

OBRAZAC 3

Naslov projekta	Metode za visokoučinkovitu glikoproteomsku analizu <i>Methods for high-throughput glycoproteomic analysis</i> (HTP-GlycoMet)		
Trajanje projekta	01.11.2013.-31.10.2017. * pokusi koji uključuju laboratorijske životinje provode se od 2015. godine do 31.10.2017.		
Ključne riječi (najviše do 5)	Glikozilacija proteina, visokoučinkovita analitika, izolacija glikoproteina, virusna infekcija		
	Svrha projekta (kao u članku 5. Pravilnika):		
	Temeljno istraživanje	da	ne
	Translacijska i primijenjena istraživanja	da	ne
	Korištenje određeno propisima i rutinska proizvodnja	da	ne
	Zaštita prirodnog okoliša u interesu zdravlja ili dobrobiti čovjeka ili životinje	da	ne
	Očuvanje vrste	da	ne
	Visoko obrazovanje ili osposobljavanje	da	ne
	Forenzička ispitivanja	da	ne
	Održavanje kolonije genetski izmijenjenih životinja koje se ne koriste u drugim postupcima	da	ne
Opišite ciljeve projekta (na primjer, znanstvene nepoznanice ili znanstvene ili kliničke potrebe).	Temeljni cilj projekta HTP-GlycoMet je razviti tehnologije za visokoučinkovitu analizu glikozilacije proteina iz tjelesnih tekućina i staničnih membrana i primijeniti ih u svrhe razumijevanja nekih od ključnih procesa u imunologiji i infekcijama. Istraživanje na laboratorijskim miševima predviđeno je s ciljem istraživanja herpesvirusne modulacije glikozilacijskih obrazaca staničnih glikoproteina kao potencijalnog mehanizma izbjegavanja imunološkog odgovora. Cjelokupni proces analize glikoproteina iz staničnih membrana uspostaviti će se putem postojećeg protutijela na glikoprotein MULT-1. Laboratorijski miševi koristit će se u svrhu dobivanja dodatnih monoklonskih protutijela na isti protein, ukoliko postojeća protutijela po svim kvalitativnim karakteristikama (primjerice afinitet vezanja) te kvantitativnim karakteristikama (mogućnost dobivanja odgovarajuće količine potrebnih protutijela, a što je individualna karakteristika svake stanične linije koja luči određeno protutijelo) ne budu u potpunosti odgovarala traženim specifikacijama novorazvijene metode. Nadalje, bit će potrebno razviti protutijela na ostale proteine u fokusu istraživanja virusne imunoregulacije, primjerice proteine H60, RAE-1 obitelj proteina, protein PVR, protein NKp46 i njihove interakcijske partnere i/ili ligande virusnog i staničnog podrijetla. Za isti postupak, dobivanje monoklonskih protutijela na proteine od interesa, bit će korišteni laboratorijski miševi u drugom dijelu istraživanja koje se odnosi na analizu glikozilacijskog statusa proteina humane plazme, poput transferina i alfa-1 glikoproteina.		
Koje su potencijalne prednosti za koje je vjerojatno da proizlaze iz ovog projekta (kako znanost može biti unaprijeđena ili kako ljudi ili životinje mogu imati koristi od projekta).	Glavni cilj projekta je razvoj robusnih, pouzdanih visokoučinkovitih metoda za glikoproteomiku. Relevantnost ovog cilja proizlazi iz činjenice da je glikoproteomika postala jedan od najvećih izazova suvremene biomedicinske znanosti, kako istraživanja, tako i u području kontrole kvalitete i razvoja novih terapijskih pripravaka. Nove metode koje će biti razvijene zahvaljujući ovom projektu doprinijet će fenotipizaciji pacijenata uključenih u velika genomska istraživanja. Osim toga, ove metode omogućit će istraživanja funkcija proteina čija je uloga važna u procesima virusne infekcije, s obzirom da će se proizvesti imunološki relevantni membranski glikoproteini. Na taj način će se poboljšati naše razumijevanje interakcija virusnih proteina i njihovih liganada te njihovog glikozilacijskog profila. Projekt može rezultirati novim pristupima za dijagnostiku i liječenje		

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

	virusnih infekcija.
Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.	U istraživanju će se koristiti BALB/c miševi. Približan broj miševa koji se planiraju koristiti u istraživanju je 80.
U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinjama, vjerojatna / očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?	Životinje će se koristiti za imunizaciju te kao izvor slezene za razvoj hibridoma te će biti potkožno i intraperitonealno imunizirane pročišćenim proteinima - antigenima proizvedenim <i>in vitro</i> različitim ekspresijskim sustavima. Moguća je prolazna blaga nelagoda neposredno nakon injekcije te će se životinje pratiti nakon injiciranja. Očekivana razina težine postupka je blaga.
Primjena načela 3R	
1. Zamjena Navedite zašto se moraju koristiti životinje te zašto se ne mogu koristiti alternativne metode koje ne uključuju životinje.	Životinje će se koristiti s obzirom da ne postoji alternativna metoda koja bi odgovarala zahtjevima za produkciju konvencionalnih monoklonskih protutijela za potrebe pročišćavanja proteina u sklopu projekta. Ukoliko imunizacija specifičnim antigenom ne rezultira pozitivnim monoklonskim protutijelom u 3 uzastopna pokušaja dobivanja hibridoma (tzv. fuzije), a ne budu proizvedeni značajno drugačiji pripravci antigena putem alternativnih ekspresijskih sustava, proizvodnja protutijela na dotični ciljni protein će se obustaviti.
2. Smanjenje Objasnite kako može biti osigurano korištenje minimalnog broja životinja.	Broj korištenih životinja po antigenu bit će reduciran na minimum putem osiguravanja najviše moguće kvalitete antigena za imunizaciju miševa.
3. Poboljšanje Objasniti izbor vrsta i zašto su korišteni životinjski modeli primjereniji od drugih, uzimajući u obzir znanstvene ciljeve. Objasniti opće mjere koje će se poduzeti kako bi se smanjile štete za životinje.	Imunološki sustav laboratorijskih životinja, a u našem slučaju koristit će se miševi, nema alternativu kada je u pitanju proizvodnja širokog spektra konvencionalnih monoklonskih protutijela. U planiranom istraživanju očekivana razina težine postupaka je blaga. Životinje će po injiciranju biti praćene na znakove nelagode ili stresa (što nije očekivano u planiranom istraživanju) te će u slučaju istih životinje biti usmrćene na human način. Općenito, očekuje se da će životinje osjetiti samo BLAGU nelagodu te će biti usmrćene ako problemi sa zdravljem ili dobrobiti prerastu tu razinu. Tijekom pokusa životinje će biti smještene u specijalnim individualno ventilirajućim kavezima (<i>individually ventilated cages, IVC</i>). Na kraju pokusa životinje će biti eutanazirane na humani način.