

OBRAZAC 3

Naslov projekta	„Uloga receptora NKG2D u razvoju i efektorskim funkcijama imunskog sustava“ Prethodna istraživanja su započela projektom „Uloga receptora NKG2D u razvoju i efektorskim funkcijama imunskog sustava“ (ug.br. 062-0621261-1271) financiran od strane MZOS (2007 – 2012), a nastavljaju se kao dio projekta „Mehanizmi prirodne imunosti u razvoju upale visceralnog masnog tkiva i rezistencije na inzulin u debljini“ (Projekt: HR.3.2.01-0263), Europski socijalni fond (ESF) – Istraživačke stipendije za profesionalni razvoj mladih istraživača i poslijedoktoranada te u okviru potpore Sveučilišta u Rijeci (13.06.1.1.03).		
Trajanje projekta	2 godine		
Ključne riječi (najviše do 5)	B limfociti; Hiperreaktivnost; NKG2D receptor; NK stanice		
	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).	Dosadašnja istraživanja pokazala su da je NKG2D receptor vrlo važan aktivacijski receptor koji svojom distribucijom i funkcijom povezuje urođenu i stečenu imunost te predstavlja molekularni senzor za stanice izložene različitim oblicima stresa kao što su virusne infekcije, UV zračenja, tumorske transformacije, itd.(Zafirova et al., Cell Mol Life Sci., 2011). Iako se NKG2D uvijek spominje u kontekstu izvršnih funkcija stanica, može ga se naći i na vrlo ranim prekursorskim stadijima, već na razini pre-pro-NKP prekursora (Fathman et al., Blood, 2011). S druge strane i ligandi za NKG2D izražavaju se ponekad i neovisno o stresu. Uočeni su primjerice na stromalnim stanicama koštane srži kod ljudi te kod fetalnih stanica mozga u miševa što dodatno potvrđuje njihovu ulogu u vrlo ranim fazama razvoja i ontogeneze (Jung et al., J Exp Med., 2012). U našim prijašnjim istraživanjima provedenim na miševima kojima nedostaje izražaj NKG2D receptora, dobivenih ciljanom mutacijom <i>Klrkl</i> gena, pokazano je da NKG2D ima važnu regulatornu ulogu u razvoju stanica NK kontrolirajući njihovu proliferaciju, homeostazu i preživljenje. NKG2D deficijencija rezultira razvojem hiperreaktivnih stanica NK te posljedično boljom kontrolom MCMV infekcije posredovane stanicama NK, iako sam mehanizam razvoja hiperreaktivnih stanica NK još uvijek nije razriješen. Također uočen je smanjen postotak i brojnost limfocita B što je bilo posebno zanimljivo budući da NKG2D nije izražen na zrelih		

	limfocitima B (Zafirova i sur., <i>Immunity</i>, 2009). Upravo ta činjenica otvara pitanje u kojoj fazi razvoja limfocita B NKG2D receptor ima utjecaj na opaženi fenotip, te da li nedostatak ovog receptora dovodi do promjena izvršnih funkcija limfocita B. Stoga ćemo naše daljnje istraživanje podijeliti na dva dijela te pokušati dati odgovore na pitanja s jedne strane koji je uzrok hiperreaktivnosti stanica NK kod NKG2D-deficijentnih miševa te koje su posljedice te hiperreaktivnosti na kontrolu tumora ali i drugih klinički relevantnih bolesti kao što je šećerna bolest. Dok ćemo se s druge strane orijentirati prema limfocitima B i istraživati posljedice nedostatka izražaja NKG2D receptora na razvoj i izvršne funkcije limfocita B te potencijane kliničke važnosti opaženog fenotipa.
Koje su potencijalne prednosti za koje je vjerojatno da proizlaze iz ovog projekta (<i>kako znanost može biti unaprijeđena ili kako ljudi ili životinje mogu imati koristi od projekta</i>).	NKG2D receptor je vrlo važan aktivacijski receptor koji svojom distribucijom i funkcijom povezuje urođenu i stečenu imunost te predstavlja molekularni senzor za stanice izložene različitim oblicima stresa (Zafirova et al., <i>Cell Mol Life Sci.</i>, 2011). Naša publicirana i preliminarna ispitivanja pokazuju da nedostatak NKG2D izražaja ima posljedice na razvoj i fenotip raznih limfocitnih populacija što nam dodatno ukazuje na njegov značaj. Upotrebom genetski modificiranih miševa, biti ćemo u mogućnosti odrediti u kojoj je fazi razvoja pojedine limfocitne populacije potreban njegov izražaj kao i istražiti kako bi uklanjanje njegovog izražaja u određenoj fazi razvoja određene limfocitne populacije (NK ili B limfocita) utjecalo na njihov razvoj i fenotip. Također, na temelju publiciranih rezultata jedna od naših hipoteza je da nedostatak NKG2D receptora ima utjecaj na aktivnost drugih aktivacijskih receptora izraženih na stanicama NK. Ukoliko se pokaže da NKG2D receptor nadzire aktivnost drugih aktivacijskih receptora i da li je taj proces specifičan za samo neke od njih, to bi bio novi i važan doprinos u razumijevanju biologije stanica NK i postavljanja praga njihove aktivacije. Ovo je osnovno biološko pitanje u ovom području o kojem još postoje brojni prijedori, a molekularni mehanizam nadziranja praga aktivacije bilo inhibicijskim bilo aktivacijskim receptorima je uglavnom nepoznat. Isto tako, razjašnjavanje mehanizma utjecaja NKG2D na aktivnost drugih aktivacijskih receptora i njihove uloge u kontroli tumora ima jasne kliničke implikacije te postavlja osnovu za moguću manipulaciju stanicama NK u smislu učinkovitije stanične terapije tumora i infektivnih bolesti. U kontekstu limfocita B istražiti ćemo kako uočeni fenotip limfocita B kod miševa kojima nedostaje izražaj NKG2D receptora utječe na kontrolu klinički važnih bakterijskih infekcija (npr. model sepse i infekcije <i>Francisellom novicidom</i>

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

	koja kod miševa uzrokuje bolest sličnu ljudskoj tularemiji).
Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.	U istraživanju će se koristiti laboratorijski miševi C57BL/6J soja i genetički modificiranih izvedenica. Približan broj miševa koji se planiraju koristiti u istraživanju tijekom 2 godine je 1746.
U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinjama, vjerojatna / očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?	U pokusima u kojima ćemo ispitivati kako nedostatak izražaja NKG2D receptora utječe na fenotip i izvršne funkcije određene limfocitne populacije (određenih subpopulacija limfocita B i stanica NK) životinje ćemo usmrtniti te iz različitih tkiva izolirati stanice. Očekivana razina težine ovih pokusa je blaga. Životinjama kojima ćemo dijetom inducirati nastanak inzulinske rezistencije provodit ćemo test tolerancije na glukozu ili test na inzulinsku rezistenciju tijekom praćenja razvoja bolesti, a po završetku pokusa životinje će biti usmrćene, a njihovi organi/stanice analizirani. Tijekom ovih pokusa životinje će trpjeti samo blagu i privremenu bol tijekom venske punkcije. Pojedinim grupama životinja injicirati će se određeni patogeni (MCMV ili bakterija <i>Francisella novicida</i>) i u određenom vremenskom periodu nakon infekcije životinje će biti usmrćene (nakon 24h kod bakterijske ili 4 dana kod virusne infekcije), a njihovi organi/stanice/tkiva/tumor analizirani. Moguća je prolazna blaga nelagoda neposredno nakon injiciranja, te će se životinje pratiti. U eksperimentima u kojima istražujemo kako NKG2D deficijencija utječe na kontrolu tumora očekivano je da će životinje trpjeti blagu do umjerenu bol kao posljedicu razvoja tumora stoga će miševi biti svakodnevno praćeni sukladno obrascu u točki 4.11.5 Zahtjeva za odobrenje projekta. Ukoliko se uoči da životinja trpi jaku bol neće se čekati njihova smrt, već će ovisno o procjeni stanja miševi biti usmrćeni na humani način. Pojedinim grupama životinja će biti injicirana protutijela u svrhu deplecije/blokade pojedinih staničnih populacija/receptora. Moguća je prolazna blaga nelagoda neposredno nakon navedenih tretmana, te će se životinje pratiti. Pojedini miševi će biti podvrgnuti operacijskom postupku laceracije slijepog crijeva. To je uobičajeni modelni postupak (Rittirsch et al., Nature Protocols, 2009.) kojim se kod miševa inducira stanje koje oponaša sepsu kod ljudi. Životinje će pri tom pokusu biti anestetizirane izofluoranom. Nakon postupka životinje će se pomno pratiti te će im se svakih 4 sata ubrizgavati doza analgetika butorphanola. Ovaj postupak spada u teške oblike pokusa s obzirom na patnju životinja, ali budući da će se koristiti propisana doza analgetika očekujemo da će životinje iskusiti najviše blagi stupanj boli.
Primjena načela 3R	
1. Zamjena	Životinje će se koristiti budući da za istraživanje uloge NKG2D-

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

Navedite zašto se moraju koristiti životinje te zašto se ne mogu koristiti alternativne metode koje ne uključuju životinje.	a kao imunosnog receptora ne postoji bolja (alternativna) metoda jer za opažanje interakcija više organskih sustava koje moramo uzeti u obzir ne postoje metode/protokoli koji bi laboratorijske životinje zamijenili modelom staničnih kultura. Imajući u vidu kompleksnost imunološkog sustava i međusobnih interakcija pojedinih njegovih komponenti, <i>in vitro</i> istraživanja ne mogu pružiti cjelokupnu sliku stvarnih zbivanja u organizmu tijekom imunološke reakcije na tumor ili infekciju te je neophodno istraživanje na životinjama. Zbog etičkih razloga, slična istraživanja na humanoj populaciji su vrlo ograničena ili nisu moguća.
2. Smanjenje Objasnite kako može biti osigurano korištenje minimalnog broja životinja.	U pojedinim grupama životinja uključenim u istraživanje koristit će se najmanji mogući broj životinja koji omogućava dobivanje statistički relevantnih podataka.
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 je jedan složen sustav koji obuhvaća veliki broj staničnih populacija, njihovu međusobnu interakciju, kao i interakciju imunoloških stanica sa drugim stanicama u organizmu. Upravo zbog toga kako bi se što točnije istražilo kako nedostatak jednog receptora utječe na razvoj i funkcije pojedinih limfocitnih populacija nužno je i neizbježno koristiti animalne modele. Koristeći miševe kao animalni model omogućava nam širok spektar tehnika i oruđa kojima ćemo biti u mogućnosti što preciznije odgovoriti na naša znanstvena pitanja. Koristeći genetički modificirane sojeve moći ćemo vidjeti kako delecija NKG2D izražaja u određenoj fazi razvoja pojedine limfocitne populacije utječe na njihov fenotip i funkciju. U dijelu istraživanja u kojemu ispituje kako NKG2D deficijencija utječe na kontrolu tumora zbog složenosti procesa koji se istražuje nije moguće koristiti alternativne metode. Životinjama će tijekom svih eksperimenata biti praćeni znakovi nelagode ili stresa te će u slučaju istih životinje biti usmrćene na human način. Općenito, očekuje se da će životinje osjetiti samo BLAGU do umjerenu nelagodu te će biti usmrćene ako problemi sa zdravljem ili dobrobiti prerastu tu razinu. Tijekom pokusa životinje će biti smještene u grupama u individualno ventiliranim kavezima (engl. Individually ventilated cages, IVC). Na kraju pokusa životinje će biti eutanazirane na human način.