

Naslov projekta	Uloga heterozigotnosti gena za <i>ribosomski protein S6</i> u zloćudnoj preobrazbi stanica	
Trajanje projekta	01.05.2017 - 31.04.2021.	
Ključne riječi (najviše do 5)	ribosomski protein S6, supresor tumora p53, zloćudni tumori	
	Svrha projekta (kao u članku 5. Pravilnika)	
	Temelno istraživanje	☒ da ☐ ne
	Translacijska i primijenjena istraživanja	☒ da ☐ ne
	Korištenje određenih propisa 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).	Glavno područje rada u našem laboratoriju je istraživanje ribosoma i mehanizama putem kojih pogreške u njihovoj sintezi uzrokuju bolesti u sisavaca. Ribosomi su stanični strojevi koji proizvode bjelancevine, sastoje se od 80 ribosomskih proteina (RP) i 4 ribosomske RNA (rRNA), a sintetiziraju se u jezgri. U ovom projektu istražit ćemo funkcije RPS6, ključne komponente ribosoma. Brojna istraživanja tijekom proteklih desetak godina dokazala su da heterozigotne mutacije specifičnih RP uzrokuju patološke promjene u životinjskim pokusnim modelima te nekoliko bolesti u ljudi koje su povezane s povećanom incidencijom zloćudnih tumora, uključujući delecijski sindrom 5q i anemiju Diamond-Blackfan. Na temelju objavljenih spoznaja o povezanosti mutacija RP i zloćudnih tumora pretpostavljamo da heterozigotnost za <i>RPS6</i> uzrokuje specifične molekularne promjene koje potiču zloćudnu preobrazbu normalnih stanica. Nedavno je dokazano da heterozigotnost za RPS6 aktivira supresor tumora p53, stoga pretpostavljamo da bi taj mehanizam mogao imati zaštitnu ulogu od zloćudne preobrazbe stanice uslijed pogrešaka u sintezi ribosoma. Mišji embrionalni fibroblasti (MEF) izvrstan su i često korišten pokusni stanični model za istraživanje molekularnih mehanizama zloćudne preobrazbe uslijed genetičkih promjena. Odgovarajućim križanjima u okviru Cilja 1 proizvest će se MEF-ovi u kojima se može uvesti inaktivirati jedan alel gena za RPS6, gen p53, ili njihova kombinacija. Nakon inaktivacije tih gena, u okviru Cilja 1, testirat će se tumorogeni potencijal specifično proizvedenih MEF-ova <i>in vitro</i> te će se odrediti učinak na strukturu jezgre i njezine funkcije <i>in vitro</i>. Budući da je RPS6 ključna komponenta ribosoma čiji nedostatak može dovesti do smanjenja ukupne sinteze ribosoma, u okviru Cilja 1, odredit će se utjecaj heterozigotnosti za <i>RPS6</i> na ukupni kapacitet sinteze proteina <i>in vitro</i> te identificirati mRNA molekule čija je translacija na ribosomima poremećena. U okviru Cilja 2 MEF-ovi izelirani u okviru Cilja 1 injicirat će se u imunokompromitirane antičene mišve (engl. <i>nude</i>) u svrhu testiranja njihovog tumorogenog potencijala <i>in vivo</i>. Osim toga, u okviru Cilja 3 koristit ćemo ograničen broj p53 negativnih miševa i miševa divljeg tipa u dobi od 4 i 8 tjedana za uzimanja tkiva za analizu zbog dobivanja dodatnog uvida u ulogu p53 inaktivacije na strukturu i funkciju jezgre. Provedba predloženog istraživanja razjasnit će znanstveni problem kako sniženi izražaj RP ključnih sastavnica staničnih strojeva koji omogućuju rast stanice uzrokuje zloćudne tumore. Nadalje, dodatno će biti razjašnjeni molekularni mehanizmi putem kojih promjene strukture i funkcije jezgre, sinteze ribosoma i bjelancevina u MEF-	
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)	Provedba predloženog istraživanja razjasnit će znanstveni problem kako sniženi izražaj RP ključnih sastavnica staničnih strojeva koji omogućuju rast stanice uzrokuje zloćudne tumore. Nadalje, dodatno će biti razjašnjeni molekularni mehanizmi putem kojih promjene strukture i funkcije jezgre, sinteze ribosoma i bjelancevina u MEF-	

	ovima heterozigotnima za RPS6 doprinose zloćudnoj preobrazbi te uloga supresora tumora p53 u tom procesu. Ova projekti omogućit će razumijevanje mehanizama patogeneze zloćudnih tumora nastalih uslijed poremećaja u sintezi ribosoma.
Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.	U ovom istraživanju u okviru Cilja 1 koristit ćemo miše pokusne modele u kojima su aleli gena za RPS6 i p53 omeđeni loxP sljedovima, miševi u kojima je uveden gen za eGFP omeđen loxP sljedovima te miša koji izražava rekombinazu Cre (deleter Cre) u svrhu križanja za dobivanje trudnih ženki iz kojih će se izolirati embriji za proizvodnju MEF-ova. Predviđeni ukupni broj korištenih životinja u Cilju 1 iznosi 150. U okviru Cilja 2, MEF-ovi proizvedeni u Cilju 1 injicirat će se u imunokompromitirane atimične miševe u svrhu istraživanja tumorogenog potencijala navedenih MEF-ova <i>in vivo</i>. Prevideni broj imunokompromitiranih miševa koji će se koristiti u ovi pokusima iznosi 30. U okviru Cilja 3, dio istraživanja provedenog na p53 ^{-/-} MEF-ovima dobivenih u okviru Cilja 1, bit će nadopunjen korištenjem p53 ^{-/-} miševa i miševa divljeg tipa. Koristit će se ukupno 16 miševa u svrhu uzimanje tkiva jetre za analizu. Dakle, ukupan broj korištenih miševa u cijelom projektu iznosi 196.
U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinjama, vjerojatna očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?	U okviru Cilja 1 križat ćemo pokusne životinje prema unaprijed dizajniranim shemama križanja. Ne očekujemo da će navedena križanja imati negativni učinak na dobrobit miševa. Svi miševi će se genotipizirati 3 tjedna nakon okota standardno korištenom metodom. Prilikom genotipizacije uzet će se vršak repa miša veličine 5 mm što ne bi trebalo izazvati više od blage boli. Nakon genotipizacije, miševi genotipova koji se neće koristiti u daljnim križanjima će se eutanazirati parama CO₂, a usmrćivanje životinja dovršava se primjenom metode cervikalne dislokacije prema <i>Pravilniku o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe</i> (NN 55/13). Preostali miševi koristit će se u daljnim križanjima. U konačnom križanju, trudne ženke na E12.5 danu trudnoće žrtvovat će se metodom cervikalne dislokacije prema <i>Pravilniku o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe</i> (NN 55/13) (krajnja eksperimentalna točka). Ne očekuje se da će trudne ženke prilikom žrtvovanja osjetiti više od blage boli ili tjeskobe. Nakon žrtvovanja trudnih ženki izolirat će se embriji na E12.5 za dobivanje MEF-ova specifičnih genotipova. Obzirom da embrionalni razvoj kod miševa soja C57BL/6J traje 19.5 dana, embriji na E12.5 ne podliježu <i>Pravilniku o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe</i> (NN 55/13) koji uključuje fetalne oblike sisavaca od zadnje trećine njihova uobičajenog razvoja. Tijekom provedbe pokusa u okviru Cilja 1 miševi će se pratiti svakodnevno prema specifičnim pokazateljima navedenima u Tablicama za procjenu općeg stanja miševa. Ne očekujemo da će u okviru ovog cilja biti potrebna primjenjivati humane krajnje točke. U okviru Cilja 2, MEF-ovi proizvedeni u Cilju 1 injicirat će se u imunokompromitirane atimične miševe u svrhu istraživanja tumorogenog potencijala navedenih MEF-ova <i>in vivo</i>. MEF-ovi specifičnih genotipova će se subkutano injicirati na jednom mjestu u području bedrene regije u 4-6 tjedana stare imunokompromitirane atimične miševe. Ne očekuje se da će miševi osjetiti više od prolazne blage nelagode ubodnom igle propisane veličine prilikom injiciranja

	stanica 3-4 tjedna nakon subkutane injekcije odredit će se oblik i veličina tumora te će se tumor uzeti za daljnu analizu. Na eksperimentalnoj krajnjoj točki, pokusni miševi žrtvovat će se primjenom metode cervikalne dislokacije prema <i>Pravilniku o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 55/13)</i>. Miševi korišteni u ovom Cilju mogu osjetiti umjerenu bol. Specifično u Cilju 2, u kasnijim fazama rasta tumora mogu se pojaviti znakovi slabosti, boli i ulceracije. Miševi će se pratiti svakodnevno prema specifičnim pokazateljima navedenima u Tablicama za procjenu općeg stanja miševa, a zapažene promjene unositi u Obrasce za procjenu dobrobiti miševa. Ukoliko primijetimo ulceracije na mjestu rasta tumora, ako je tumor veći od 1,2 cm u promjeru ili ako se pojave teži znakovi slabosti i boli, primjenit će se humana krajnja točka. U okviru Cilja 3, pokusni p53 +/- miševi i miševi divljeg tipa 4 i 8 tjedana nakon okota žrtvovat će se primjenom metode cervikalne dislokacije prema <i>Pravilniku o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 55/13)</i>, kada će se izolirati tkivo jetre za daljnje analize. Ne očekuje se da će miševi prilikom žrtvovanja osjetiti više od blage boli ili tjeskobe. Važno je naglasiti da p53 +/- miševi počinju razvijati tumore nakon 16-24 tjedna života, te će se stoga žrtvovati u dobi od 4 i 8 tjedana kako bi se izbjegao nastanak tumora i pojava boli u miševa. Tijekom provedbe pokusa u okviru Cilja 3 miševi će se pratiti svakodnevno prema specifičnim pokazateljima navedenima u Tablicama za procjenu općeg stanja miševa. Ne očekujemo da će u okviru Cilja 3 biti potrebno primjenjivati humane krajnje točke. U slučaju da ranije primijetimo promjene u njihovu ponašanju (gubitak težine, promjene u disanju, unosu hrane i vode) bit će primjena humana krajnja točka i životinje će se žrtvovati ranije kako bi im se smanjila bol i patnja. Humana krajnja točka provest će se uporabom mehaničke metode dislokacijom vratne kralježnice, sukladno <i>Pravilniku o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 55/13)</i>.
Primjena načela 3R 1. Zamjena Navedite zašto se moraju koristiti životinje te zašto se ne mogu koristiti alternativne metode koje ne uključuju životinje	Istraživanja molekularnih mehanizama putem kojih heterozigotne mutacije specifičnih RP doprinose razvoju zloćudnih tumora te uloge gena p53 u tom procesu nisu provediva u ljudi zbog etičkih i tehničkih ograničenja. Stoga ćemo u ovom projektu koristiti miševe u kojima su geni za RPS6 i p53 obilježeni luxP sljedovima i mogu se izrezati Cre posredovanom rekombinacijom. Takvi modeli najbolje oponašaju bolesti u ljudi uzrokovane heterozigotnošću RP te omogućuju razumijevanje molekularnih mehanizama putem kojih heterozigotnost RP doprinosi razvoju zloćudnih tumora. Križanjem specifičnih pokusnih miševa u Cilju 1 proizvest će se MEF-ovi koji će se koristiti u <i>in vitro</i> analizama. MEF-ovi su izvrstan i često korišteni pokusni stanični model za istraživanje molekularnih mehanizama zloćudne preobrazbe uslijed genetičkih promjena, a njihovo korištenje omogućuje smanjenje broja životinja u pokusima. U okviru Cilja 2, MEF-ovi proizvedeni u Cilju 1 injicirat će se u imunokopromitirane atimične miševe u svrhu istraživanja tumorigenog potencijala navedenih MEF-ova <i>in vivo</i>. Ovaj model standardno se koristi u biomedicinskim istraživanjima i omogućuje istraživanja nekih aspekata tumorigeneze koji se ne mogu analizirati <i>in vitro</i>. U okviru Cilja 3, dio istraživanja na p53 -/- MEF-ovima u okviru Cilja 1 bit će nadopunjen istraživanjima u p53 -/- miševima <i>in vivo</i>.

2. Smanjenje Objasnite kako može biti osigurano korištenje minimalnog broja životinja	Detaljnim planiranjem križanja u Cilju 1 prema prethodno dizajniranim Shemama križanja 1, 2 i 3, broj korištenih miševa sveden je na minimalnu razinu. Prilikom planiranja križanja i procjene broja miševa, u obzir su uzeti očekivani broj miševa po okotu i očekivane proporcije pojedinih genotipova miševa nakon križanja. Zbog složenosti križanja i proporcija pojedinih genotipova miševa koje u pojedinim križanjima iznose 25%, a u nekim čak i manje (Shema križanja 1 i 2), dodatno smanjenje broja korištenih miševa nije moguće. Novorođeni miševi genotipizirani će se tri tjedna nakon okota i svi miševi koji se neće dalje koristiti u križanjima eutanazirati će se parama CO₂, a usmrćivanje životinja dovršava se primjenom metode cervikalne dislokacije prema <i>Pravilniku o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 55/13)</i> kako bi se broj miševa smanjio. Zbog smanjenja broja korištenih životinja, ženke specifičnih genotipova koristit će se dva puta u križanjima potrebnih za dobivanje trudnih ženki u konačnom križanju u svrhu izolacije embrija i proizvodnje MEF-ova (Cilj1). To neće utjecati na njihovu dobrobit, a smanjit će se broj životinja uključenih u križanja. Te ženke će se koristiti isključivo za dobivanje potomstva, a one same ne sudjeluju u pokusu. Ženke specifičnih genotipova neće se koristiti više od dva puta za dobivanje potomstva zbog vremenskog ograničenja trajanja aktivnosti unutar projekta. Na temelju prethodnih istraživanja, statističkih analiza te preciznog dizajna pokusa, u svrhu ostvarenja Ciljeva 2 i 3, broj miševa koji se planira koristiti sveden je na minimalnu razinu, a da se pritom postigne zadovoljavajuća statistička značajnost dobivenih rezultata.
3. Pобољшanje Objasniti izbor vrsta i zašto su korišteni životinjski modeli primjereniji od drugih, uzimajući u obzir znanstvene ciljeve. Objasniti opću mjere koje će se poduzeti kako bi se smanjile štete za životinje	Laboratorijski miš je najbolji model u kojem se specifično obilježeni geni mogu izrezivati putem rekombinaze Cre te se na taj način oponaša gubitak gena u bolestima u ljudi. Miš u kojem se može izrezati gen za RPS6 jedan je od rijetkih dostupnih mišjih modela u kojima se može izrezati gen za određeni RP. Budući da je nam je ovaj model lako dostupan, koristit ćemo ga u ovom projektu. Nadalje, koristit ćemo i dostupni mišji model u kojem se može inaktivirati p53. Navedeni miševi koristit će se u križanjima kako bi se proizveli MEF-ovi na kojima će se provoditi <i>in vitro</i> pokusi. MEF-ovi će se subkulturirati u staničnoj kulturi kako bi se dobila dovoljna količina materijala za daljnja istraživanja. Navedeni stanični model omogućuje zamjenu životinjskih modela staničnim modelom smanjuju broj životinja korištenih u pokusima i poboljšava dobrobit životinja. U svrhu provođenja poboljšanja dobrobiti pokusnih miševa, o njima će se brinuti educirane i stručno osposobljene osobe. Nadalje, provoditi će se sustavno praćenje pokusnih miševa (uključujući i dane vikenda i praznike) za vrijeme trajanja pokusnog perioda prema Ohrascima za procjenu dobrobiti životinja (miševa) kako bi se pravovremeno primijetila amjerena do jaka bol, patnja ili tjeskoba miševa te iste uklonile. Ukoliko se pojave teži znakovi slabosti, boli, tjeskobe i nagli gubitak težine, miševi će biti izuzeti iz pokusa te će se primijeniti humani krajnja točka. Nadalje, miševi će biti smješteni u grupama do 4 miša u kavezu u sustavima s individualnom ventilacijom kaveza (IVC) i pripadajućom opremom za uzgoj laboratorijskih miševa u uvjetima bez prisutnosti patogena (SPF). Prilikom dostizanja eksperimentalne krajnje točke, miševi će biti eutanazirani metodom cervikalne dislokacije prema <i>Pravilniku o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 55/13)</i>.