

**OBRAZAC 3**

|                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|----|
| Naslov projekta                                                                                                                                                                      | Karakterizacija preuređivanja endosomalnih membrana tijekom rane faze infekcije mišjim citomegalovirusom koje vodi k formiranju kompleksa za stvaranje viriona                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |    |
| Trajanje projekta                                                                                                                                                                    | lipanj 2016- rujan 2019.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |    |    |
| Ključne riječi (najviše do 5)                                                                                                                                                        | Mišji citomegalovirus, endosomi, sklapanje viriona, egzocitoza                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |    |
|                                                                                                                                                                                      | 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).                                                                                   | <p>Infekcija beta-herpesvirusima izaziva opsežnu reorganiziraju unutarstaničnih odjeljka u svrhu stvaranja okruženja za stvaranje virusa, poznatog kao kompleks za stvaranje virusa (AC, engl. <i>assembly complex</i>). Ova struktura razvija se postupno, počevši od najranijih stadija infekcije, i uključuje stupnjevit reorganizaciju membranskih organela. Iako je sastav i organizacija AC relativno dobro karakterizirana tijekom infekcije humanim citomegalovirusom (CMV), dio događanja koji vodi razvoju AC-a je slabo poznat. Cilj ovoga projekta je karakterizirati procese koji prethode stvaranju AC-a u stanicama inficiranim mišjim CMV-om (MCMV). MCMV započinje remodeliranje endosomalnog sustava vrlo rano tijekom infekcije, što smo karakterizirali kao razvoj endosomalnog retencijskog odjeljka rane faze (EPERC). Postoji jaka indikacija da je upravo EPERC prethodnih AC-a. Općenito je prihvaćeno da je remodeliranje endosomalnog sustava posredovano malim GTPazama iz Rab i Arf obitelji te fosfoinozitudima.</p> <p>U predloženom projektu cilj nam je razotkriti procese reorganizacije membranskih organela tijekom rane faze infekcije, koji dovode do stvaranja AC-a. U tu svrhu utvrditi ćemo ulogu malih ATPaza iz obitelji Rab i Arf te njihovih efektorskih proteina tijekom stvaranja EPERC. Naposljetku, karakterizirati ćemo membranske domene EPERC-a tijekom rane faze infekcije obzirom na sastav fosfoinozitida. To će uključivati proučavanje endosomalnih efektorskih proteina koji se vezuju na fosfoinozitide i glavnih endosomalnih enzima koji nadziru konverziju fosfoinozitida i tako mijenjaju osobine membrana. Kako bismo postigli navedene ciljeve koristiti ćemo trostruko imunofluorescencijsko bojanje EPERC-a, fluorescentne boje stvorene genetičkim inženjeringom, utišavanje RNA i farmakološke inhibitore. Konačni ishod predloženog istraživanja biti će rekonstrukcija mehanizma razvoja EPERC-a i identifikacija staničnih proteina koji predstavljaju mjesto djelovanja MCMV-a tijekom rane faze infekcije. Kako bismo ostvarili te ciljeve, potrebna je kombinacija ekspertiza iz molekularne virologije, stanične biologije, CMV infekcije, te posebice stanične fiziologije vezikularnog prijenosa.</p> |    |    |
| 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). | Predloženo istraživanje spada u temeljna istraživanja. Rezultati predloženih istraživanja doprinijet će razumijevanju mehanizama kojima virus (u našem slučaju član porodice herpesvirusa) prilagođava sustav stanice za potrebe vlastitog umnažanja. Osim toga, razotkrivanje mehanizama kojim virus prilagođuje endosomalni sustav omogućit će bolje razumijevanje fiziologije endosomalnog sustava i regulatornih molekula koje oblikuju endosomalni sustav. Virusni                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |    |    |

Ministarstvo poljoprivrede  
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

|                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                                                                                                                                                                          | efektorski mehanizmi (proteini) mogu biti ciljne molekule za razvoj antivirusnih lijekova i virusnih vakcina. Regulatorne molekule endosomalnog sustava mogu biti ciljne molekule za razvoj lijekova u različitim bolestima kojim je u podlozi poremećen endosomalni promet, primjerice u tumorima ili neurodegenerativnim bolestima.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.                                                                                                                                                                     | Istraživanja u predloženom projektu će se provoditi na staničnim linijama koje imaju karakteristike fibroblasta. Planirano je korištenje mišjih embrionalnih fibroblasta (MEF) za početna istraživanja i usporedbe sa fibroblastnim staničnim linijama te potpuni prelazak na fibroblastne stanične linije. Nadalje, planirano je korištenje MEF za proizvodnju virusa koji će se koristiti za infekcije <i>in vitro</i> . Očekujemo da ćemo uspostaviti uspješnu proizvodnju virusa i na fibroblastnim staničnim linijama te napustiti proizvodnju virusa na MEF. Za proizvodnju MEF biti će potrebno 50 Balb/c miševa.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinjama, vjerojatna / očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?                                                                      | Žrtvovanje životinja za dobivanje stanica.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| <b>Primjena načela 3R</b>                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| <b>1. Zamjena</b><br>Navedite zašto se moraju koristiti životinje te zašto se ne mogu koristiti alternativne metode koje ne uključuju životinje.                                                                                         | Većina dosadašnjih eksperimenata (kroz više desetljeća) iz stanične biologije mišjeg citomegalovirusa (MCMV) je provedena na mišjim embrionalnim fibroblastima u kojima je replikacija relativno brza a same stanice su pogodne za višednevno držanje u kulturi jer se ne množe prebrzo. Mi smo proveli veći dio preliminarnih usporedbi MEF sa drugim staničnim linijama. Naši rezultati kazuju da se Balb 3T3 stanice ponašaju slično kao i MEF te, stoga, planiramo potpuni prelazak na rad s Balb 3T3 stanicama i zamjenu stanica dobivenih iz životinja sa imortaliziranim stanicama stanične linije. No očekujemo da će za potpuni prelazak biti potrebno provesti još nekoliko usporednih eksperimenata.<br>MEF se već desetljećima koriste za proizvodnju infektivnih virusa koji će se koristiti za infekcije <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> . Očekujemo, slično kao i s eksperimentima, da ćemo uspostaviti uspješnu proizvodnju virusa i na fibroblastnim staničnim linijama (Balb 3T3) te napustiti proizvodnju virusa na MEF. |
| <b>2. Smanjenje</b><br>Objasnite kako može biti osigurano korištenje minimalnog broja životinja.                                                                                                                                         | Zamjenom MEF s Balb 3T3 staničnom linijom u potpunosti će se napustiti korištenje životinja za ovakvu vrstu eksperimenata.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| <b>3. Poboljšanje</b><br>Objasniti izbor vrsta i zašto su korišteni životinjski modeli primjereniji od drugih, uzimajući u obzir znanstvene ciljeve.<br>Objasniti opće mjere koje će se poduzeti kako bi se smanjile štete za životinje. | Mišji citomegalovirus (MCMV) se koristi kao model za proučavanje infekcije ljudi s humanim citomegalovirusom (HCMV) jer na ljudima gotovo nemoguće provesti istraživanja <i>in vivo</i> . Slično je i s eksperimentima <i>in vitro</i> gdje je MCMV daleko pogodniji zbog većeg izbora staničnih linija i bržeg replikacijskog ciklusa u postojećim modelima.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |