

OBRAZAC 3

Naslov projekta	Istraživanje uloge optineurina u neuroprotekciji		
Trajanje projekta	01.06.2017. – 31.12.2018.		
Ključne riječi (najviše do 5)	neurodegeneracija, neuroinflamacija, autofagija, prijenos signala, optineurin		
	Svrha projekta (kao u članku 5. Pravilnika)		
	Temeljno istraživanje	da	
	Translacijska i primijenjena istraživanja		ne
	Korištenje određeno propisima i rutinska proizvodnja		ne
	Zaštita prirodnog okoliša u interesu zdravlja ili dobrobiti čovjeka ili životinje		ne
	Očuvanje vrste		ne
	Visoko obrazovanje ili osposobljavanje		ne
	Forenzička ispitivanja		ne
	Održavanje kolonije genetski izmijenjenih životinja koje se ne koriste u drugim postupcima		ne
Opišite ciljeve projekta (na primjer, znanstvene nepoznanice ili znanstvene ili kliničke potrebe)	Mutacije u ubikvitin-vežući proteinu optineurinu su nedavno pronađene u amiotrofičnoj lateralnoj sklerozi (ALS), fatalnoj neurodegenerativnoj bolesti nerazjašnjene patogeneze. Za razliku od većine drugih proteina koji uzrokuju ALS kada uslijed mutacije zadobiju citotoksična svojstva i/ili se ponašaju kao prioni, za optineurin se misli da ima zaštitnu ulogu jer mutacije optineurina nađene u ALS-u dovode do gubitka funkcije tog proteina. <i>In vitro</i> studije su pokazale da optineurin regulira različite stanične procese uključujući prijenos upalnih signala unutar stanice, staničnu smrt, promet vezikula i autofagiju, no direktna uloga optineurina u neurodegeneraciji je nepoznata. Značajno je istaknuti da ALS nije isključivo bolest motornih neurona i da se u ALS-u čak i prije simptoma bolesti očituje pretjerana aktivacija glia stanica (posebice mikroglije) i perifernih makrofaga, te da je neuroinflamacija jedan od najranijih patohistoloških znakova, koji prethodi kliničkim simptomima bolesti. Neuroinflamacija je i glavna odrednica progresije bolesti i smrtnog ishoda. Glavni cilj ovog istraživanja je razjasniti točnu ulogu optineurina u neuroinflamaciji te u direktnoj i/ili indirektnoj neuroprotekciji. Budući da je ALS složena sistemska bolest koja nastaje uslijed oštećenja ne samo neurona nego i uza potpornih stanica, te da su ubikvitin-vežući proteini skloni <i>in vitro</i> artefaktima uslijed nespecifičnog vezivanja, analiza funkcije optineurina u primarnim stanicama i u mišjem modelu je ključna za uspjeh ove studije. Uloga optineurina biti će se ispitana u: (1) primarnim kulturama neurona, mikroglije i makrofaga i mišjih embrionalnih fibroblasta, (2) kulturama organotipičnih rezova ledne moždine, te (3) u mišjem modelu <i>in vivo</i>. Za potrebu ove studije, kreirali smo novi genetski mišji model insuficijencije optineurina (sličan djetli mutacija optineurina u bolesnika s ALS-om).		
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?)	Razumijevanje mehanizama nastanka bolesti te identificiranje neuroprotektorskih faktora nužno je za pokušaje ciljanog liječenja ALS-a. Naime, za ALS ne postoji nikakav ciljani lijek i jedini odobreni lijek za ALS (riluzol) ima tek palijativni učinak i samo neznatno produžuje preživljenje. U cilju razumijevanja patogeneze ALS-a te mogućnosti razvoja ciljane terapije, predlažemo istraživanje		

	ovog specifičnog ALS modela koji se razlikuje od trenutno dostupnih transgeničnih ALS modela u kojima se nastanak ALS-a potiče ekspresijom proteina sklonih agregaciji u motornim neuronima. Optineurin je posebno zanimljiv protein u izučavanju neurodegeneracije jer se misli da ima protektivna svojstva i to ne samo u ALS-u, nego i u nizu drugih neurodegeneracija. Točnim razumijevanjem procesa koje optineurin regulira, omogućit će se pokušaji rane detekcije, prevencije ili isporavanja neurodegeneracije.
Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti	U istraživanju će se koristiti laboratorijski miševi. Približan broj miševa koji se planiraju koristiti u istraživanju je 640.
U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinjama, vjerojatna / očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?	U ovom istraživanju dio životinja biti će žrtvovan cervikalnom dislokacijom u svrhu uzimanja embrija iz trudnih mišica, ili ugljičnim dioksidom ili cervikalnom dislokacijom radi uzimanja organa i tkiva iz odraslih ili neonatalnih miševa (mozak, ledna moždina, koštana srž), radi pripreme staničnih kultura za <i>in vitro</i> stimulaciju. Za <i>in vivo</i> pokuse regeneracije bedrenog živca i fiksacije mozga i ledne moždine za IHC i IF analizu, životinje će prethodno biti podvrgnute potpunoj anesteziji, te analgeziji u tijeku postoperativnog oporavka od operacije nagnjeđenja bedrenog živca. Zbog korištenja anestezije i analgezije u skladu sa pravilima veterinarske stuke, životinje neće trpjeti bol. Moguća je prolazna blaga nelagoda neposredno nakon injekcije, pa ćemo posebno pratiti te životinje. Očekivana razina težine postupka je blaga za sve postupke osim operacije nagnjeđenja bedrenog živca, te akutne upale. Za potonje je razina težine postupka umjereno teška, no radi se o prolaznom stresu tijekom kojeg će životinje biti pod regularnim nadzorom i u slučaju pogoršanja njihovog zdravstvenog stanja ili ispoljavanja znakova patnje, bit će promptno eutanazirane. Nakon završenih mjerenja u <i>in vivo</i> pokusima, životinje će biti žrtvovane radi kolekcije organa ili fiksirane dok su u potpunoj anesteziji, kao što je navedeno gore.
Primjena načela 3R	
1. Zamjena Navedite zašto se moraju koristiti životinje te zašto se ne mogu koristiti alternativne metode koje ne uključuju životinje	Koristiti ćemo životinjski model zato što ne postoji alternativna metoda za istraživanje kompleksne sistemske neurodegeneracije poput ALS-a, te zato što su ubikvitin-vežući proteini poput optineurina pokazali artefakte u pokusima <i>in vitro</i>. Dostupni modeli staničnih linija nikako ne mogu adekvatno zamijeniti primarne stanice razvijene iz laboratorijskih životinja i modele <i>in vivo</i>. Kako je svrha projekta ispitati molekularne mehanizme koji utječu na ispad funkcije niza stanica koje mogu direktno ili indirektno pridonijeti neurodegeneraciji, u pokusima ćemo koristiti ujedane protokole za dobivanje tih stanica u svrhu njihove kulture i ko-kulture. Da bismo povezali <i>in vitro</i> rezultate s procesima <i>in vivo</i>, odabran broj stimulacija za koje očekujemo da će pogoršati neurodegeneraciju, ćemo napraviti i <i>in vivo</i>. Niti jedan od tih pokusa u potpunosti ne može se replicirati <i>in vitro</i> u staničnim modelima jer se radi o složenim procesima u kojima surađuje veliki broj različitih vrsta stanica.
2. Smanjenje Objasnite kako može biti osigurano korištenje minimalnog broja životinja	U pokusima će se koristiti najmanji mogući broj životinja potreban za dobivanje statistički relevantnih podataka, te ćemo organizirati pokuse na način da je informacija dobivena iz svakog miša maksimalna. Kako bi REDUCIRALI broj miševa, pokuse smo osmislili tako da dobijemo što više informacija iz

	svakog miša. Npr. mjerenja motoričkih i kognitivnih sposobnosti radit ćemo na istim miševima i promatrati istu kohortu životinja u više vremenskih točaka, te u svakoj od tih životinja analizirati frontalni i motorni korteks, te leđnu moždinu. Koristit ćemo stanice koje možemo dobiti u velikom broju i/ili se mogu propagirati <i>in vitro</i> do 5 pasaža (MEF i BMDM). Na stanicama i tkivima ćemo raditi paralelnu analizu miRNA i proteina iz istog uzorka. Naposljetku, za umanjenje broja životinja u pokusima analize neurodegeneracije <i>in vivo</i>, radit ćemo pokuse pripreme organotipičnih kultura leđne moždine jer nam to omogućuje da na jednom mišu ispitamo i do desetak različitih stimulusa <i>in vitro</i>.
3. Poboľjšanje 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.	Primarne stanične kulture dobivene iz tkiva životinja imaju svojstva koja nije moguće reproducirati korištenjem staničnih linija. Miševi su često korišteni i dobro karakteriziran model za izučavanje ALS-a. Zbog etičkih razloga, slična istraživanja na humanoј populaciji su nemoguća i vrlo ograničene informacije se mogu dobiti iz diferenciranih pluripotentnih stanica, bar zasada jer je četverodimenzionalni nastanak neurodegeneracije nemoguće simulirati <i>in vitro</i>. U planiranom istraživanju očekivana razina težine postupaka je blaga za većinu pokusa, a umjereno teška za manji dio (nagnjećenje bedrenog živca i akutnu upalu). U potpunosti se radi se o prolaznoj nelagodnosti. Životinjama će tijekom pokusa biti praćeni znakovi nelagode ili stresa te će u slučaju istih životinje biti žrtvovane na human način. Općenito, očekuje se da će životinje osjetiti samo blagu i/ili prolaznu nelagodu, a bit će redovito praćene i humano žrtvovane ako prerastu tu razinu.

