

OBRAZAC 3

|                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                     |                                     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Naslov projekta                                                                                             | Razumijevanje (eko)toksikološke uloge odabranih SLC i MATE transportnih proteina zebrice ( <i>Danio rerio</i> ) korištenjem metoda funkcionalne genomike – DANIOTRANS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                     |                                     |
| Trajanje projekta                                                                                           | 4 god. (48 mjeseci)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                     |                                     |
| Ključne riječi (najviše do 5)                                                                               | zebrica, polispecifični membranski prijenosnici, CRISPR/Cas9, (eko)toksikološka evaluacija                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                     |                                     |
|                                                                                                             | Svrha projekta (kao u članku 5. Pravilnika):                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                     |                                     |
|                                                                                                             | Temeljno istraživanje                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | <input checked="" type="radio"/> da | <input type="radio"/> ne            |
|                                                                                                             | Translacijska i primijenjena istraživanja                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | <input type="radio"/> da            | <input checked="" type="radio"/> ne |
|                                                                                                             | Korištenje određeno propisima i rutinska proizvodnja                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | <input type="radio"/> da            | <input checked="" type="radio"/> ne |
|                                                                                                             | Zaštita prirodnog okoliša u interesu zdravlja ili dobrobiti čovjeka ili životinje                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | <input type="radio"/> da            | <input checked="" type="radio"/> ne |
|                                                                                                             | Očuvanje vrste                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | <input type="radio"/> da            | <input checked="" type="radio"/> ne |
|                                                                                                             | Visoko obrazovanje ili osposobljavanje                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | <input type="radio"/> da            | <input checked="" type="radio"/> ne |
|                                                                                                             | Forenzička ispitivanja                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | <input type="radio"/> da            | <input checked="" type="radio"/> ne |
|                                                                                                             | Održavanje kolonije genetski izmijenjenih životinja koje se ne koriste u drugim postupcima                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | <input checked="" type="radio"/> da | <input type="radio"/> ne            |
| Opišite ciljeve projekta ( <i>na primjer, znanstvene nepoznanice ili znanstvene ili kliničke potrebe</i> ). | <p>Polispecifični membranski transportni proteini posreduju pri unosu i izbacivanju ishodišnih tvari i njihovih metabolita iz stanica viših kralješnjaka. Stoga predstavljaju integralni dio kompleksne stanične obrane i kritično utječu na bioraspoloživost i potencijalnu toksičnost endo- i ksenobiotika, uključujući okolišna zagađivača. Međutim, unatoč značajnom napretku posljednjih godina, razumijevanje fiziološke i/ili obrambene uloge specifičnih membranskih prijenosnika u vodenim organizama velikim je dijelom ograničeno. Nekoliko je ključnih razloga za to. Prvo, najveći dio relevantnih istraživanja proveden je koristeći različite vrste morskih i slatkovodnih beskralješnjaka i kralješnjaka, bez fokusa na dobro definirane modelne vrste. Drugo, značajan dio dokaza o identifikaciji i ekspresiji prijenosnika pribavljen je samo na razini genskog transkripta, zbog neraspoloživosti specifičnih antitijela. Treće, određivanja transportne aktivnosti in vitro načinjena su koristeći relativno nespecifične kombinacije modelnih supstrata i inhibitora. Konačno, usporediva in vitro istraživanja, iako karakterizirana prijeko potrebnom specifičnošću i osjetljivošću, nisu mogla po definiciji ponuditi uvjerljive dokaze o ulozi specifičnih prijenosnika in vivo, ili relevantnosti njihove inhibicije okolišnim zagađivačima u stvarnim okolišnim uvjetima.</p> <p>S obzirom na opisane nedostatke, te na temelju nedavnih detaljnih in vitro istraživanja naše grupe na SLC uptake i MATE prijenosnicima, u ovom istraživačkom projektu namjeravamo značajno unaprijediti naše razumijevanje (eko)toksikološke uloge odabranih SLC i MATE transportnih proteina koristeći metode funkcionalne genomike zebrice za in vivo istraživanja. Pri tome ćemo se najvećim dijelom fokusirati na određivanje potencijalne fiziološke i/ili obrambene ulogu odabranih prijenosnika zebrice koristeći CRISPR/Cas9 metode editiranja genoma zebrice koje su u potpunosti na raspolaganju u našem laboratoriju.</p> |                                     |                                     |

|                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Koje su potencijalne prednosti za koje je vjerojatno da proizlaze iz ovog projekta (<i>kako znanost može biti unaprjeđena ili kako ljudi ili životinje mogu imati koristi od projekta</i>).</p>                                                     | <p>Naša hipoteza je da će zebrice deficijentne s obzirom na prisustvo i ekspresiju membranskih prijenosnika od potencijalne (eko)toksikološke važnosti: (a) pokazati detektabilne promjene fenotipa tijekom embrionalnog razvoja i/ili u kasnijim razvojnim stadijima, kao posljedice promjene u transportu fiziološki važnih supstrata predmetnih prijenosnika; ili (b) se značajno razlikovati u osjetljivosti na modelne toksične spojeve u usporedbi s divljim (wild type - WT) zebricama. Stoga ćemo, koristeći se kombinacijom in vitro saznanja i rezultata in vivo studija s genetski deficijentnim zebricama za istraživanje prijenosnike koje ćemo kreirati tijekom projekta, osigurati nove uvide kritične za razumijevanje njihove (eko)toksikološke relevantnosti.</p> <p>Nadalje, pored značajnih sličnosti, raspoloživi podaci jasno ukazuju i na razlike između sisavaca i zebrice u pogledu identiteta relevantnih membranskih prijenosnika, razine njihove ekspresije, supstratnih preferencija i osjetljivosti na inhibitore. Prema tome, u ovom projektu pribavit ćemo temeljna saznanja važna za bolje razumijevanje uloge odabranih SLC prijenosnika te relevantnu interpretaciju pokusnih podataka dobivenih korištenjem zebrice kako važnog istraživačkog modela kralješnjaka.</p> |
| <p>Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.</p>                                                                                                                                                                            | <p>Riba vrste zebrica (<i>Danio rerio</i>), 360 odraslih jedinki.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <p>U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinjama, vjerojatna / očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?</p>                                                                             | <p>Mogući negativni učinci kod genetski deficijentnih (<i>knock-out</i> ili <i>knock-in</i>) životinja kreću se od mogućih fenotipskih promjena u ponašanju do razvojnih malformacija. Očekivani negativni učinci bit će blagi do umjereni, vrlo rijetko iznimno teški ovisno o uočenim promjenama fenotipa.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| <p><b>Primjena načela 3R</b></p>                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| <p><b>1. Zamjena</b><br/>Navedite zašto se moraju koristiti životinje te zašto se ne mogu koristiti alternativne metode koje ne uključuju životinje.</p>                                                                                               | <p>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 životinjama, što uključuje <i>in vivo</i> istraživanja/pokuse na genetski deficijentnim 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.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| <p><b>2. Smanjenje</b><br/>Objasnite kako može biti osigurano korištenje minimalnog broja životinja.</p>                                                                                                                                               | <p>Broj životinja koje će se koristiti u istraživanju minimizirat će se maksimalnom eksploatacijom rezultata <i>in vitro</i> istraživanja, te optimiziranjem dizajna pokusa koji će uključivati minimalan broj jedinki po pokusnoj skupini, te u konačnici minimalno ponavljanje pokusa u svrhu konačne verifikacije učinka.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| <p><b>3. Poboljšanje</b><br/>Objasniti izbor vrsta i zašto su korišteni životinjski modeli primjereniji od drugih, uzimajući u obzir znanstvene ciljeve.<br/><br/>Objasniti opće mjere koje će se poduzeti kako bi se smanjile štete za životinje.</p> | <p>Zebrica (<i>Danio rerio</i>) je jedinstveni 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</p>                                                                                                                                                                                                     |

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | <p>čemu je demonstriranje funkcije u genskim <i>knock-outima</i>, tipično miševima, tradicionalni „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.</p> |
|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

