

**Umsókn um leyfi til afmarkaðrar notkunar erfðabreyttra lífvera, annarra en örvera.****1. Nafn og heimilisfang umsækjanda, sem ber ábyrgð á starfseminni:**

Eiríkur Steingrímsson
Lífefna- og sameindalíffræði Læknadeildar
Læknagarði
Vatnsmýrarvegi 16
101 Reykjavík

Umhverfisstofnun
Áb. _____
20. maí 2014
Tilv. _____

525 4270

525 4886

eirikurs@hi.is

2. Kennitala umsækjanda:

190760-5379

3. Menntun og staða umsækjanda:

PhD, prófessor, læknadeild Háskóla Íslands.

4. Heimilisfang rannsóknarstofu/athafnasvæðis þar sem hin afmarkaða notkun á að fara fram:

Dýrahald og öll vinna við erfðabreyttar mýs verður í dýraaðstöðu Háskóla Íslands í VRIII, sem er undir eftirliti dýralækna við Tilraunastöð Háskólans í Meinafræði, Keldum, v/Vesturlandsveg, IS-112 Reykjavík.

Umsóttur leyfistími er 3 ár

5. Hámarksfjöldi starfsmanna á rannsóknarstofunni (athafnasvæðinu og fjöldi þeirra sem beinlínis starfa við erfðabreyttar lífverur:

Hámarksfjöldi starfsmanna í dýrahaldinu í VRIII þar sem dýrin verða geymd og öll vinna fer fram er 5 en venjulega er um 1-5 starfsmenn að ræða sem sjá um dýrahald.

6. Þjálfun og hæfni starfsfólks:

Ábyrgðarmaður hefur rúmlega tveggja áratuga rannsóknarreynslu í sameindalíffræði og erfðatækni og umtalsverða reynslu af erfðabreyttum lífverum. Hann er líffræðingur með doktorspróf í erfðafræði og vann að doktorsverkefni undir leiðsögn Judith A. Lengyel prófessors við Kaliforníuháskólann í Los Angeles árin 1986-1992. Verkefnið fólst í skilgreiningu á hlutverki tailless gensins í *Drosophila melanogaster* en til þess var m.a. notast við P-element genaferjur. Ferjurnar voru m.a. notaðar til að útbúa transgenískar flugur sem síðan voru rannsakaðar með tilliti til svipgerðar og ýmissa eiginleika. Árin 1993-1997 vann ábyrgðarmaður síðan við National Cancer Institute (NCI) í Bandaríkjunum við rannsóknir á músunum en þær rannsóknir fólust m.a. í tilbúningi erfðabreyttra músa af ýmsum toga, bæði knockout og transgenískra músa.

Auk ábyrgðarmanns starfa að verkefninu vísinda- og tæknimenntað fólk. Nokkrir starfsmenn rannsóknastofunnar munu vinna með erfðabreyttu mýsna en ætíð undir leiðsögn ábyrgðarmanns.



Dýralæknar á Keldum hafa mikla reynslu af dýrahaldi og öllu nauðsynlegu eftirliti.

7. Eðli og umfang starfseminnar:

a) hvaða lífverur á að nota:

Mus musculus. Unnið verður með innfluttar erfðabreyttar mýs sem útbúnar hafa verið af öðrum eða af okkur í samstarfi við rannsóknahóp Dr. Lionel Larue við Institute Curie í París, Frakklandi. Um er að ræða fimm stofna erfðabreyttra mýsa:

1) Skilyrt stökkbreyting (conditional mutations) í geninu sem táknar fyrir umritunarþættinum MITF^{K243R}.

2) Stofn sem ber “conditional” BRAF^{V600E} stökkbreytinguna.

3) Stofn sem ber “conditional” KRAS^{G12V} stökkbreytinguna.

4) TYR::CRE stofninn en hann ber erfðabreytingu þar sem stjórnsvæði Týrósinasa-gensins er sett framan við Cre recombinasa.

5) TYR::CRE-ERT2 en hann er eins og stofninn í lið 4 nema CRE ensímið er hér virkjanlegt með Tamoxifen.

Með því að æxla síðastnefndu tveimur stofnunum við hina þrjá má framkalla áhrif stökkbreytinganna á sérvirkan hátt í litfrumum mýsanna, þar sem TYR genið er venjulega tjáð. Síðastnefndi stofninn leyfir okkur að gera þetta á svæðisbundinn hátt, einungis þar sem Tamoxifen er gefið.

Mýsnar verða notaðar til að prófa áhrif MITF á myndun sortuæxla en mýsnar í 2 og 3 eru þekkt sortuæxlislíkon en mýsin í 1 prófar áhrif MITF.

b) hvaða genaferju/r á að nota:

Genaferjurnar sem notaðar voru til að útbúa mýsnar eru mismunandi í hverju tilfelli. Í tilfelli skilyrtu stofnanna þriggja hefur LoxP-setum verið komið fyrir í ofangreindum genum í erfðafni mýsanna með notkun homologous recombination tækninnar. Í öllum tilfellum eru LoxP-setin eina utanaðkomandi erfðafnið auk valgensins neomycin. Ekkert annað utanaðkomandi erfðafni situr eftir í erfðamengi þessara stofna. Í tilfelli TYR::CRE og TYR::CRE-ERT2 stofnanna er um að ræða plasmíð sem ber 6.1 kb af stýrisvæði Týrósinasa úr mýs fyrir framan annarsvegar CRE og hins vegar CRE-ERT2 samrunapróteinið í plasmíðgenaferju (Delmas og fl., Genesis 36:73-80, 2003). Mýs þessar hafa allar verið notaðar af fjölda rannsóknahópa um árabil án vandræða, nema MITF^{K243R} stökkbreytingin sem er ný og hefur ekki verið lýst áður.

c) hvert er meðalrúmmál rækta:

Engar ræktanir eru fyrirhugaðar á tímabilinu enda hafa erfðabreyttu mýsnar þegar verið útbúnar. Erfðabreyttu mýsnar sjálfar verða aldrei mjög margar í einu þó þeim verði viðhaldið eins lengi og þeirra er þörf til rannsókna.

d) hvaða tækniferli er fyrirhugað að nota:

Aðallega verður notast við æxlanir og síðan töku vefja til rannsókna á tjáningu gena. Notast verður við nútímalegar aðferðir sameindalíffræðinnar eins og þær eru skilgreindar á hverjum tíma.



e) lýsing á ríkjandi veðurfari og hugsanlegar hættur sem staðsetning rannsóknastofu/athafnasvæðis kann að hafa í för með sér:

Allar rannsóknir sem fyrirhugað er að gera verða gerðar innanhúss. Allt músahald fer fram í VRIII og eru dýrin geymd þar í fullkomnum einangrunarbúrum (microisolator), við kjöraðstæður í ágætri dýraastöðu.

8. Áhættumat:

A. Upplýsingar um eiginleika arfþega og arfgjafa eða (þar sem við á) móðurlífveru:

a) Heiti og flokkun:

Mus musculus, hryggdýr.

b) skyldleiki lífveru eða lífvera:

Erfðabreyttu lífverurnar sem hér um ræðir eru erfðabreyttar mýs. Unnið verður með þær innandyra og þeim æxlað innbyrðis og við aðra músastofna.

c) uppruni lífveru eða lífvera:

Músastofnarnir sem notaðir verða koma frá viðurkenndri rannsóknastofu Dr. Lionel Larue við Institute Curie í París, Frakklandi.

d) æxlunarkerfi (kynæxlun/kynlaus æxlun) arfgjafa:

Kynæxlun

e) stöðugleiki móðurlífveru eða arfgjafa m.t.t. erfðaeinkenna sem skipta máli fyrir erfðabreytinguna:

Stöðugleikinn m.t.t. erfðaeinkenna er mikill, a.m.k. í þeim tilfellum sem það hefur verið skoðað sérstaklega.

f) eiginleikar genaferju:

- núkleótíðaröð:

Genافرjurnar hafa þegar lokið hlutverki sínu og eru í erfðaeefni músanna. Í tilfelli FLOX músanna eru LoxP og neomycin raðirnar einu utanaðkomandi raðirnar. Í tilfelli TYR::CRE og TYR::CRE2 eru CRE raðirnar til staðar í erfðaeefni músanna, auk plasmíðraða úr genaferjunni sem notaðar voru til að útbúa mýsnar.

- fartíðni (frequency of mobilization):

Lítill sem engin. Erfðabreytingar þessar eru mjög stöðugar. Ekki hefur orðið vart við nein merki um óstöðugleika þeirrar lína sem hér um ræðir.

- gen sem valda þoli (t.d. sýklalyfjapoli):



Neomycin er til staðar í skilyrtu stökkbreytingunum þremur og ampicillin er til staðar í TYR::CRE og TYR::CRE2 músunum (en er sennilega orðið óvirkt vegna stökkbreytinga þar sem mörg ár eru liðin síðan breytingarnar voru útbúnar og ekkert val í gangi).

g) hýsilsvið:

Hýsilsvið genaferjanna þegar þær eru komnar í transgenískar mýs er takmarkað við mýs eingöngu.

h) önnur lífeðlisfræðileg einkenni sem máli skipta varðandi stöðugleiki þeirra:

Engin kunn.

i) náttúruleg búsvæði og landfræðileg dreifing:

Mýs eru til víða um heim og þar á meðal á Íslandi.

j) víxlverkun og áhrif á aðrar lífverur í umhverfinu (þar með taldar líklegar samkeppnislífverur eða hýslar:

Engin kunn.

k) háttalag og einkenni lífvera ef breytingar verða á lokuðu rými þar sem hin afmarkaða notkun fer fram, eða ef þeim er sleppt út í umhverfið:

Ekki eru þekkt nein sérstök áhrif við breytingum á aðstæðum önnur en þau að mýs almennt talað þola kulda betur en aukinn hita. Ræktun músa fer fram við stofuhita í þar til gerðum einangrunarbúrum (microisolator cages frá Lab Products Inc). Einangrunarburin eru í dýrahúsi í VRIII og er hita og rakastigi stýrt á sjálfvirkan hátt í rými þessu. Mýsnar eru af innræktuðum (inbred) stofni músa og því ólíklegar til að spjara sig í íslenskri náttúru. Ekki er gert ráð fyrir neinum háttalags eða einkennisbreytingum ef mýsnar sleppa út í umhverfið.

l) hliðarafurðir sem verða til samfara fyrirhugaðri afurð erfðabreyttu lífveranna:

Engar sem vitað er.

m) yfirlit yfir hugsanlegar afleiðingar þess að erfðabreyttar lífverur sleppi út í umhverfið:

Ekki er vitað um neinar hugsanlegar afleiðingar þess að erfðabreyttar mýs sleppi út í umhverfið. Þeir músastofnar sem um er að ræða eru innræktaðir og því ekki líklegt að þeir muni spjara sig í íslenskri náttúru ef þeir slyppu út.

B. Eiginleikar erfðabreyttu lífverunnar(anna):

a) lýsing á erfðabreytingum svo og aðferð við að koma genaferju-innskoti fyrir í arfþega eða sú aðferð sem notuð er til að ná fram erfðabreytingum:



BRAF og KRAS mýsnar og TYR::CRE og TYR::CRE2 mýsnar voru útbúnar af öðrum og fáum við þær frá Institut Curie í París. MITF^{K243R} stökkbreytingin var útbúin í samstarfi við Lionel Larue við Institute Curie en hann útbjó einnig til TYR-CRE mýsnar.

Allir ofangreindir músastofnar hafa verið útbúnir með stöðluðum viðurkenndum aðferðum.

b) tilgangur erfðabreytingarinnar eða hlutverk nýja erfðaefnisins:

Allar erfðaefnisbreytingar sem framkvæmdar eru í rannsóknarstofunni eru vegna vísindavinnu eða kennslu. Hlutverk hins nýja erfðaefnis er að hafa líffræðileg áhrif í viðkomandi frumu/dýri til rannsókna.

c) eðli og uppruni genaferju:

Ekkert verður unnið með genaferjurnar, aðeins mýsnar sem útbúnar voru með aðstoð ferjanna.

d) bygging eða fjöldi kjarnsýra úr genaferju eða arfgjafa sem verður eftir í erfðabreyttu lífverunni:

Mýsnar sem bera skilyrtu stökkbreytingarnar bera einungis LoxP-setin og Neomycin valgenið sem utanaðkomandi erfðaeftni. TYR::CRE og TYR::CRE2 mýsnar bera erfðaeftni úr plasmíð-genaferju, auk CRE-gensins.

e) stöðugleiki svipfarseinkenna (traits) erfðabreyttu lífverunnar:

Svipfarseinkennin eru að jafnaði mjög stöðug vegna innlimunar á litning.

f) fartíðni innfelldu genaferjunnar og/eða hæfileiki til genaflutnings:

Genaferjurnar eru ekki tímgunarhæfar utan viðeigandi hýsils.

g) magn og tjáningarhraði nýja erfðaefnisins:

Magn og tjáningarhraði erfðaefnis er mismunandi og ræðst af eðli tilraunar hverju sinni. Um mjög takmarkaða ræktun músastofna er að ræða.

h) virkni hins tjáða próteins:

Í verkefninu er ætlunin að skoða hlutverk, starfsemi MITF umritunarþáttarins í myndun sortuæxla. Notast verður við tvö sortuæxlismódel til að framkalla sortuæxli og MITF stökkbreytt á skilyrtan hátt, annaðhvort í öllum litfrumum (með TYR::CRE sem tjáir CRE ensímið í öllum litfrumum en CRE leyfir endurröðun milli tveggja LoxP-seta og getur því fjarlægt allt erfðaeftni á milli þeirra og þannig framkallað stökkbreytingu sérstaklega í viðkomandi frumum, eða með TYR::CRE-ERT2 sem virkjar CRE einungis þar sem Tamoxifen er einnig gefið (t.d. með því að bera á húð).

C. Heilbrigðissjónarmið

a) ofnæmis- og eiturverkun ólífvænlegra lífvera og/eða efnaskiptaafurða þeirra:



Þær erfðabreyttu lífverur sem ráðgert er að vinna með í þessu verkefni eru ekki þekktar að því að valda ofnæmisverkun í mönnum umfram það sem venjulegar mýs gera.

b) hættur sem tengjast afurðum:

Engar þekktar.

c) samanburður á erfðabreyttum lífverum og arfgjafa, arþega eða (þar sem við á) móðurlífveru m.t.t. meinvirkni:

Ekki er gert ráð fyrir að erfðabreyttar lífverur verði meira meinvirkar en móðurlífveran.

d) sé lífvera meinvirk mönnum með heilbriggt ónæmiskerfi þurfa eftirtaldar upplýsingar að koma fram:

*** sjúkdómur sem hún veldur:**

Lífveran er ekki meinvirk mönnum, fyrir utan stöku bit og stöku tilfelli um ofnæmi gegn músum.

*** smitleiðir:**

*** skammtur sem veldur smiti:**

*** hýsilsvið:**

*** lífsmöguleikar lífveru utan mennsks hýsils:**

*** tilvist genaferju eða dreifingarleiðir:**



* mynstur sýklalyfjapöls:

* líffræðilegur stöðugleiki:

* ofnæmisvirkni:

* tiltæk lækni meðferð:

9. Umhverfissjónarmið

a) þættir sem hafa áhrif á lífslíkur, fjölgun og dreifingu erfðabreyttu lífveranna í umhverfinu

Erfðabreyttu músar eru af innræktuðum stofnum (C57BL/6J og 129/Sv) sem hafa takmarkaða getu utan rannsóknarstofu umhverfis. Vinna með þessar erfðabreyttar lífverur miðar að því að takmarka útbreiðslu þeirra við rannsóknarstofuna eingöngu. Frá því haustið 2006 þegar við hófum vinnu með mús á Íslandi, hefur engin mús sloppið frá okkur. Erfðabreytt dýr eru tilraunadýr sem ekki hafa aðlagast lífi utan tilrauna umhverfis.

b) tiltæk tækni við að finna, greina og hafa eftirlit með erfðabreyttu lífverunni

Til greiningar má nota PCR með prímerum sem greina neomycin og CRE genin.

c) tiltæk aðferðir við að hreinsa svæði ef erfðabreyttar lífverur berast út í umhverfið.

Settar hafa verið upp gildir til að veiða mús og takmarka þannig útbreiðslu þeirra transgenísku músa sem mögulega sleppa út í umhverfið.

d) þekkt og fyrirsjáanleg búsvæði erfðabreyttu lífverunnar

Mús finnast víða á Íslandi utan rannsóknarstofu umhverfis.

e) lýsing á vistkerfum þar sem erfðabreyttum lífverum kynni að vera dreift fyrir slysi



Ef erfðabreyttar mýs dreifðust út úr umhverfi rannsóknarstofunnar væri það líklegast til að gerast í nánasta umhverfi VRIII eða Læknagarðs. Þær fáu mýs sem hugsanlega ná að sleppa úr vandlega einangruðum búrum og dýraaðstöðu í VRIII eru óvanar lífi utan tilraunastofunnar og því ólíklegt að þær nái að spjara sig. Ef erfðabreytt mýs nær hins vegar að fjölga sér utan rannsóknastofunnar er ekki líklegt að afkvæmi hennar fjölgi sér mikið þar sem erfðabreytingin getur haft neikvæð áhrif á möguleika hennar og um innræktaðan stofn er að ræða með takmarkaða getu til að lifa utan rannsóknastofunnar. Líklegt er því að valið verði gegn erfðabreytingunni og hún tapist því smám saman.

f) væntanlegur gangur í og afleiðingar víxlverkana milli erfðabreyttu lífveranna og lífvera sem kynnu að verða fyrir áhrifum ef erfðabreyttar lífverur berast fyrir slysi út í umhverfið:

Víxlverkanir milli erfðabreyttra lífvera og lífvera í umhverfinu verða engar eða hverfandi litlar og líffræðilegar afleiðingar ómerkjanlegar.

g) þekkt og fyrirsjáanleg áhrif á dýr og plöntur svo sem meinvirkni, smitnæmi, eiturverkun, smithætta, ofnæmisvirkni og myndun kólónía:

Engin.

h) tiltækar aðferðir við að hreinsa svæði ef erfðabreyttar lífverur berast út í umhverfið:

Notast má við hefðbundna meindýraeyðingu í nágrenni við þann stað þar sem lífveran barst út í umhverfið.

10. Meðferð úrgangs

a) tegund, magn og hugsanlegar hættur af úrgangi sem á rætur að rekja til notkunar lífvera:

Lífrænum leifum músa er brennt hjá Kólku á Suðurnesjum.

c) tæknilegt fyrirkomulag við meðferð úrgangs, þar með talin söfnun úrgangs í vökvaformi, og aðferðir til að gera hann óvirkan:

Lífrænar leifar músa eru geymdar í frysti þar til úrgangur er fjarlægður en það er gert reglulega.

Saur og sagi er fargað með brennslu vikulega.

d) endanlegt form og förgunarstaður útgangs sem gerður hefur verið óvirkur:

Lífrænum leifum músa er brennt hjá Kólku á Suðurnesjum.

11. Slysavarnir og viðbragðsáætlanir

a) rót hættu og skilyrði sem kynnu að skapa hættu:



Eins og gert hefur verið grein fyrir á öðrum stöðum í umsókn þá er umhverfishætta af þessu verkefni takmörkuð. Rót hættu og skilyrði sem skapa hættu væru fyrst og fremst ef starfsmenn fylgja ekki settum vinnureglum eða ef slys yrði á húsnæði vegna eldsvoða, jarðskjálfta eða þess háttar.

Rannsóknarstofan er staðsett í húsnæði Háskóla Íslands sem setur reglur varðandi slysa- og öryggisráðstafanir. Dýrahald er undir eftirliti dýralækna.

b) forvarnarráðstafanir, t.d. varðandi öryggisbúnað, viðvörðunarkerfi, einangrunaraðferðir og ráðstafanir ásamt tiltækum hjálparúrræðum:

Rannsóknarstofan fylgir í þessum atriðum þeim reglum sem gilda um kennslu- og rannsóknarhúsnæði Háskóla Íslands.

c) þær upplýsingar sem starfsfólk fær í hendur:

Dagsetning:

Undirskrift:

14. 5. 2014

Sendist til

Umhverfisstofnunar, Suðurlandsbraut 24
108 Reykjavík

Eingöngu starfsfólk með viðeigandi menntun og reynslu kemur til með að vinna með erfðabreyttar mýs undir eftirliti umsækjenda. Skyldleseefni starfsmanna rannsóknarstofunnar er eftirfarandi:

Safety in the Molecular Biology Laboratory. Daniel H. Farkas. Kafli úr bókinni Molecular Biology and Pathology sem ritstýrt var af sama höfundu. Academic Press, 1993.

Leiðbeiningar fyrir nýja starfsmenn. Atriði sem farið er yfir með starfsmanni þegar hefur störf.

Lög um erfðabreyttar lífverur, 1996/18.

Reglur um verndun starfsmanna gegn hættu á heilsutjóni af völdum líffræðilegra skaðvalda á vinnustöðum. nr. 554/1996.

d) nauðsynlegar upplýsingar sem veita þarf hlutaðeigandi yfirvöldum til þess að þau geti hannað og komið upp viðhlítandi öryggisáætlunum til nota fyrir utan rannsóknarstofuna/athafnasvæðið:

Byggingarstjóra Háskóla Íslands er kunnugt um eðli starfseminnar í húsinu. Hann hefur yfirumsjón með öryggisáætlunum stofnunarinnar. Alltaf er vakt húsvardar fyrir byggingar Háskólans. Viðkomandi mun gera ábyrgðarmanni viðvart eða öðrum háskólakennara eða vísindamanni lífefna- og sameindalíffræðistofu viðvart ef slys gerist þar sem hætta er á röskun á vörslu eða meðferð erfðabreyttra lífvera. Viðkomandi bæri ábyrgð á viðeigandi viðbrögðum hverju sinni. Hann myndi einnig vera tengiliður rannsóknastofunnar við húsverði háskólans, brunalið eða aðra þá aðila sem hlut ættu að máli.