

OBRAZAC 3

Naslov projekta	Deciphering DNA-Protein Crosslink Repair <i>in vivo</i> using zebrafish model (DNAPRO)		
Trajanje projekta	5 god (60 mjeseci)		
Ključne riječi (najviše do 5)	Zebrafish, DNA repair, DNA-protein crosslinks, DNA-Protein Crosslink Repair		
	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).	Otkriće SPRTN proteaze na <i>in vitro</i> modelima označilo je početak dubinskog razumijevanja mehanizma popravka oštećenja DNA nastalih vezanjem proteina na DNA (DNA-protein crosslinks; DPC). Istraživanja u ovom projektu bit će usmjerena na razumijevanje mehanizma popravka DPC <i>in vivo</i> , putem istraživanja uloge ključnih proteina (SPRTN, ACRC, Mre11, TDP1, TDP2, p97) koji reguliraju DPC popravak u <i>in vivo</i> uvjetima, korištenjem ribe zebre (<i>Danio rerio</i>) kao modelnog organizma. Važan dio projekta bit će i razvoj protokola i metodoloških pretpostavki za kvantifikaciju DPC oštećenja <i>in vivo</i> te monitoring aktivnosti DPCR mehanizma kao potencijalnog novog biomarkera izloženosti okolišnim zagadivačima.		
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).	Novo znanje o mehanizmu popravka oštećenja nastalih vezanjem proteina na DNA (DPC) u <i>in vivo</i> uvjetima od temeljne je važnosti za razumijevanje mehanizma popravka DNA kao ključne biološke molekule. Stečeno znanje može imati izravnu i neizravnu primjenu u biomedicinskim istraživanjima u najširem smislu, kao i u farmaceutskim istraživanjima, a razvoj metoda za kvantifikaciju DNA oštećenja kao novog biomarkera potencijalno može naći kliničku primjenu, kao i primjenu u regulativi korištenja i procjeni utjecaja pojedinih okolišnih tvari koje mogu uzrokovati ovakva oštećenja.		
Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.	Riba vrste zebra (<i>Danio rerio</i>), 380 odraslih jedinki.		
U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinjama, vjerojatna / očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?	Očekivani negativni učinci uslijed izlaganja embrija i/ili odraslih jedinki (divljih jedinki i genskih <i>knock-outa</i>) modelnim toksičnim tvarima kreću se od mogućih razvojnih malformacija, fenotipskih promjena i promjena u ponašanju, sve do letalnih učinaka.		
Primjena načela 3R			
1. Zamjena Navedite zašto se moraju koristiti životinje te zašto se ne mogu koristiti	Intenzivno korištenje <i>in vitro</i> metoda predviđeno je projektom. Finalna verifikacija uloge istraživanih proteina predviđena je u drugom dijelu projekta i nije ju moguće obaviti bez pokusa na		

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

alternativne metode koje ne uključuju životinje.	životinjama, što uključuje <i>in vivo</i> istraživanja/pokuse na genskim <i>knock-outima</i> i kontrolnim (divljim) jedinkama. Pri tome je sam smisao projekta korištenje zebrice kao suvremenog i sve intenzivnije korištenog kralješničkog modela umjesto tradicionalnih istraživanja na glodavcima.
2. Smanjenje Objasnite kako može biti osigurano korištenje minimalnog broja životinja.	Broj životinja koje će se koristiti u istraživanju minimizirat će se maksimalnom eksploatacijom rezultata <i>in vitro</i> istraživanja, te stupnjevitima optimiziranjem dizajna pokusa koji će uključivati minimalne koncentracije modelnih tvari, minimalan broj jedinki po pokusnoj skupini, te u konačni minimalno ponavljanje pokusa u svrhu konačne verifikacije učinka.
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.	Zebrica (<i>Danio rerio</i>) je jedinsteni model među kralješnjacima koji dozvoljava učinkovito istraživanje promjena fenotipa u odgovoru na genske promjene. Brojne prednosti (mala veličina, brojno potomstvo, krako generacijsko vrijeme, optička prozirnost embrija, mogućnost brzih genetičkih i kemijskih pretraživanja) omogućavaju primjenu zebrice u praćenju i modeliranju ponašanja stanice pri razvoju, odnosno formiranju organa kralješnjaka, na način koji ne dozvoljava niti jedan drugi istraživački model kralješnjaka. Raspoloživost tisuća različitih genskih mutanti i transgenih linija je također vitalni resurs koji je na raspolaganju istraživačima, a brojni protokoli za molekularno biološke metode, toksikološka pretraživanja na širokoj skali, kao i tehnike funkcionalne genomike razvijene su upravo za korištenje zebrice kao istraživačkog modela. S obzirom na ciljano istraživanje transportnih proteina, osim opisanih detaljnih <i>in vitro</i> istraživanja funkcionalna važnost odabranih proteina nužno treba biti verificirana <i>in vivo</i> , pri čemu je demonstriranje funkcije u genskim <i>knock-outima</i> , tipično miševima, tradiciolani „zlatni standard“ u području. Međutim, jasno je da niz karakteristika biologije glodavaca, pa tako i miševa, onemogućava njihovo široko korištenje u opsežnim genetičkim pretraživanjima. Nadalje, za ovaj projekt važno je napomenuti da EU direktiva 2010_63 izričito uključuje frazu " <i>independently feeding larval forms</i> " kao ključni kriterij pri odlučivanju kada se pokusi sa slobodno živućim embrijima i ličinkama moraju klasificirati kao pokusi sa životinjama. Kao što je to preporučeno od strane <i>European zebrafish community</i> (više od 330 neovisnih istraživačkih grupa u 30 zemalja), prema tom kriteriju samo zebrice nakon 120 h poslije fertilizacije trebaju biti predmet regulacije u okviru <i>European animal protection guidelines</i> . Stoga je zebrica istraživački model u potpunosti sukladan s deklariranim 3R principima.