

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: „**Uzyskanie linii myszy transgenicznych: C57BL/6-GCSFR-flox, C57BL/6(Hoxb5-mCherry)-Neo1-GFP, C57BL/6-GCSF-ZsGreen za pomocą metody CRISPR-Cas9 do badania funkcji hematopoetycznych komórek macierzystych**”

2. Czas trwania projektu: 2 lata

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): C57BL/6(Hoxb5-mCherry)-Neo1-GFP, C57BL/6-GCSF-ZsGreen, C57BL/6-GCSFR-flox, komórki macierzyste, hematopoeza

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.

Wszystkie komórki krwi w naszym organizmie pochodzą z hematopoetycznych (krwiotwórczych) komórek macierzystych (ang. hematopoietic stem cells - HSCs). HSCs rezydują w szpiku kostnym – to one odpowiadają za skuteczność przeszczepów szpiku u ludzi.

Ostatnie badania wskazują, że nie wszystkie komórki HSC są takie same. Wśród komórek HSC są frakcje komórek, które preferencyjnie różnicują od jednego z typów komórek krwi – do komórek mieloidalnych. Ponadto, ta zidentyfikowana frakcja ulega z wiekiem ekspansji. Dlatego też podejrzewa

się, że może ona przyczyniać się do rozwoju ostrych białaczek mieloidalnych związanych ze starzeniem się.

Aby móc badać tą rzadką frakcję komórek należy stworzyć odpowiednie narzędzie eksperymentalne. Zidentyfikowane zostały dwa geny, które wyróżniają opisywaną frakcję komórek mieloidalnych: neogenina -1 (Neo-1) oraz granulocytowy czynnik wzrostu (GCSF) jak i jego receptor (GCSFR). W oparciu o te geny postanowiono stworzyć 3 nowe linie myszy: **C57BL/6(Hoxb5-mCherry)-Neo1-GFP**, **C57BL/6-GCSF-ZsGreen**, **C57BL/6-GCSFR-flox**. Dwie linie myszy, tzw. reporterowe, będą się charakteryzowały ekspresją białka fluorescencyjnego w komórkach w których zachodzi ekspresja neogeniny-1 lub GCSF. W przypadku trzeciej linii wprowadzone zostaną do genu GCSFR sekwencje, które w późniejszych eksperymentach pozwolą na specyficzne indukowane wyłączenie genu w danym typie komórek.

Stworzenie powyższych narzędzi pozwoli na obrazowanie wybranej frakcji komórek HSC w szpiku kostnym oraz na badanie roli GCSFR dla ich funkcjonowania.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

411 myszy domowych

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przedstawiany projekt został przygotowany w oparciu o zasadę 3R aby ograniczyć badania na zwierzętach do niezbędnego minimum.

Zasada zastąpienia:

Obecnie nie ma metod badawczych, które zastąpiłyby funkcjonalne badania nad komórkami HSC z wykorzystaniem myszy.

Przygotowując projekt badawczy sprawdzono w literaturze (baza danych PubMed oraz Google Scholar,

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

hasła: neogenin, csfr3, gcsfr) czy zaproponowane szczepy myszy nie zostały już wcześniej stworzone, lub czy nie istnieją podobne szczepy, które potencjalnie mogłyby być wykorzystane w doświadczeniach.

Według najlepszej wiedzy nie istnieją myszy reporterowe dla genu neo-1. Nie istnieją też myszy Neo-1-CreER, które mogłyby być wykorzystane jako reporterowe po skrzyżowaniu ich z myszami typu loxP-STOP-loxP-reporter.

Jackson Laboratory udostępnia myszy typu knock-out dla genu gcsfr (Csf3rtm1Link, # 017838). Natomiast wyłączenie genu gcsfr w tym modelu jest konstytutywne we wszystkich komórkach. Prowadzi to do mniejszego niż oczekiwany odsetka narodzonych homozygot i braku granulocytów od pierwszych dni życia myszy, oraz powoduje zaburzenie hematopoezy i upośledzenie odporności. Linia ta nie może być używana do badania funkcji komórek HSC. Dlatego potrzeba stworzyć nowe linie transgeniczne: C57BL/6(Hoxb5-mCherry)-Neo1-GFP, C57BL/6-GCSF-ZsGreen, C57BL/6-GCSFR-flox.

Zasada ograniczenia:

Planowane jest, że stworzone nowe linie myszy transgenicznych będą dostępne dla innych grup badawczych.

Zastosowana metodologia tworzenia nowych linii myszy oparta na technologii CRISPR/Cas9 jest istotnym udoskonaleniem metod tradycyjnych, opartych o embrionalne komórki macierzyste i myszy chimeryczne: jest skuteczniejsza, szybsza i nie wymaga długoterminowej hodowli wsobnej dla uzyskania czystego tła genetycznego (modyfikacje są prowadzone bezpośrednio na podłożu genetycznym C57BL6). W doświadczeniu tym planowana jest możliwie jak najmniejsza ilość myszy potrzebna do stworzenia trzech nowych linii: C57BL/6-GCSFR-flox, C57BL/6(Hoxb5-mCherry)-Neo1-GFP, C57BL/6-GCSF-ZsGreen. Biorąc pod uwagę, że około 75% wyizolowanych zarodków przeżywa po mikroiniekcji, z tego 20% zarodków podanych do jajowodów da początek nowym myszom, natomiast tylko 5% myszy urodzonych będzie posiadać oczekiwaną modyfikację genetyczną. Dlatego też w oparciu o artykuły naukowe, wiedzę i doświadczenie planowana liczba 411 zwierząt jest niezbędna, a zarazem minimalną ilością potrzebną aby uzyskać myszy nowych linii transgenicznych.

Zasada udoskonalenia:

Proponowany model **C57BL/6-GCSFR-flox** to istotne udoskonalenie obecnie dostępnego modelu – po

skrzyżowaniu z myszami, które mają ekspresję rekombinazy CreER pod kontrolą tkankowo specyficznego promotora, będzie można wyłączyć gen *gcsfr* w sposób indukowalny w wybranej populacji. To pozwoli uniknąć ostrego fenotypu obserwowanego u dostępnych myszy *Csf3rtm1Link*, oraz umożliwi prowadzenie dużo bardziej precyzyjnych badań. Myszy przebywają w środowisku wzbogaconym o gryzaki i materiał gniazdowy.

Członkowie zespołu mają doświadczenie w wykorzystywaniu CRISPR/Cas9 do modyfikacji zygot, a także w izolacji zygot i ich transferu do jajowodu, co także pozwoli ograniczyć liczbę zwierząt.

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.