

OBRAZAC 3

Naslov projekta	Molekularna povezanost između homeostaze kolesterola, membranskog transporta i Alzheimerove bolesti		
Trajanje projekta	1.05.2015. - 31.12.2016.		
Ključne riječi (najviše do 5)	Alzheimerova bolest, bolest Niemann-Pick tipa C, APP, BACE1, NPC1		
	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).	Cilj projekta je razjasniti povezanost između metabolizma proteina APP, homeostaze kolesterola i (dis)funkcije endosomalno/lizosomalnog puta i/ili retromernog kompleksa – dva glavna stanična puta uključena u patogenezu Alzheimerove bolesti (AB).		
Koje su potencijalne prednosti za koje je vjerojatno da proizlaze iz ovog projekta (kako znanost može biti unaprjeđena ili kako ljudi ili životinje mogu imati koristi od projekta).	Ovaj projekt će doprinijeti razumijevanju funkcije proteina APP – ključnog proteina u nastanku peptida Abeta odgovornog za patogenezu Alzheimerove bolesti (AB) te će nastojati razotkriti novu funkciju njegovog C-terminalnog odsječka (APP-CTFβ/C99) u regulaciji metabolizma kolesterola i u regulaciji membranskog transporta. Korištenje primarnih kultura neurona hipokampusa, korteksa i cerebeluma nužno je za utvrđivanje <i>bona fide</i> uloge proteina APP u funkciji stanica neurona, tj. u disfunkciji metabolizma kolesterola i membranskog transporta. Naime, hipokampus predstavlja primarno mjesto nakupljanja peptida Abeta i pojave neurodegeneracije u Alzheimerovoj bolesti, dok se u kasnijim stadijima bolest širi na korteks. U bolesti Niemann-Pick tipa C (NPC) neurodegeneracija je najizraženija u Purkinje neuronima cerebeluma. Stoga su primarne kulture hipokampusa, korteksa i cerebeluma, kao i moždana tkiva ovih regija, najrelevantniji model za određivanje molekularnog mehanizma djelovanja proteina APP u procesima koji dovode do neurodegeneracije u bolestima AB i NPC.		
Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.	Očekuje se da će se koristiti 12 ženki genotipa $NPC1^{+/+}$ i 5 mužjaka genotipa $NPC1^{+/+}$ za dobivanje oko 12 gravidnih miševa genotipa $NPC1^{+/+}$ iz kojih će se na dan graviditeta 16-18 (E16-E18) izolirati mozgovni embriji za uspostavljanje primarnih kultura neurona hipokampusa i korteksa genotipa $NPC1^{+/+}$, $NPC1^{+/-}$ i $NPC1^{-/-}$. Nadalje, očekuje se da će se koristiti dodatnih 6 ženki genotipa $NPC1^{+/+}$, s gore navedenim mužjacima genotipa $NPC1^{+/+}$, u skladu s četvrtim „R“, za dobivanje tek rođenih miševa (P0-P1) za generiranje primarnih kultura Purkinje neurona cerebeluma. Ovih 6 ženki genotipa $NPC1^{+/+}$ će se koristiti dva puta za generiranje tek rođenih miševa (P0-P1). Ukupan broj odraslih životinja iznositi će 23. Približan broj embrija i tek rođenih životinja očekuje se oko 120 (60 embrija i 60 P0-P1 tek rođenih životinja). Za dobivanje po 9 miševa svakog $NPC1$ genotipa ($NPC1^{+/+}$, $NPC1^{+/-}$ i $NPC1^{-/-}$) i starosti 4, 7 i 9 tjedana očekuje se da će se koristiti ukupno 81 životinja.		
U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni	Životinje će biti usmrćene dislokacijom vrata. Embriji (E16-E18) i tek rođene životinje (P0-P1) će biti dekapitirane. Nepovratan tip pokusa		

učinci na životinjama, vjerojatna / očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?	
Primjena načela 3R	
1. Zamjena Navedite zašto se moraju koristiti životinje te zašto se ne mogu koristiti alternativne metode koje ne uključuju životinje.	1. Zamjena - Tijekom ovog projekta, koristit ćemo se metodama koje djelomično izbjegavaju korištenje miševa (ili nekih drugih životinja). Ove zamjenske metode predstavljaju <i>in vitro</i> ili stanične modele humanih bolesti kao što su Niemann-Pick tip C (NPC) i Alzheimerova bolest. To su: a) CHO NPC1-null stanice, koje predstavljaju stanice ovarija kineskog hrčka [engl. Chinese Hamster Ovary (CHO)] u kojima je <i>NPC1</i> gen deletiran, i b) SH-SY5Y stanice, koje predstavljaju stanice neuroblastoma u kojima se humana, živčana izoforma <i>APP</i> gena, APP695, stabilno i prekomjerno generira (SH-SY5Y/APP stanice), koje će biti podvrgnute tretmanu s kemijskim reagensom U18666A. Obje vrste gore navedenih stanica/tretmana će imitirati najznačajniji fenotip bolesti Niemann-Pick tip C, tj. nakupljanje kolesterola unutar stanica. Međutim, iako se početni ili preliminarni pokusi mogu izvršiti u stanicama izoliranim iz glodavaca (CHO stanice) ili u humanim, transformiranim stanicama koje posjeduju fenotip živčanog sustava (SH-SY5Y/APP stanice), ove stanice ne predstavljaju <i>bona fide</i> živčane stanice koje su najbitnije stanice za izučavanje neurodegenerativnih bolesti kao što su NPC i Alzheimerova bolest, a koje su u fokusu ovog projekta. Ovo je razlog zbog kojeg ćemo pored ovih zamjenskih metoda za izučavanje NPC i Alzheimerove bolesti koristiti primarne, živčane stanice izolirane iz miševa koji predstavljaju modele humanih bolesti NPC i Alzheimerove bolesti. Ukoliko uspostavljanje primarnih neurona iz ovih transgenih miševa bude predstavljalo problem, kao zamjenu/alternativu ćemo koristiti mišji soj C57BL/6-J. Primarne kulture neurona hipokampusa, korteksa i Purkinje neurona cerebeluma mišjeg soja C57BL/6-J ćemo tretirati reagensom U18666A kako bismo imitirali bolest NPC. Međutim, ovi <i>in vitro</i> modeli mišjih primarnih živčanih stanica ne mogu u potpunosti replicirati patološke procese koji se odvijaju u određenih regijama mozga karakterističnim za bolest NPC i Alzheimerovu bolest, koje osim živčanih stanica sadrže stanice glia, astrocite, oligodendrocite, ekstracelularni matriks i dr. Stoga će biti neizbježno koristiti mišveve i iz njih izolirati moždane regije korteksa, hipokampusa i cerebeluma kako bismo pratili promjene patoloških procesa karakteristične za pojedine regije mozga u bolesti NPC i Alzheimerovoj bolesti u odnosu na progresiju bolesti.
2. Smanjenje Objasnite kako može biti osigurano korištenje minimalnog broja životinja.	2. Smanjenje - Biološka varijabilnost je značajna odlika medicinskih istraživanja koja otežava mogućnost da se unaprijed može točno predvidjeti veličina uzorka koja je potrebna da se dobiju statistički relevantni rezultati i da se izbjegnu lažni i negativni zaključci. Svaki pokus bit će pažljivo planiran uključujući analiziranje statističke značajnosti svakog pokusa prije nego što se započne sa razmnožavanjem životinja. U tijeku ovog projekta, koristit ćemo prirodne vrste miševa (engl. <i>inbred</i>) umjesto genetički heterogenih vrsta (engl. <i>outbred</i>) zbog toga što će korištenje genetički homogenih, prirodnih miševa osigurati smanjenje ukupnog broja korištenih životinja budući da će manji broj genetički homogenih miševa osigurati statistički značajne rezultate. Također ćemo osigurati da prilikom svakog pokusa maksimum uzorka bude prikupljen od svake pojedinačne životinje/fetusa.
3. Poboljšanje Objasniti izbor vrsta i zašto su korišteni životinjski modeli primjereniji od drugih, uzimajući u obzir znanstvene ciljeve.	3. Poboljšanje - Dobrobit životinja bit će zaštićena u svakom pogledu. Miševi će se držati u standardnim uvjetima za parenje, u socijalnim uvjetima primjerenim miševima. Pod kaveza će biti prekriven stieljom koja im omogućava pravljenje gnijezda, a pristup hrani i vodi će biti <i>ad libitum</i>. Poštovat će se standardi boravišta u

Objasniti opće mjere koje će se poduzeti kako bi se smanjile štete za životinje.	uvjetima od 12 h boravišta na svjetlu i 12 h boravišta u tami. Životinjama će bol i patnja biti svedene na minimum jer u tijeku ovog projekta nisu planirani pokusi koji zahtijevaju kirurške zahvate, operacije niti bilo koji drugi testovi koji se izvršavaju na živim životinjama. Označavanje ušiju i rezanje repa koje će biti obavljeno u svrhu identificiranja životinja i njihove genotipizacije vršit će se na anestetiziranim životinjama.
--	---