

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu Optymalizacja metody CRISPR/Cas9 do otrzymywania zwierząt transgeniczných typu knock-in we wsobnym szczepie C57BL/6

2. Czas trwania projektu 5 lat (20.01.2019-20.01.2024)

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) CRISPR/Cas9, rekombinacja homologiczna, szczep wsobny, C57BL/6

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.

Technologia CRISPR/Cas9 zrewolucjonizowała podejście do otrzymywania transgeniczných modeli zwierzęcych. W 2014 roku rozpoczęliśmy starania o wdrożenie technologii CRISPR w wyprowadzaniu myszy transgeniczných. Metoda okazała się niezwykle skuteczna w naszych rękach i w ciągu ostatnich dwóch lat uzyskaliśmy kilkanaście różnych linii myszy z mutacjami w locus (mutacje typu insercja-delecja, mutacje punktowe, znaczniki). Obejmuje to cztery różne linie knock-in wyrażające białka wzmocnione białkiem fluorescencyjnym (EGFP). Jest to niezwykle obiecujące, gdyż dołączanie większych znaczników in locus wielu laboratoriom sprawia trudności.

Doświadczenia przeprowadzone podczas wdrażania podejścia CRISPR w naszym laboratorium ujawniły, że odsetek udanych zdarzeń homologicznej rekombinacji prowadzącej do generowania pożądaných mutacji typu knock-in jest znacznie niższy we wsobnym szczepie C57BL/6 niż w myszach będących mieszańcami międzyszczepowymi. Jest to zgodne z doświadczeniem innych laboratoriów stosujących metodologię CRISPR, z

którymi się skontaktowaliśmy. Celem projektu jest zwiększenie wydajności integracji homologicznej w szczepie C57BL/6, który jest najpowszechniej stosowanym modelem mysim.

Jesteśmy przekonani, że nasze podejścia pozwoli na zwiększenie współczynnika rekombinacji homologicznej w celu wygenerowania modeli myszy typu knock-in w linii C57BL / 6 z wystarczającą wydajnością i rozsądną szybkością.

Do przeprowadzenia doświadczeń niezbędne są 3 procedury :

1. Wazektomia u samców, które będą następnie użyte do pokryć samic-biorczy
2. Podanie egzogennych hormonów gonadotropowych w iniekcji dootrzewnowej w celu wywołania owulacji u samic-dawczyń, skojarzenie ich z samcami i uzyskanie zygot, które zostaną następnie nastrzyknięte mieszaniną CRISPR i hodowane do osiągnięcia stadium dwukomórkowego.
3. Transfer zarodków poddanych CRISPR do jajowodów samic-biorczyń w ciąży rzekomej (tylko dla najbardziej obiecujących układów).

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Mus musculus:

C57BL/6 – Samice – 366

F1(C57BL/6/Tar x CBA/Tar) – Samice – 234

F1(C57BL/6/Tar x CBA/Tar) – Samce – 10

Łącznie 610 myszy.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując projekt badawczy, sprawdziłam/sprawdziłem istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazach danych:

Pubmed, Google Scholar, ScienceDirect, Ebsco

Wykorzystałam/em słowa kluczowe: CRISPR/Cas9, C57BL/6, mixed background, homologous recombination, knock-in, GFP

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

Na podstawie przeszukania istniejącej literatury, stwierdzam że:

A. Nagromadzony materiał badawczy pozwala na stwierdzenie, że: wprowadzanie mutacji metodą typu knock-in jest bardzo wydajne u myszy mających mieszane tło genetyczne, jednak wydajność ta drastycznie spada u myszy szczepów wsobnych. Badania biomedyczne przeprowadzane na myszach szczepów wsobnych wymagają mniejszej liczby myszy niż te wykonywane na myszach będących mieszańcami, ze względu na jednolitość genetyczną.

B. Brak jest danych dotyczących: Nie opisano dotąd powodu, dla którego rekombinacja homologiczna u myszy szczepów wsobnych przebiega z wiele niższą wydajnością niż u myszy będących mieszańcami międzyszczepowymi. Nie istnieją powszechnie zaaprobowane protokoły gwarantujące zwiększenie wydajności rekombinacji u myszy szczepu C57BL/6.

Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na:

A. Rozwinięcie teoretyczne/poznawcze istniejącej wiedzy w kierunku: otrzymamy informację jakie czynniki mogą zwiększać częstość rekombinacji homologicznej u myszy szczepów wsobnych.

B. Zastosowanie uzyskanej wiedzy polegające na: zoptymalizowanie protokołu otrzymywania zwierząt transgenicznych typu knock-in we wsobnym szczepie C57BL/6 pozwoli w przyszłości znacząco zmniejszyć liczbę zwierząt, które muszą zostać użyte do wyprowadzania nowych modeli myszy transgenicznych

Zastąpienie: wstępne eksperymenty zostały lub zostaną przeprowadzone przy pomocy linii komórkowych, pozwoli to na ograniczenie liczby możliwych układów. Ze względu na specyfikę szczepów wsobnych niezbędne jest optymalizacja procedury właśnie przy pomocy modelu, na którym docelowo ma być stosowany.

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. Kluczowym celem projektu jest docelowe zmniejszenie liczby zarodków niezbędnych do wyprowadzenia myszy knock-in w szczepie wsobnym C57BL/6. Obecnie wydajność wprowadzania dużych znaczników do myszy szczepów wsobnych, a alternatywnymi podejściami jest klasyczna inżynieria genetyczna lub wyprowadzanie linii myszy w mieszanym tle genetycznym, a następnie wsteczne krzyżowanie myszy przez co najmniej 6 pokoleń z myszami docelowego szczepu wsobnego. Obydwa te podejścia wymagają użycia bardzo dużej liczby myszy dla wyprowadzenia pojedynczej linii. Optymalizacja metody CRISPR/Cas9 wydaje się więc optymalnym podejściem do zredukowania liczby wykorzystywanych myszy.

Udoskonalenie: Zarodki będą nastrzykiwane przy użyciu wysokiej klasy mikroiniektora, a zabieg będzie wykonywany przez wytrenowany personel, dzięki czemu znacznie zwiększona będzie przeżywalność zarodków. Wszystkie myszy po operacjach otrzymują kompleksową ochronę przeciwbólową. Zastosowane będą innowacyjne mieszaniny reakcyjne, co mamy nadzieję przyczyni się do udoskonalenia metody.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną²

² Wypełnia właściwa lokalna komisja etyczna ds. doświadczeń na zwierzętach. Należy zaznaczyć właściwe pole.

☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 1 ustawy ☐

TAK - na podstawie art. 53 ust. 3 ustawy

☒ NIE