

Datum ontvangst DEC: 8-3-2005

DEC nr: 1853

DIEREXPERIMENTENCOMMISSIE TNO**AANMELDINGSFORMULIER VOOR EEN NIEUW ONDERZOEKSPLAN**

Dit formulier dient uiterlijk **7 werkdagen** voor de DEC vergadering (zie TNO Bulletin Dierproeven en Alternatieven of Intranet) volledig ingevuld in het bezit te zijn van:

Secretariaat DEC

[Redacted]

[Redacted]

E-mail: [Redacted]

telefoon: [Redacted]

/ fax: [Redacted]

Instituut:

ALGEMEEN**1. Titel van het onderzoeksplan:**

Het effect van gemannosyleerd peptide op antigeen presenterende cellen

2. Verantwoordelijk onderzoeker (ex art. 9 WOD): [Redacted]

E-mail adres onderzoeker: [Redacted]

Telefonisch bereikbaar tijdens DEC-vergadering onder nr: [Redacted]

Medewerkers (ex art. 9 WOD/ ex art. 12 WOD): [Redacted]

2. Geplande aanvangsdatum onderzoeksplan: 1-4-2005

(Opmerking: definitieve aanvangsdatum z.s.m. doorgeven aan de proefdierdeskundige o.v.v. DEC nr., via e-mail: [Redacted])

Geplande duur van de onderzoeksplan: 2 jaar

Locatie waar dieren worden gehouden: TNO [Redacted]

4. Codenummers volgens KvW-registratie m.i.v. 1998:

Groep	< kolommen >												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1 t/m 7	1	1	1	155	33	1	1	1	1	2	2	3	1
8-9	1	1	1	40	33	1	1	1	1	2	2	1	1
10-15	1	1	1	104	33	1	1	1	1	2	2	3	1

RELEVANTIE

5. Welke concrete vraag/vragen wilt u met deze dierproef beantwoorden:

- a) Welke type APC zijn betrokken bij de herkenning van gemannosyleerd peptide?
- b) Wat is het effect van opname van gemannosyleerd peptide op het fenotype van antigeen presenterende cellen?
- c) Hoe wordt de capaciteit van antigeen presenterende cellen om T cellen te activeren beïnvloed door opname van gemannosyleerd peptide?

ad. a) Immunisatie met gemannosyleerd peptide in adjuvant leidt tot een veranderde T celrespons, waardoor bijvoorbeeld geen klinische symptomen ontstaan in een ziekte model voor MS (EAE). De mannoses die aan het peptide zijn gekoppeld, worden herkend door een specifieke familie van suikereceptoren, zogenaamde C type lectins. Er zijn in de muis verschillende types antigeen presenterende cellen (dendritische cellen, macrofagen), die C type lectins tot expressie brengen op hun celoppervlak. Welke types APC worden getarget door immunisatie met gemannosyleerd peptides is vooralsnog onduidelijk.

Muizen zullen worden geïmmuniseerd met fluorescent gemannosyleerd peptide in adjuvant en op verschillende tijdstippen worden opgeofferd. Dankzij het fluorescente label zal het mogelijk zijn om de cellen, die het peptide opnemen, terug te vinden.

ad b) In een activerende omgeving kunnen APC hun 'rustend' fenotype omzetten in een 'geactiveerd' fenotype. Door immunisatie in adjuvant zullen APC een meer geactiveerde status aannemen. Het effect van C type lectine targeting op deze transformatie is onbekend.

Muizen zullen worden geïmmuniseerd met gemannosyleerd peptide en op verschillende tijdstippen worden opgeofferd. Na isolatie van verschillende lymfoïde organen zullen de daarin aanwezige APC worden gekarakteriseerd.

ad c) Communicatie tussen APC en T cellen is noodzakelijk voor het ontstaan van een functionele T celrespons. Immunisatie met gemannosyleerd peptide leidt tot afwezigheid van zo'n functionele T celrespons, dus blijkbaar is de APC-T cel-communicatie veranderd. Om dit proces nader te bestuderen, zullen APC worden geïsoleerd uit dieren die zijn geïmmuniseerd met gemannosyleerd peptide. Antigeen specifieke T cellen zullen worden geïsoleerd uit dieren geïmmuniseerd met hun antigeen in adjuvant. *In vitro* co-cultures van APC en T cellen zal inzicht geven in de activerende capaciteit van APC na C type lectin targeting *in vivo*.

Omschrijf het maatschappelijk en wetenschappelijk belang van dit onderzoeksplan:

6.a Maatschappelijk belang (meer dan één onderdeel kan van toepassing zijn):

MS is een aandoening van het centraal zenuwstelsel welke het gevolg is van een auto-immuunreactie gericht tegen determinanten van verschillende myeline-eiwitten. MS is een ernstige verlammingenziekte die zich in de regel op jong volwassen leeftijd openbaart. De aandoening komt met name in de Westerse landen voor en heeft daar een prevalentie van 0.1%. MS is een sterk invaliderende ziekte met een langdurig chronisch karakter. Los van het belang voor de individuele patiënt en de kosten die de ziekte met zich meebrengt voor de gezondheidszorg legt deze ziekte een zware last op personen in de directe omgeving. Derhalve is de ontwikkeling van nieuwe therapieën zeer gewenst.

6.a.1 Gezondheid mens/dier

6.a.2 Economisch belang

6.a.3 Milieu belang

6.a.4 Maatschappelijk belang, anders dan 6.a.1-3

6.b Wetenschappelijk belang:

In eerdere experimenten is aangetoond dat immunisatie van SJL muizen met een gemannosyleerde vorm van het ziekte verwekkende peptide PLP₁₃₉₋₁₅₁ niet leidt tot klinische symptomen. Deze dieren blijken een verminderde T celrespons te ontwikkelen, waardoor ze geen DTH repons geven in de periferie en ook geen ontsteking in het centrale zenuwstelsel.

Verder onderzoek naar de effecten op T cellen vindt deels plaats in een OTII/OVA systeem en deels in SJL muizen (zie DEC 1736). Voor het ontstaan van een T celrespons is intensief contact tussen antigeen presenterende cellen en antigeen specifieke T cellen noodzakelijk. De signalering van APC naar T cellen wordt beïnvloed door targeting van C type lectins, die aanwezig zijn op de APC. Inzicht in veranderingen op het niveau van de APC en daardoor veranderde communicatie met T cellen is van belang om het onderliggende mechanisme in het EAE model te ontrafelen.

7. Is of wordt de wetenschappelijke kwaliteit van dit onderzoeksplan of het totale onderzoeksproject beoordeeld?

Zo ja, door welk daartoe aangewezen college, in welke context en met welk resultaat?

Positief advies

PROEFOPZET

8. Wat is de aard van deze dierproef (meer dan 1 rondje kan van toepassing zijn):

- nieuw nog niet eerder uitgevoerd onderzoeksplan
- ☐ herhaling van reeds eerder aan DEC voorgelegd en uitgevoerd onderzoeksplan , DEC-advies nr.:
- ☐ proef op grond van wettelijke eisen, hierna te specificeren:
wettelijke eis:
testrichtlijn:
☐ proef waarbij biotechnologische handelingen worden verricht zoals bedoeld in Art. 66 van de Gezondheids- en welzijnswet voor dieren
☐ anders, n.l.:

9. Aan welke behandelingen worden de dieren onderworpen?

Omschrijf zodanig dat dit op het niveau van het individuele dier duidelijk wordt, met inbegrip van het tijdschema en de frequentie waarmee behandelingen worden uitgevoerd. Beschrijf daarbij alle experimentele technieken waaraan de dieren worden onderworpen, met inbegrip van ingrepen, doseringstechnieken, euthanasietechnieken, enz.

Verwijs, voorzover van toepassing, naar standaardprotocol voor de nadere uitwerking.

I. Tracing fluorescent peptide

- Subcutane immunisatie (4 x 50 µl) van SJL muizen met (gemannosyleerd) PLP₁₃₉₋₁₅₁ in compleet Freund's adjuvant
- Controledieren worden geïmmuniseerd met PBS in adjuvant (4 x 50 µl).
- Opofferen van deze dieren na 6 uur, 12 uur, 24, 48 en 72 uur (gevolgd door ex vivo analyse)

II. Fenotypering APC

- Subcutane immunisatie (4 x 50 µl) van SJL/C57Bl6 muizen met (gemannosyleerd) PLP₁₃₉₋₁₅₁ / OVA₃₇₁₋₃₈₆ in compleet Freund's adjuvant
- Opofferen van deze dieren na 1 dag, 2 dagen, 4 dagen of 7 dagen (gevolgd door ex vivo analyse)
- Controledieren worden direct opgeofferd zonder behandeling.

III. Co-cultures

- Subcutane immunisatie van SJL/C57Bl6 muizen PLP₁₃₉₋₁₅₁ / OVA₃₇₁₋₃₈₆ in compleet Freund's adjuvant (4 x 50 µl). Opofferen na 10 dagen voor het verkrijgen van antigeen specifieke T cellen
- Subcutane immunisatie van SJL/C57Bl6 muizen met (gemannosyleerd) PLP₁₃₉₋₁₅₁ / OVA₃₇₁₋₃₈₆ in compleet Freund's adjuvant (4 x 50 µl). Opofferen na 1 dag, 2 dagen, 4 dagen of 7 dagen voor isolatie van APC.

10. Beschrijf de proefopzet en geef het proefschema bij voorkeur volgens onderstaand voorbeeld:

GROEP	BEHANDELING	BIOTECHNISCHE HANDELING(EN)	AANTAL	SEXE
Deel I				
1	50 µg FITC-PLP ₁₃₉₋₁₅₁ in CFA s.c. (200 µl)	Injecties s.c. Opofferen 6,12,24,48 of 72 uur	25	F SJL
2	50 µg FITC-mPLP ₁₃₉₋₁₅₁ in CFA s.c. (200 µl)	Idem	25	F SJL
3	PBS/CFA s.c. (200 µl)	Idem	25	F SJL
Deel II				
4	50 µg PLP ₁₃₉₋₁₅₁ in CFA s.c.	Injecties s.c. Opofferen 1,2,4, of 7 dagen	20	F SJL
5	50 µg mPLP ₁₃₉₋₁₅₁ in CFA s.c.	Idem	20	F SJL
6	100 µg OVA ₃₇₁₋₃₈₆ s.c.	Idem	20	F C57BL6
7	100 µg mOVA ₃₇₁₋₃₈₆ s.c.	Idem	20	F C57BL6
8	Geen behandeling	Direct opofferen	20	F SJL
9	Geen behandeling	Direct opofferen	20	F C57BL6
Deel III				
10	50 µg PLP ₁₃₉₋₁₅₁ in CFA s.c.	Injecties s.c. Opofferen na 10 dagen voor T cel isolatie	12	F SJL
11	100 µg mOVA ₃₇₁₋₃₈₆ s.c.	Injecties s.c. Opofferen na 10 dagen voor T cel isolatie	12	F C57BL6
12	50 µg PLP ₁₃₉₋₁₅₁ in CFA s.c.	Injecties s.c. Opofferen 1,2,4, of 7 dagen	20	F SJL
13	50 µg mPLP ₁₃₉₋₁₅₁ in CFA s.c.	Injecties s.c. Opofferen 1,2,4, of 7 dagen	20	F SJL
14	100 µg OVA ₃₇₁₋₃₈₆ s.c.	Injecties s.c. Opofferen 1,2,4, of 7 dagen	20	F C57BL6
15	100 µg mOVA ₃₇₁₋₃₈₆ s.c.	Injecties s.c. Opofferen 1,2,4, of 7 dagen	20	F C57BL6

Hoeveel dieren zullen in totaal worden gebruikt? Onderbouw dit aantal op basis van statistische parameters, literatuurgegevens of verwijs, indien van toepassing, naar proefopzet/standaard protocol:

Het percentage APC in het lymfoïde systeem van een muis is ongeveer 1% voor dendritische cellen en 10% voor macrofagen. Voor de isolatie van voldoende APC zijn 5 dieren per tijdstip nodig.

Het aantal bruikbare T cellen in het lymfoïde systeem van geïmmuniseerde muizen is 20-30%. Voor de isolatie van voldoende antigeen specifieke T cellen zijn 3 dieren nodig.

In het geval van groep 1-3 is dat dus 5 tijdstippen x 5 dieren = 25 dieren per behandelingsgroep.

In het geval van groep 4-9 is dat dus 4 tijdstippen x 5 dieren = 20 dieren per behandelingsgroep.

In het geval van groep 12-15 is dat dus 4 tijdstippen x 5 dieren = 20 dieren per behandelingsgroep.

In het geval van groep 10&11 is dat dus 4 tijdstippen x 3 dieren = 12 dieren om T cellen te isoleren.

Totaal: 299 dieren

PROEFDIEREN, HUISVESTING EN VERZORGING

12. Welke diersoort, en welke ras/stam wordt gebruikt? Licht de gemaakte keuze toe:

Welke sexe wordt gebruikt? Licht de gemaakte keuze toe:

N.B. indien sprake is van een transgene lijn, in Nederland gemaakt na 1 april 1997, dient hiervoor een vergunning door de Minister van LNV te zijn verleend. Specificeer bij vraag 8.

De afwezigheid van ziekte na immunisatie met gemannosyleerd myeline peptide is gedaan in een EAE model. Voor EAE studies worden vrouwelijke dieren gebruikt, omdat deze gevoeliger zijn voor ziekte inductie. In deze serie experimenten om onderliggend mechanisme te bestuderen zullen daarom enkel vrouwelijke dieren worden gebruikt.

Vrouwelijke SJL muizen, waarvan APC PLP₁₃₉₋₁₅₁ kunnen presenteren aan T cellen

Vrouwelijke C57BL6 muizen, waarvan APC OVA₃₇₁₋₃₈₆ kunnen presenteren aan T cellen

13. Wat is de herkomst van de dieren:

- ☒ aangekocht van proefdierfokker
- ☐ aangekocht elders, n.l.:
- ☐ overcomplete dieren
- ☐ eigen fok
- ☐ reeds eerder gebruikte proefdieren (geef aan in welk soort dierproef)
- ☐ anders, n.l.:

14. Wat is het eindpunt van de dierproef:

- ☒ euthanasie
- ☐ gebruik voor een volgende proef
- ☐ andere vergunninghouder
- ☐ anders, n.l.:

15. Hoe worden de dieren gehuisvest en verzorgd?

Vermeld groepssamenstelling, kooitype, voedsysteem en andere zaken die relevant zijn voor het welzijn van de dieren.

Type 3 bak : max. 10 muizen per bak

Voedsel ad libitum (SDS)

H₂O (pH 2.79), ad libitum.

ONGERIEF

16. Beschrijf de aard van het ongerief:

Geef hierbij, gespecificeerd per handeling of mogelijk gevolg van doseringen, het ongerief dat de dieren waarschijnlijk ondergaan.

De dieren zullen worden geïmmuniseerd met peptide in CFA of met CFA alleen, dit is matig ongerief voor de dieren. Ze worden opgeofferd binnen 10 dagen, dit is voor het eventueel ontstaan van ziekteverschijnselen in SJL muizen.

Onbehandelde dieren zullen gering ongerief ervaren.

17. Kwalificeer vervolgens de kans op ongerief (mate van ongerief en de duur of de mate van herhaling):

Tabel: mate en duur van het van het maximaal te verwachten ongerief		Duur van het ongerief			
		< 1 dag	1-7 dagen	7-30 dagen	> 30 dagen
Mate van ongerief	A: gering	40 (groep 8+9)			
	B: gering/matig				
	C: matig	30 (groep 1-3 opofferen binnen 24 u)	229		
	D: matig/ernstig				
	E: ernstig				
	F: zeer ernstig				

Splits eventueel uit naar groepen of aantallen, indien relevant (dit kan door de betreffende aantallen dieren in de betreffende cel van de tabel weer te geven). Zeer ernstig ongerief is op wettelijke gronden niet toelaatbaar zijn indien geen sprake is van essentiële belangen van de mens.

18. Wat wordt gedaan om eventuele pijn, stress of ander ongerief te verminderen, respectievelijk te voorkomen?

Beschrijf hier anesthesie, pijnbestrijding, aangepaste huisvesting e.d.

Niet van toepassing

19. Op welke indicatie (criteria!) worden dieren uit de proef genomen, dan wel voortijdig gedood?

Niet van toepassing

20. Zijn er bijkomende risico's te voorzien, en wat is de kans hierop?

Onwaarschijnlijk.

ALTERNATIEVEN

21. Welke alternatieve methoden (in termen van vervanging, vermindering, verfijning), zowel *in vivo* als *in vitro*, bestaan voor deze dierproef?

Geef aan, in relatie tot het antwoord op vraag 5, waarom alternatieven (in vivo én in vitro) in dit geval niet bruikbaar zijn:

De bevindingen aangaande verminderde T celactiviteit en het afwezig zijn van klinische symptomen zijn gedaan na immunisatie met gemannosyleerd peptide in adjuvant. *In vivo* activatie van APC door een dergelijk immunisatie protocol is noodzakelijk om het mechanisme te kunnen bestuderen.

Geef ook aan in welke zin eventueel gebruik wordt gemaakt van alternatieve methoden:

De complete vervolg analyse verloopt *in vitro* en is op zichzelf een verfijnde methode mechanistisch onderzoek te doen in deze setting.

22. Is info of advies gevraagd over alternatieve methoden aan:

O TNO-Netwerk voor Alternatieven, tel. [REDACTED]

O Art. 14 functionaris ([REDACTED], tel [REDACTED])

O Nationaal Centrum Alternatieven voor Dierproeven (tel. 030 - 253 21 63)

O elders, n.l.:

● zo nee; waarom niet: zie vraag 21

ANDERE ASPEKTEN

23. Welke andere dan de hiervoor vermelde aspecten zijn naar uw mening voor de toetsing van deze dierproef door de DEC van belang?

24. Geef hieronder, indien van toepassing, toelichting op de door u in dit aanmeldformulier gebruikte afkortingen:

onderzoeker

hoofd divisie

datum:

datum:

Na behandeling:

secretaris DEC