

OBRAZAC 3

Naslov projekta	Molekularni mehanizam neurodegeneracije u Niemann-Pickovoj bolesti tip C		
Trajanje projekta	1.06.2017. - 31.05.2021.		
Ključne riječi (najviše do 5)	APP, BACE1, NPC1, Sez6, Sez6L		
	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 ovog projekta je istražiti ulogu BACE1 u neuropatogenezi Niemann-Pickove bolesti tipa C te ispitati može li inhibicija BACE1 biti novi pristup u razvoju liječenja ove bolesti. Također, cilj je ispitati je li se u starijih prenositelja NPC bolesti (NPC1 heterozigota) mogu uočiti određene patološke karakteristike bolesti, ukazujući da bi prenositelji NPC1 bolesti također trebali biti uključeni u zdravstvenu njegu i dobivati adekvatnu terapiju s ciljem smanjenja određenih patoloških karakteristika bolesti, kao, npr. tauopatije.		
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).	Ovaj projekt će doprinijeti razumijevanju funkcije enzima BACE1 i njegovih supstrata Sez6, Sez6L i APP u patogeneti dječje neurodegenerativne bolesti Niemann-Pick tipa C (NPC). Protein BACE1 igra ključnu ulogu u nastanku Alzheimerove bolesti (AB) te bi naši rezultati mogli doprinijeti otkrivanju dodatnih sličnosti između ove dvije neurodegenerativne bolesti. To bi moglo dovesti do razvoja jedinstvene terapije za liječenje i/ili smanjenje progresije ovih bolesti. Pretpostavljamo da će predložena istraživanja ukazati da inhibicija BACE1 može biti korisna ne samo u smanjenju progresije i/ili liječenju Alzheimerove bolesti nego i bolesti Niemann-Pick tipa C. Korištenje primarnih kultura neurona hipokampusa i cerebeluma nužno je za utvrđivanje <i>bona fide</i> uloge proteina Sez6, Sez6L, APP i BACE1 u funkciji stanica neurona, tj. u nakupljanju kolesterola, neurodegeneraciji Purkinje neurona i hiperfosforilaciji proteina tau. Naime, hipokampus predstavlja primarno mjesto nakupljanja peptida Aβeta i pojave neurodegeneracije u Alzheimerovoj bolesti, dok je u bolesti Niemann-Pick tipa C (NPC) neurodegeneracija najizraženija u cerebelumu. Stoga su primarne kulture hipokampusa i cerebeluma najrelevantniji model za određivanje molekularnog mehanizma djelovanja proteina Sez6, Sez6L, APP i BACE1 u procesima koji dovode do neurodegeneracije u bolestima AB i NPC. Da bi što vjernije rekapitulirali kompleksnost moždanog tkiva i interakcije neurona s ostalim stanicama u mozgu, uspostaviti ćemo <i>ex vivo</i> model bolesti NPC, tj. kulture organotipskih rezova hipokampusa i cerebeluma NPC1-miševa kako bismo ispitili ulogu BACE1 u neuropatološkim promjenama u bolesti NPC. Također, ovaj projekt će doprinijeti rasvjetljavanju patoloških karakteristika NPC bolesti u prenositelja. Smatra se da kod recesivnog oboljenja kao što je NPC bolest, prenositelji bolesti ne bi trebali pokazivati nikakve patološke karakteristike bolesti. Međutim, u do sada objavljenom rednom radu pokazano je da i stariji NPC1 miševi u mozgovima pokazuju povišenu razinu proteina p-tau. U ovom projektu ćemo detaljnije		

	ispitati pojavu glavnih patoloških karakteristika NPC bolesti u starijih miševa $NPC1^{-/-}$ i $NPC1^{+/-}$. Rezultati ovog istraživanja bi mogli ukazati da se u prenositelja NPC bolesti kod ljudi u starijoj dobi može očekivati pojava tauopatije ili dr. patoloških promjena te da bi ovi pacijenti, prenositelji NPC bolesti, također trebali dobiti adekvatnu zdravstvenu njegu i terapiju u smislu smanjenja ili usporavanja određenih patoloških stanja, kao npr. razvoja tauopatije.
Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.	Očekuje se da će se koristiti 20 ženki genotipa $NPC1^{-/-}$ i 6 mužjaka genotipa $NPC1^{+/-}$ za dobivanje oko 20 gravidnih mišica genotipa $NPC1^{-/-}$ iz kojih će se na dan graviditeta 16-18 (E16-E18) izolirati mozgovni fetusi za uspostavljanje primarnih kultura neurona hipokampusa genotipa $NPC1^{-/-}$ i $NPC1^{+/-}$. Nadalje, očekuje se da će se koristiti dodatnih 20 ženki genotipa $NPC1^{-/-}$, sa gore navedenim mužjacima genotipa $NPC1^{+/-}$, u skladu sa četvrtim „R“, za dobivanje tek rođenih miševa za generiranje primarnih kultura Purkinje neurona cerebeluma (P0-P1), za generiranje kulture organotipskih rezova hipokampusa (P9) i kulture organotipskih rezova cerebeluma (P9). Ukupan broj odraslih životinja iznositi će 118. Približan broj embrija i tek rođenih životinja očekuje se oko 240 (80 embrija i 160 tek rođenih životinja) od čega će se za generiranje primarne kulture Purkinje neurona koristiti približno 80 novorodenih miševa (P0-P1), a za kulture organotipskih rezova hipokampusa i cerebeluma (P9) približno 80 novorodenih miševa. Za dobivanje po 12 miševa svakog $NPC1$ genotipa ($NPC1^{-/-}$ i $NPC1^{+/-}$) i starosti 4, 9 i 15 tjedana očekuje se da će se koristiti ukupno 72 životinje. Za dobivanje ovih životinja bit će potrebno pariti 36 parova $NPC1^{+/-}$ (36 ženki i 36 mužjaka po principu sestra-brat). Za generiranje $NPC1^{-/-}$ miševa u kojima je deletiran samo jedan alel $BACE1$ ($NPC1^{+/-}$, $BACE1^{+/-}$) ili oba alela $BACE1$ ($NPC1^{+/-}$, $BACE1^{-/-}$) koristit ćemo 6 mužjaka $BACE1$ KO miša koja ćemo pariti s $NPC1^{+/-}$ ženkama. Također, parit ćemo 10 $BACE1$ KO ženki s mužjacima genotipa $NPC1^{+/-}$. Za dobivanje po 12 miševa genotipa $NPC1^{+/-}$, $BACE1^{+/-}$ ili $NPC1^{+/-}$, $BACE1^{-/-}$ i starosti 4, 9 i 15 tjedana očekuje se da će se koristiti ukupno 72 životinje. Za praćenje glavnih patoloških karakteristika NPC bolesti u $NPC1$ heterozigota ($NPC1^{+/-}$) koristit će se po 12 životinja starosti 40, 60, 80 i 100-tjedana i genotipa $NPC1^{+/-}$ i $NPC1^{-/-}$ (ukupno 96 životinja).
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 biti usmrcene dislokacijom vrata. Fetusi (E16-E18) i tek rođene životinje (P0-P1, P9) će biti dekapitirane. Sve heterozigotne životinje koje neće biti potrebno uključiti u pokus će se eutanizirati u komori ugljičnog dioksida. Očekivana je blaga razina težine postupka.
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 $NPC1$ gen u potpunosti deletiran, i b) SH-SY5Y stanice, koje predstavljaju stanice humanog neuroblastoma, koje će biti podvrgnute tretmanu s kemijskim reagensom U18666A (najčešće korišten reagens za „oponašanje“ nakupljanja kolesterola u bolesti NPC). Obje vrste gore navedenih stanica tretmana će imitirati najznačajniji fenotip bolesti Niemann-Pick tip C što predstavlja nakupljanje kolesterola unutar stanica. Međutim, iako se početni ili preliminarni pokusi mogu izvršiti u stanicama izoliranim iz glodavaca (CHO stanice) ili u staničnoj liniji humanih stanica neuroblastoma (SH-SY5Y), 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. Međutim, ovi <i>in vitro</i> modeli primarnih živčanih stanica iz miševa ne mogu u potpunosti replicirati patološke procese koji se odvijaju u određenim 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 <i>ex vivo</i> kulture organotipskih rezova hipokampusa i cerebeluma kao i miševe <i>in vivo</i> 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 izbjegn timer 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 prirodene 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. Za utvrđivanje broja korištenih životinja korišten je <i>Russ Lenth's Power and Sample Size test</i> (http://homepage.stat.msu.edu/~rleth/Power/), a dobivene vrijednosti ćemo analizirati parametrijskim Student t-testom za neovisne uzorke (http://vassarstats.net/).
3. Pобоljšanje Objasn timer izbor vrsta i zašto su koriš timer životinjski modeli primjereniji od drugih, uzimajući u obzir znanstvene ciljeve. Objasn timer opće mjere koje će se poduzeti kako bi se smanjile štete za životinje.	3. Pобоljšanje - 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 stihom koja im omogućava pravljene gnjezda, a pristup hrani i vodi će biti <i>ad libitum</i>. Poštovat će se standardi boravišta u 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 anesteziranim životinjama.

