

OBRAZAC 3

Naslov projekta	Kontrola neurodegeneracije moduliranjem sprege između upale i proteinopatije		
Trajanje projekta	1. siječnja 2019.-30. prosinca 2023.		
Ključne riječi (najviše do 5)	neurodegeneracija, neuroinflamacija, autofagija, prijenos signala, optineurin		
Opišite ciljeve projekta (<i>na primjer, znanstvene nepoznanice ili znanstvene ili kliničke potrebe</i>).	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
Mutacije u ubikvitin-vežućem adaptorskom proteinu optineurinu su nedavno pronađene u amiotrofičnoj lateralnoj sklerozi (ALS) i frontotemporalnoj demenciji (FTD), fatalnim neurodegenerativnim bolestima još nerazjašnjene patogeneze. U ALS-u odumiru motorni neuroni u mozgu, moždanom deblu i leđnoj moždini, što rezultira progresivnom paralizom i smrću najčešće unutar 3-5 godina nakon postavljanja dijagnoze. Uz motorne neurone u 50% bolesnika oštećeni su i neuroni u frontalnom i temporalnom dijelu kore mozga što rezultira kognitivnim smetnjama i u najgorem slučaju teškom demencijom, te se stoga smatra da su ALS i FTD dva različita očitovanja istog patofiziološkog procesa. <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 procesu neurodegeneracije je nepoznata. Dva najznačajnija obilježja ALS-a i FTD-a su proteinopatija tj. nemogućnost pravilne razgradnje proteina koja dovodi do njihove agregacije, te pretjerana aktivacija gljiva stanica (posebice mikroglije) i perifernih makrofaga. Zanimljivo je da bez obzira na heterogenost genetske podloge u >95% ALS pacijenata dolazi do agregacije TDP-43, DNA/RNA vezujućeg proteina važnog za metabolizam RNA. Aktivacija gljiva stanica tj. neuroinflamacija je jedno od najranijih patohistoloških obilježja bolesti, a prethodi kliničkim simptomima ispada funkcije motornih neurona. Neuroinflamacija je ujedno i jedna od glavnih odrednica progresije bolesti i smrtnog ishoda. U cilju istraživanja uloge optineurina u neuroinflamaciji i neurodegeneraciji, koristit ćemo mišje modele u kojima je optineurin nedostaje (Optn^{-/-}) ili mu je ubikvitin-vezujuća regija izrezana (Optn^{Δ701}), time oponašajući mutacije optineurina nađene u pacijenata s ALS-om. U tijeku naše inicijalne karakterizacije Optn^{Δ701} modela pronašli smo da nedostatak funkcionalnog optineurina sprječava optimalnu aktivaciju TBK1 i produkciju interferona beta (IFN-β) u mikrogliji i makrofagima, dovodeći do narušene ravnoteže proupalnih i protuupalnih faktora. Glavni cilj ovog istraživanja će biti			

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

	analiza IFN- β puta i pojašnjenje sprege između neuroinflamacije i TDP-43 proteinopatije. S obzirom da IFN- β djeluje istovremeno i imunosupresivno i imunostimulativno, važno je razmotriti dva potencijalna mehanizma neuroprotektivnog djelovanja optineurina: direktnu supresiju neurotoksičnih proupalnih faktora ili poboljšanje imunog odgovora odnosno protektivne upalne reakcije. Razumijevanje mehanizama nastanka ALS-a i FTD-a te identificiranje neuroprotektivnih faktora nužno je za pokušaj ciljanog liječenja te bolesti.
Koje su potencijalne prednosti za koje je vjerojatno da proizlaze iz ovog projekta (<i>kako znanost može biti unaprijeđena ili kako ljudi ili životinje mogu imati koristi od projekta</i>).	Razumijevanje mehanizama nastanka bolesti te identificiranje neuroprotektivnih 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 i FTD-a te mogućnosti razvoja ciljane terapije, predlažemo istraživanje novih ALS/FTD modela. 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 usporavanja 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 441.
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 žrtvovan cervikalnom dislokacijom u svrhu uzimanja embrija iz trudnih mišica, ili postepenom aplikacijom ugljičnog dioksida 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. U dijelu pokusa će se koristiti anestezija i analgezija u skladu s pravilima veterinarske struke te 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 za pokuse križanja Optn ^{470T} miševa s TDP-43 ^{G348C} miševima za koje ne znamo ishod. Optn ^{470T} miševa i TDP-43 ^{G348C} imaju vrlo blage neurološke poremećaje, ali je moguće da će se njihovim križanjem razviti neurološki poremećaji. Stoga je za potonji soj moguće da će razina težine postupka biti umjereno teška. U svakom slučaju miševi će biti pod regularnim nadzorom i u ukoliko se uoči bilo koja od točaka koja zahtijeva humanu eutanaziju, poput nemogućnosti nesmetanog kretanja, nemogućnosti da se ispravi unutar 20 sekundi nakon polijeganja na stranu (engl. righting reflex test), nemogućnosti normalnog hranjenja, oslabljenog reagiranja na podražaje ili značajnog gubitka na težini, miševi će biti humano usmrćeni. 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.	Koristit ćemo životinjski model zato što ne postoji alternativna metoda za istraživanje kompleksne sistemske neurodegeneracije poput ALS-a i FTD-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 uhodane 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, kognitivnih i bihevioralnih 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 (mišji embrionalni fibroblasti i makrofagi diferencirani iz prekursora iz koštane srži). Na stanicama i tkivima ćemo raditi paralelnu analizu mRNA 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. 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.	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 humanoj populaciji su nemoguća i vrlo ograničene informacije se mogu dobiti iz diferenciranih pluripotentnih stanica. Dakle bar zasada jer je složen nastanak neurodegeneracije nemoguće simulirati <i>in vitro</i>. U planiranom istraživanju očekivana razina težine postupaka je blaga za većinu pokusa, a potencijalno umjereno teška za manji dio (soj Optn^{470T} x TDP-43^{G348C}). 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.

