ważnych procesów komórkowych, a tym samym rozwoju nowotworu. Hipoteza badawcza zakłada, iż komórki, które cechują się zwiększonym poziomem kinazy MLK4 będą wykazywały większy potencjał do tworzenia ognisk przerzutowych. Do poszerzenia wyników uzyskanych metodami *in vitro* niezbędne jest przeprowadzenie badań modelu doświadczalnym *in vivo*, którego zaletą jest nieodbiegająca od warunków naturalnych zdolność do tworzenia ognisk przerzutowych, głównie w płucach i węzłach chłonnych. Zaplanowane doświadczenia zostaną

przeprowadzone z użyciem ludzkiej linii komórkowej raka piersi HCC1806, która zostanie podana dożylnie myszom z niedoborem odporności (RAG2^{-/-}), a następnie zwierzętom zostanie podana doksycyklina w celu indukowania wyciszenia kinazy MLK4. Podanie myszom komórek HCC1806 doprowadzi do rozwinięcia ognisk przerzutowych u myszy. Linie komórkowe HCC1806 posiadają indukowanym systemem wyciszenia ekspresji genu kinazy MLK4. Kontrolnie zostaną również wprowadzone komórki HCC1806 typu dzikiego. W doświadczeniu będzie porównywany proces przerzutowania do innych części ciała między grupami kontrolnymi, a grupami w których ekspresja kinazy MLK4 została wyciszona. Oczekiwanym rezultatem będzie zrozumienie jaki wpływ ma kinaza MLK4 na proces metastazy raka piersi. Ponadto, wyniki badań pozwolą określić czy kinaza MLK4 może stać się celem terapeutycznym w terapii przeciwnowotworowej.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

W doświadczeniach użytych zostanie 20 myszy RAG2^{-/-}.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Podczas projektowania doświadczenia sprawdzona została istniejąca wiedza na temat prowadzenia badań objętych wnioskiem badawczym. Wykorzystano słowa kluczowe: MLK4, breast cancer, mouse model, xenografts, migration, metastasis. Na podstawie przeszukania istniejącej literatury oraz baz danych (EBSCO, PUBMED, Google Scholar, ScienceDirect), stwierdzono że brak jest danych umożliwiających zweryfikowanie proponowanej hipotezy badawczej.

Rak piersi jest najczęstszym nowotworem u kobiet. Na świecie zapadalność wynosi 1.4 miliona kobiet rocznie, w tym 14000 w Polsce. Jedną z przyczyn powstawania i rozwoju komórek nowotworowych jest proces amplifikacji genu, którego wynikiem jest zwiększona ilość białka w komórce. Zwiększona ekspresja białka często prowadzi do rozregulowania ważnych procesów komórkowych, a tym samym rozwoju nowotworu. Według najnowszych danych amplifikacja genu kodującego kinazę MLK4 (ang. Mixed-Lineage Kinase) została zaobserwowana w około 23% przypadków raka piersi. Kinazy serynowo-treoninowe z rodziny MLK pośredniczą w przekazywaniu sygnałów związanych z różnymi procesami komórkowymi. Kinaza MLK4 jest najmniej poznaną kinazą w tej rodzinie, a jej udział w procesach onkogenezy wciąż pozostaje niejasny. Nasze dane wskazują na rolę MLK4 w procesach migracji oraz inwazji w modelu linii komórkowych raka piersi z indukowanym doksycykliną wyciszeniem MLK4. Ponadto, analiza immunohistochemiczna skrawków guzów od pacjentów, wykazała obecność komórek nowotworowych o wysokiej ekspresji MLK4 w naczyniach krwionośnych. Dane te potwierdzają rolę MLK4 i szlaków sygnalizacyjnych kontrolowanych przez tę kinazę w inwazyjności komórek raka piersi.

Doświadczenia zostały zaplanowane w myśl zasad zastąpienia, ograniczenia i udoskonalenia.

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

Zasada zastąpienia

Po pierwsze został już przeprowadzony szereg doświadczeń *in vitro* w modelu linii komórkowych HCC1806. Doświadczenia objęły testy klonogenne, testy migracyjne, inwazyjne i proliferacyjne w warunkach *in vitro* oraz testy w hodowli trójwymiarowej. Wyniki doświadczeń *in vitro* wskazują, iż kinaza MLK4 ma istotny wpływ na proces onkogenezy co daje podstawę do dalszych doświadczeń na modelu mysim. Hodowle dwuwymiarowe oraz doświadczenia *in vitro* prowadzą do uzyskania niezbędnych informacji z zakresu biologii komórek nowotworowych. Mają one jednak ograniczenia i nie zawsze odzwierciedlają naturalne warunki panujące w komórkach nowotworowych wzrastających *in vivo*. Odtworzenie skomplikowanych interakcji pomiędzy komórkami nowotworowymi guza a organizmem gospodarza stanowi wyzwanie dla hodowli dwuwymiarowych. A zatem, istotne jest aby zweryfikować wyniki uzyskane w doświadczeniach *in vitro* w modelu zbliżonym do warunków panujących w organizmie ludzkim. Doświadczenia *in vivo* będą miały na celu poszerzenie wyników uzyskanych metodami *in vitro* oraz ocenę wpływu kinazy MLK4 na proces przerzutowania. **Zasada ograniczenia**

Planowane badania uwzględniają ich wykonanie na najmniejszej możliwej liczbie zwierząt w poszczególnych grupach. Przewidziana liczba zwierząt jest niezbędna do przeprowadzenia prawidłowej interpretacji otrzymanych wyników, ważnych statystycznie oraz bez konieczności powtórzenia doświadczeń.

Uzasadnienie liczby zwierząt:

Każda z grup doświadczalnych zwierząt będzie liczyć 10 sztuk.

Obliczenia zostały wykonane używając strony internetowej <http://biomath.info/> pozwalającej określić najmniejszą liczebność dzięki której można zweryfikować hipotezę.

Poniżej zostały wypunktowane założenia statystyczne użyte do określenia liczby myszy potrzebnych do eksperymentu:

- test statystyczny – test *t*-Studenta dla prób niezależnych (two-tailed unpaired *t*-test)
- $\alpha=0,05$ i $1-\beta=0,8$
- średnie wielkości (20-25 ognisk przerzutowych/mysz w grupie kontrolnej; 10-16 ognisk przerzutowych/mysz w grupie doświadczalnej) oraz SD (+/- 3).

Przy takich założeniach otrzymano wynik 10 myszy w każdej grupie.

Tak zaplanowana liczba zwierząt w doświadczeniu wynika z wymagań statystycznych i powinna pozwolić nam na wyciągnięcie wiarygodnych wniosków na temat badanej hipotezy.

Zasada udoskonalenia

Rozwój choroby nowotworowej wiąże się z występowaniem objawów, które mogą być źródłem dyskomfortu dla zwierząt. Wszystkie procedury opisane we wniosku zostały zaplanowane tak, aby ograniczyć do minimum stres oraz dyskomfort zwierząt użytych w doświadczeniu. Planujemy jednak uśmiercenie zwierząt zanim choroba rozwinie się do stadium, w którym zwierzę doświadczałoby

cierpienia. Wyznaczone przez nas kryteria stanu zaawansowania choroby (odwodnienie, utrata masy ciała powyżej 20%, objawy kliniczne rozsianej choroby nowotworowej) są parametrami uznanymi dla danych modeli i stosowanymi przez inne grupy badawcze na świecie.

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.