

65

1

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef				DECNR: 2011-138			
DEC- UM				Ontvangen: 10-11-2011			
Herziene versie							
DEC goedkeuring#	datum goedkeuring#	type aanvraag ²		VROM/GGONR ³		LNV/CBDNR ⁴	
Ja / Nee	16-11-2011	Nieuw		GGO IG 10-012		n.v.t.	
Hoofdproject							
Deelproject							
Financieel beheerder			budgetnummer	30943053N			
Titel van het onderzoek: Autophagy en het potentieel voor kanker therapie							
startdatum	December 2011		einddatum ⁹	November 2015	Duur van de proef ¹⁰ : 6 mnd / 0 jr		
	Naam	Tel (+ Tel privé enkel VO, VVO en VM)	E_mail	Bevoegdheid ⁵	Cap. groep /afdeling		
1. Verantwoordelijk onderzoeker (VO)				Art. 9			
2. Vervanger VO (VVO)				Art. 9			
3. Verantwoordelijk medewerker (VM) GGO ⁷				Art. 9			
4. overige uitvoerenden				Art. 12 Art 9 Art 9			
Protocolnr.	1	2	3	4	5	6	7
ctrl/exp/sham	exp	exp					
Diersoort	01	01					
Stam	Nu/nu	Nu/nu					
Construct/mutatie	-	-					
Herkomst (leverancier)	01	01					
Aantal	315	90					
Geslacht	m/v	m/v					
Zijn de dieren immuuncompetent ?	nee ⁸	nee ⁸	Ja/nee ⁸	Ja/nee ⁸	Ja/nee ⁸	Ja/nee ⁸	Ja/nee ⁸
Leeftijd/gewicht	2m, 28-30g	2m, 28-30g					
Doel van de proef *	30	30					
Belang van de proef *	01	01					
Toxicologisch onderzoek *	01	01					
Bijzondere technieken *	01	01					
Anesthesie *	04	04					
Pijnbestrijding *	01	01					
Mate ongerief *	03	04					
Toestand dier einde exp*	01	01					

2 Verantwoording

Aanvraag dierproef DEC-UM (kaders zijn licht flexibel, maar het geheel is max. 5 pag. versie 2006)

Titel: Autophagy en het potentieel voor kanker therapie

1. Doel van de proef.

Hypoxie (zuurstofgebrek) is kenmerkend voor humane solide tumoren. Deze hypoxische cellen zijn meer kwaadaardig en resistent tegen gebruikte therapiën (chemo- bestralingstherapie), dan normoxische cellen (normaal zuurstof niveau) . Om hypoxie te overleven zijn de cellen afhankelijk van biologische processen. Het is ons doel om deze biologische processen te identificeren. We denken dat dit leidt tot ontdekking van nieuwe moleculaire aangrijpingspunten ter bestrijding van kanker, want ontregeling van deze processen zal leiden tot verminderde tolerantie jegens hypoxie en daarom tot verhoogde celdood van kanker cellen.

Het doel van dit project is te bepalen of het verstoren van de mechanismen die leiden tot hypoxie-tolerantie, beschouwd kunnen worden als mogelijke targets voor kanker therapie.

Deze aanvraag omvat een nieuw onderzoek gebaseerd op eerder werk, waarin duidelijk is aangetoond dat verstoring van autofagie tumor cellen gevoeliger maakt voor hypoxie.

Deze aanvraag is opgesteld om een aantal vragen te beantwoorden. 1) Leidt de remming van de initiatie van autofagie tot verminderde tumor hypoxie? 2) Leidt het remmen van een specifiek deel van de autofagie-pathway tot verminderde vascularisatie? 3) Kan remming van autofagie de EGFR-VIII tumoren net zo gevoelig maken voor bestraling als "EGFR wild-type" tumoren?

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang

Hypoxie is kenmerkend voor solide tumoren. De aanwezigheid van hypoxische gebieden geeft een slechtere prognose voor het verloop van de ziekte in een verscheidenheid aan tumoren. Dit is gerelateerd aan een verhoogde maligniteit van hypoxische cellen en hun resistentie jegens kanker-therapiën. Eerder hebben we aangetoond dat het blokkeren van autofagie leidt tot een reductie in de hypoxische fractie van tumoren, met als gevolg een betere reactie op radiotherapie. Deze bevinding wordt nu getest in patiënten.

Het kunnen begrijpen van de biologische processen die leiden tot hypoxie-tolerantie in kankercellen is zeer belangrijk om de behandeling van kanker te verbeteren. Dit onderzoek opent mogelijk de deur voor het opzetten van nieuwe kanker therapieën, die niet gebaseerd zijn op bestaande therapieën.

3. Alternatieven

Het uitvoeren van deze experimenten kan niet anders uitgevoerd worden dan *in vivo*. Al het voorwerk en voorbereiding is allemaal *in vitro* gedaan (maken van cellijnen, onderzoeken van de pathways etc.). Hieruit is gebleken dat *in vitro* deze pathways een zeer belangrijke rol spelen in de hypoxie tolerantie van tumor cellen. Tumor cellen *in vitro* zijn echter niet te correleren met gedrag van deze cellen in de complexiteit van een tumor (processen als angiogenese, verschillende maten van hypoxie, cycli van hypoxie-reoxygenatie, 3d-structuren, etc). Daarom is het zeer van belang dat de invloed van deze pathways *in vivo* onderzocht worden.

4. Ethische afweging

Kanker is nog steeds een van de voornaamste doodsoorzaken in Nederland, nieuwe aangrijpingspunten en behandelingsmethoden zijn daarom zeer gewenst. Deze experimenten leiden mogelijk tot nieuwe therapieën voor kanker die innovatief zijn. Mogelijkerwijs zal in de toekomst hierdoor de genezing/onderdrukking toenemen.

Het ongerief is relatief beperkt en weegt o.i. op tegen het belang van de proeven. De beschreven proeven kunnen niet *in vitro* nagebootst worden, daar het juist gaat om complexe interactie tussen



systemen waarin het micromilieu van de tumor een rol speelt.

4 Wetenschap

5. Wetenschappelijke onderbouwing

Hypoxie en kanker

Hypoxie komt in alle solide tumoren voor en ontstaat wanneer de tumor de bloedvoorziening van het omliggende weefsel uitgroeit[1-3]. Deze hypoxie beïnvloedt de uitkomst van behandeling in een negatieve manier[1-3] doordat deze hypoxische cellen minder gevoelig zijn voor chemo- en radiotherapie. Bovendien wordt, door de aanwezigheid van hypoxische gebieden, angiogenese en metastasering bevorderd.

In dit voorstel wordt getracht juist deze hypoxische cellen aan te pakken. We zullen pathways uitschakelen die belangrijk zijn voor tolerantie tegen hypoxie *in vitro*. We verwachten dat door het uitschakelen van deze pathways de hypoxische tumor cellen niet meer adequaat kunnen reageren op de hypoxische stress en zullen doodgaan. Als deze hypothese klopt zou dit een zeer grote impact kunnen hebben op de ontwikkeling van verdere kanker-therapien en uitkomst van behandeling voor de patient.

Hypoxie en autophagy

Autophagy is een proces waarin de cel zichzelf "opeet" gedurende stress-condities[4]. Dit wordt gedaan om beschadigde organellen te verwijderen/afbreken en de vrijgekomen bouwstoffen kunnen dan weer gebruikt worden voor meer essentiële processen tijdens deze stress. In een vorige studie hebben we aangetoond dat hypoxische cellen zeer sterk afhankelijk zijn van autophagy om deze stress te overleven[5]. Remming van autophagy in tumoren, genetisch als farmacologisch, leidt tot een daling in de hypoxische fractie van de tumoren. Dit leidt tot een hogere gevoeligheid van de tumoren voor radiotherapie.

In deze gedane studie hebben we ons gericht op 1 specifiek onderdeel van autofagie, de afbraak van cellulaire organellen[6]. Recente data wijzen echter uit dat het mechanisme van autofagie ook andere aspecten reguleert waaronder de excretie van groei factoren tijdens hypoxie. Een specifiek doel van deze DEC is dan ook het **remmen van de excretie van groeifactoren** (GABARAPL1 knockdown) en de uitwerking op de tumor te bestuderen (bv vaatdichtheid vanwege verminderde VEGF excretie). Daarnaast hebben we waarschijnlijk een mechanisme ontdekt waarmee we de **initiatie van autofagie** tijdens hypoxie kunnen blokkeren. Het voordeel hiervan is dat we zowel de excretie van factoren én het recyclen van bouwstoffen gelijktijdig kunnen blokkeren (ULK1 knockdown).

EGFR(-VIII)

Epidermal growth factor receptor (EGFR) is frequent geamplificeerd in kankers en fungeert als een oncogen. Naast het wild-type EGFR, die het ligand EGF nodig heeft voor activatie, bestaan er ook constitutief actieve vormen van EGFR. Een van deze varianten die we bestuderen is de variant VIII. Deze signaleert continue wat leidt tot een betere overleving tijdens stressen zoals hypoxia en glucose deprivatie, maar ook zijn deze cellen meer resistent voor bestraling. Patienten met tumoren die deze variant tot expressie brengen hebben dan ook een slechte prognose. Recentelijk hebben we de observatie gedaan dat juist de cellen die VIII tot expressie brengen, een hogere activatie van autofagie hebben. Wanneer we autofagie in deze cellen remmen, dan worden de cellen net zo gevoelig voor hypoxie en starvatie als de controle cellen, wat resulteert in hogere celdood. Het doel van de proef is dan ook te testen of we middels autofagie remming (genetisch en farmacologisch), tumoren die EGFR-VIII tot expressie brengen net zo gevoelig kunnen maken voor bestraling als de controle tumoren zonder dit eiwit.

Proefopzet

Experiment 1:

Eerder hebben we aangetoond dat in hypoxische delen van tumoren autofagie geactiveerd wordt[6] en dat remming van autofagie de hypoxische fractie van tumoren vermindert. Het gevolg hiervan is dat tumoren gevoeliger worden voor bestraling. Recente data laten zien dat het proces van autofagie opgedeeld kan worden in verschillende aspecten (oa afbraak van celinhoud en exocytosis) (ongepubliceerde resultaten).

Het is duidelijk dat deze 2 mechanismen zeer belangrijk zijn voor tumorgroei en in stand houden van de hypoxische fractie in de tumor. De complexiteit van het micromilieu in een tumor kan niet worden nagebootst *in vitro*. Bovendien is het zeer onduidelijk wat de relatieve contributie van deze 2 mechanismen is. Vandaar deze aanvraag voor proefdieronderzoek.

Om dit proefdieronderzoek zo goed mogelijk (en eenmalig) uit te voeren hebben we een systeem gemaakt waarin conditioneel (doxycycline in drinkwater) elk van de mechanismen uitgeschakeld kan worden op het moment dat de tumor al gegroeid is (klinische situatie). Dit maakt het mogelijk om effectief te bestuderen wat de "behandeling" van een van de routes specifiek zou teweegbrengen.

Experiment 2:

Door het remmen van de hypoxie-response op translatie kon het proces van autophagy worden voorkomen. Dit maakte hypoxische cellen extreem gevoelig voor het gebrek aan zuurstof. Hiernaast hebben we een farmacologische remmer gebruikt van autophagy, het anti-malaria middel, Chloroquine[6]. Dit veelgebruikte geneesmiddel is op de markt en heeft alle toxicologische studies doorstaan en wordt momenteel in een klinische setting getest. Hiernaast is chloroquine reeds gebruikt in proefdiermodellen, waaronder de muis. In de dosering van 60mg/kg I.P. dagelijks is geen merkbare toxiciteit waargenomen[7]. Wel is het effect van chloroquine tumortype/celtype afhankelijk.

In vitro data wijzen uit dat radio-resistente cellen (EGFR-VIII positief) gevoeliger gemaakt kunnen worden door voorbehandeling met chloroquine. Hierbij is echter geen rekening gehouden met 3-d structuren en het micromilieu. Verder onderzoek voor de eventuele klinische toepassing voor deze tumoren is noodzakelijk *in vivo*.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Dit specifieke DEC protocol is beoordeeld en akkoord bevonden door

Dit onderzoek werd reeds verschillende malen op zijn wetenschappelijke merites beoordeeld. Het onderzoek maakt deel uit van een door de NWO-VENI en KWF toegekende subsidie.

6 Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Muis, nu/nu NMRI muizen omdat deze muizen zeer geschikt zijn om de groei en karakteristieken van een humane tumor *in vivo* te bestuderen, dit is ook de meest gebruikte muis voor deze doeleinden in de literatuur.

Deze muizen zullen geleverd worden door een van de regulier leveranciers (Charles River/ Harlan). De muizen zullen aan het eind van het experiment gedood worden, dus niet hergebruikt.

7b. Sexe

Voor onze experimenten is de sexe van de muis niet van belang

7c. Aantallen

Om het aantal proefdieren te reduceren tot de helft, wordt er gekozen om twee bilaterale tumorimplantaten per dier te gebruiken. Hierdoor kan dezelfde hoeveelheid informatie verkregen worden met de helft van het aantal proefdieren.

Gebaseerd op de literatuur en eigen gegevens is het beoogde verschil in behandelingsgroepen (tumoren) 25%, de variabiliteit binnen de tumoren is 18%. Gebruik makende van de statistische formule $N = 2(z_{\alpha} + z_{\beta})^2 \times (s/d)^2$ met een power van 80% ($F = 15,7$) kunnen we het aantal tumoren bepalen om per groep significantie ($p < 0,05$) te verkrijgen ($N = 8,13$). Rekening houdende met een uitvalspercentage van 10% (geen tumorvorming) zijn er 9 ($N = 8,94$) tumoren per groep nodig. Bij bilaterale implantatie betreft dit dus 5 muizen.

7 Dierproef

8. Experiment

Alle experimenten beschreven in dit onderzoek gebeuren rekening houdende met de code of practice met betrekking tot dierproeven binnen kankeronderzoek[8]. Eveneens werden de humane eindpunten op basis van dit document beargumenteerd.

Experiment 1:

Om te evalueren of targeting van verschillende autofagie aspecten een mogelijke target is ter bestrijding van kanker zullen transgene MCF7 (borst carcinoma) cellen worden ingespoten ter verkrijging van een xenograft tumor. Dit zal gedaan worden op een geblindeerde en gerandomiseerde wijze, subcutaan in beide flanken onder fixatie door een 2^e persoon.. De groei van MCF7 tumoren is estrogeen afhankelijk. Daarom zullen subcutaan 17 β -estradiol pellets (0.36 mg/pellet, 60 dagen afgifte) geïmplantéerd worden. Daarnaast, om uit te sluiten dat de effecten die gezien worden cel-type specifiek zijn. Zullen ook HT29 (colorectale kanker) en U373 (glioblastoma) cellen worden geïmplantéerd, , hiervoor hoeft geen estradiol worden toegedient.

Door tumorcellen te injecteren in beide flanken van het dier zonder dat de gezondheidstoestand ervan in gevaar komt, wordt een daling van het aantal nodige proefdieren in dit experiment gerealiseerd.

De experimenten zullen worden uitgevoerd in ruimte D-II in IVC kooien. De onwaarschijnlijkheid van het dragen van muispathogenen en de isolatie omstandigheden maken het niet nodig om de cellen te testen voor muispathogenen.

Metastasering van de tumoren is zowel uit eigen ervaring en de literatuur erg onaannemelijk. Dit is namelijk nog nooit geobserveerd.

Tijdens het experiment worden de subcutaan geïmplantéerde tumoren, wanneer voelbaar, 3x/week gemeten terwijl de muis gefixeerd wordt. De grootte van de tumor wordt bepaald gebruik makende van een Vernier calliper, in 3 orthogonale tumor diameters A, B en C, elk gecorrigeerd voor de huiddikte. Het tumorvolume wordt dan berekend door gebruik te maken van de formule $A \times B \times C \times \pi/6$, omdat de tumoren elliptisch groeien.

Dag 0: 1.5 10^6 cellen worden in de flank van de muis subcutaan geïnjecteerd (volume 50 μ L). De controle muizen krijgen geen doxycycline ter controle op de invloed van doxycycline op de tumor groei (groep 1).

In deze experimenten zullen 9 cellijnen gebruikt worden (MCF7, HT29, U373) met 3 verschillende induceerbare transgene manipulaties (controle, GABARAPL1, ULK1).

Table 2: Experimental setup

	Groep 1	Groep 2	Groep 3	Groep 4	Groep 5	Groep 6	Groep 7	
Doel van de groep	Experimentele groep	Experimentele groep	Experimentele groep	Experimentele groep	Experimentele groep	Experimentele groep	Experimentele groep	
Cellijnen	9	9	9	9	9	9	9	
muizen/cellijn	5	5	5	5	5	5	5	
Doxycycline	Nee	Ja	Nee	Ja	Nee	Ja	Ja (vanaf implantatie)	

Opmerkingen	<i>Tumor groei</i>	<i>Tumor groei</i>	<i>Bestraling , 15Gy</i>	<i>Bestraling , 10Gy</i>	<i>Voor histologie</i>	<i>Voor histologie</i>	<i>Tumor groei</i>	
Totaal aantal muizen	45	45	45	45	45	45	45	
Maximale duur van de proef	3 maanden	3 maanden	6 maanden	6 maanden	2 maanden	2 maanden	3 maanden	

Groep 1,2 en 7: Cellen worden geïmplant in de muizen. Groep 7 ontvangt reeds doxycycline vanaf het tijdstip van implantaie ter bepaling van het effect van ULK1 of GABARAPL1 deficientie op tumor vorming. Wanneer tumoren in groep 1 en 2 zijn ontstaan en deze een bepaald volume (~200 mm³) hebben, worden de muizen van groep 2 “behandeld” met doxycycline in het drinkwater (2g/L doxycycline, 5% sucrose in kraanwater). Uit *in vitro* data blijkt dat binnen 48 uur na doxycycline een maximaal effect bereikt wordt in de remming van de 3 eerder genoemde pathways. Groep 2 zal tot aan het einde van de experimenten doxycycline via het drinkwater krijgen ter bepaling van de potentie om de 3 genoemde pathways als chronische behandeling van tumoren te bepalen. De maximale duur van deze experimenten is 3 maanden.

Groep 3, 4, 5 en 6: Wanneer tumoren zijn ontstaan en deze een bepaald volume (200 mm³) hebben, worden de muizen van groep 4 en 6 “behandeld” met doxycycline in het drinkwater (2g/L doxycycline, 5% sucrose in kraanwater). Na 4 dagen na start dox worden de tumoren uit groep 3 en 4 behandeld met radiotherapie (enkele dosering, 15Gy) onder algehele anaesthesie (100 mg/kg + 10 mg/kg ketamine/xylazine mix (= 1 injectie)), de muizen krijgen dox voor 3 extra dagen. Hierna wordt hergroei van de tumor bepaald als maat van de hypoxische fractie van de tumor. Groep 3 en 4 zullen maximaal 6 maanden in experiment verblijven.

De tumoren van groep 6 zullen verwijderd worden na 7 dagen (totale duur dox in groep 3) doxycycline behandeling en voor histologische doeleinden gebruikt worden (afname hypoxische gebieden, vasculatuur, perfusie, proliferatie etc), tumoren van groep 5 zullen gelijktijdig verwijderd worden. De maximale duur van de experimenten van groep 6 en 7 is 2 maanden.

Einde experimenten: Wanneer het maximaal tumorvolume van 1 cm³ (totale tumorlast maximaal 2 cm³) benaderd wordt of wanneer de gezondheidstoestand van het dier afneemt, worden de muizen uit groep 1, 2, 3 en 4 onder gehele anaesthesie (100 mg/kg + 10 mg/kg ketamine/xylazine mix (= 1 injectie)) gebracht, waarna de tumor wordt verwijderd. Na het verwijderen van de tumoren wordt het dier ge-euthanaseerd door middel van cervicale dislocatie. De tumoren worden afgenomen en bewaard in vloeibare N₂ en/of fosfaat gebufferde formaline oplossing.

60 minuten voor het verwijderen van de tumoren wordt middels een i.p. injectie pimonidazole (60 mg/kg) ter identificatie van hypoxische gebieden in de tumoren en BrdU (30 mg/kg) ter identificatie van prolifererende cellen toegediend. 1 minuut voor verwijdering van de tumoren, wanneer de muizen al onder algehele anaesthesie zijn, wordt middels een i.v. injectie Hoechst 33342 (15 mg/kg) ter analyse van de “microvessel and perfusion density”.

Er is geen mogelijkheid om historische controles te gebruiken omdat deze experimenten nooit eerder op deze wijze zijn uitgevoerd.

Experiment 2:

Om te evalueren of remming van autophagy in hypoxische cellen een mogelijk nieuwe target is ter bestrijding van EGFR-VIII tot expressie brengende kankers zullen transgene U373 (astrocytoma, controle, EGFR-wt en EGFR-VIII), cellen worden ingespoten ter verkrijging van een xenograft tumor. Dit zal gedaan worden op een geblindeerde en gerandomiseerde wijze, subcutaan in beide flanken onder fixatie. Door tumorcellen te injecteren in beide flanken van het dier zonder dat de gezondheidstoestand ervan in gevaar komt, wordt een daling van het aantal nodige proefdieren in dit experiment gerealiseerd.

Metastasering van de tumoren is zowel uit eigen ervaring en de literatuur erg onaannemelijk. Dit is namelijk nog nooit geobserveerd.

Tijdens het experiment worden de subcutaan geïmplanteerde tumoren gemeten als beschreven in exp .1

Dag 0: $1.5 \cdot 10^6$ U373 cellen worden in de flank van de muis subcutaan geïnjecteerd (volume 50 μ L).

Bij het bereiken van de tumorgrootte van 200 mm³ zullen de muizen uit groep 2, 4 en 6 (tabel 3) behandeld worden met chloroquine (60 mg/kg I.P) voor 7 dagen. De tumoren uit groepen 3 en 4 zullen op dag 7 na chloroquine behandeling bestraald worden (15Gy) onder algehele anaesthesie (100 mg/kg + 10 mg/kg ketamine/xylazine mix (= 1 injectie)). Na 7 dagen zullen de tumoren uit groepen 5 en 6 verwijderd worden voor bepaling van histologie (afname hypoxische gebieden, vasculatuur, perfusie, proliferatie etc).

De tumoren in de groepen 1,2,3 en 4 zullen na hun eventuele behandeling 3x per week gemeten worden ter bepaling van de (her)groei van de tumor als maat van de therapie effectiviteit. De maximale duur van de dieren in experiment is vermeld onderin de tabel.

Table 3: Autophagy inhibition

	Groep 1	Groep 2	Groep 3	Groep 4	Groep 5	Groep 6
Doel van de groep	Experimentele groep	Experimentele groep	Experimentele groep	Experimentele groep	Experimentele groep	Experimentele groep
Aantal cellijnen	3	3	3	3	3	3
muizen/cellijn	5	5	5	5	5	5
Chloroquine	Nee	Ja	Nee	Ja	Nee	Ja
Opmerkingen	<i>Tumor groei</i>	<i>Tumor groei</i>	<i>Bestraling, 15Gy</i>	<i>Bestraling, 15Gy</i>	<i>Voor histologie</i>	<i>Voor histologie</i>
Totaal aantal muizen	15	15	15	15	15	15
Maximale duur van de proef	3 maanden	3 maanden	6 maanden	6 maanden	2 maanden	2 maanden

Einde experimenten: Wanneer het maximaal tumorvolume van 1 cm³ (totale tumorlast maximaal 2 cm³) benaderd wordt of wanneer de gezondheidstoestand van het dier afneemt, worden de muizen uit groep 1, 2, 3 en 4 onder gehele anaesthesie (100 mg/kg + 10 mg/kg ketamine/xylazine mix (= 1 injectie)) gebracht, waarna de tumor wordt verwijderd. Na het verwijderen van de tumoren wordt het dier ge-euthanaseerd door middel van cervicale dislocatie. De tumoren worden afgenomen en bewaard in vloeibare N₂ en/of fosfaat gebufferde formaline oplossing.

60 minuten voor het verwijderen van de tumoren wordt middels een i.p. injectie pimonidazole (60 mg/kg) ter identificatie van hypoxische gebieden in de tumoren en BrdU (30 mg/kg) ter identificatie van prolifererende cellen toegediend. 1 minuut voor verwijdering van de tumoren, wanneer de muizen al onder algehele anaesthesie zijn, wordt middels een i.v. injectie 15 mg/kg ter analyse van de "microvessel and perfusion density".

Er is geen mogelijkheid om historische controles te gebruiken omdat deze experimenten nooit eerder op deze wijze zijn uitgevoerd.

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

Anesthesie en euthanasie gebeuren in overeenstemming met het standaard protocol van het CPV van de Universiteit van Maastricht. Anestheticum (100 mg/kg + 10 mg/kg ketamine/xylazine mix (= 1 injectie)), wordt intraperitoneaal toegediend net voor bestraling.

Tijdens de duur van anaesthesie wordt oogzalf aangebracht teneinde voorkoming van uitdroging van de ogen. Tumorexcisie gebeurt onder gehele anesthesie.

9b. Pijnbestrijding

Er wordt geen significante pijn verwacht. De nu/nu NMRI muizen ontvangen de tumorcellen via een subcutane injectie. Naar verwachting en ervaring zullen de klachten hierdoor beperkt zijn en is pijnmedicatie niet noodzakelijk. ~~Er zal geen pijnstilling in de vorm van buprenorfine (s.d. 0,1 mg/kg) gegeven worden.~~

9c. Euthanasie en Humane eindpunten (zie code of practice-dierproeven binnen kankeronderzoek)

- De dieren worden ge-euthanaseerd door cervicale dislocatie bij ziekte en wanneer de maximaal toegestane tumorlast wordt bereikt.
- Humane eindpunten waarbij euthanasie gebeurd zijn ziekte (vast te stellen door onderzoeker, proefdierverszorger) en wanneer de maximaal toegestane tumorlast (2 cm³) wordt bereikt.
- Wanneer er open wondes bij sterk extern necrotiserende tumoren (fenomeen vnl bij grotere tumoren) en wanneer er vocht lekt uit deze open wonde, wordt het proefdier onmiddellijk ge-euthanaseerd.

10a. Ongerief**Experiment 1:**

Tumorimplantatie (*gering/matig* = 02): Onder fixatie worden tumorcellen subcutaan geïnjecteerd.

Tumorgroei (*gering* = 01): Experimenten starten bij een volume van 200 mm³. Door de beperkte tumorload zijn geen systemische klachten te verwachten.

Tumorgrootte meting (*matig/ernstig* = 03): De tumor zal herhaaldelijk onder fixatie gemeten worden. Het meten op zich zal zeer gering ongerief teweeg brengen, maar het herhaaldelijk fixeren veroorzaakt gesteld ongerief.

Toedienen doxycycline (*gering* = 01): Doxycycline is ongevaarlijk en niet-toxisch voor knaagdieren. Het drinkwater kan echter wel anders smaken wat verminderd drinkgedrag kan veroorzaken. Dit wordt opgelost door 5% sucrose toe te voegen aan het drinkwater.

Bestraling van de tumor (*matig* = 03) Onder anesthesie (ketamine/xylazine) wordt het dier in de mal (afscherming) en het toestel gepositioneerd. Bestraling op zich veroorzaakt gering ongerief, maar het bijkomen uit de anaesthesie brengt ongerief teweeg.

Chirurgisch verwijderen van de tumor (*gering/matig* = 02): Bij het vereiste volume worden de tumoren onder gehele anesthesie verwijderd, waarna het dier ge-euthanaseerd wordt door middel van cervicale dislocatie.

	Groep 1	Groep 2	Groep 3	Groep 4	Groep 5	Groep 6	Groep 7
Totaal ongerief	3	3	4	4	3	3	3

Experiment 2:

Tumorimplantatie (*gering/matig* = 02): Onder fixatie worden tumorcellen subcutaan geïnjecteerd.

Tumorgroei (*gering* = 01): Experimenten starten bij een volume van 200 mm³. Door de beperkte tumorload zijn geen systemische klachten te verwachten.

Tumorgrootte meting (*matig/ernstig* = 03): De tumor zal herhaaldelijk onder fixatie gemeten worden. Het meten op zich zal zeer gering ongerief teweeg brengen, maar het herhaaldelijk fixeren veroorzaakt gesteld ongerief.

Toedienen chloroquine (*matig/ernstig* = 04): Chloroquine zal in de helft van de muizen dagelijks I.P. geïnjecteerd worden voor 7 dagen lang.

Bestraling van de tumor (*matig* = 03) Onder anesthesie (ketamine/xylazine) wordt het dier in de mal (afscherming) en het toestel gepositioneerd. Bestraling op zich veroorzaakt gering ongerief, maar het bijkomen uit de anaesthesie brengt ongerief teweeg.

Chirurgisch verwijderen van de tumor (*gering/matig* = 02): Bij het vereiste volume worden de tumoren onder gehele anesthesie verwijderd, waarna het dier ge-euthanaseerd wordt door middel van cervicale dislocatie.

	Groep 1	Groep 2	Groep 3	Groep 4	Groep 5	Groep 6
Totaal ongerief	3	3	4	4	3	3

10b. Welzijnsevaluatie

Een welzijnsevaluatie (ongerieflogboek) wordt bijgehouden.

11. Verzorging en huisvesting

Zowel de dierverzorgers van de centrale proefdieren verzorging als de onderzoekers verzorgen de dieren. Op deze wijze is het toezicht op en het welzijn van de dieren gewaarborgd. nu/nu NMRI muizen worden gehuisvest in in in groepen van 3. Water (evt met 2g/L doxycycline in 5% sucrose) en voedsel worden verstrekt ad libitum door de onderzoekers. Kooien worden volgens de standaardregels onderhouden. In het geval van calamiteiten contact opnemen met de VO of VVO.

12. Deskundigheid

Ons inziens is er bevoegdheid en genoeg bekwaamheid voor het uitvoeren van de geplande experimenten. De verantwoordelijk onderzoeker heeft 10 jaar ervaring met het uitvoeren van dieproeven.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

Implantatie van tumoren:

Voorafgaand aan de experimenten worden, nadat de dieren gedurende een week in quarantaine op het CPV zijn geweest, de tumoren subcutaan geïmplant. De cellijnen zullen ter beschikking gesteld worden aan de bevoegde instanties in verband met microbiologische screening. Vervolgens worden de cellen ingespoten in beide flanken van de muis onder fixatie door een 2^e persoon. De gemaakte incisie wordt na het voorzichtig terugtrekken van de naald gedurende een korte periode manueel dichtgehouden. Daarna kan de laesie op spontane wijze genezen.

Doxycycline in drinkwater (experiment 1):

Wanneer de tumoren het gewenste volume hebben ($> 200 \text{ mm}^3$) wordt het drinkwater van de groepen vervangen door water, 5% sucrose en 2 g/L doxycycline (groep 2, 4 en 6). Wanneer de tumoren voelbaar aanwezig zijn, worden de tumoren opgemeten met een Vernier calliper, totdat de maximale tumor grootte van 1 cm^3 wordt benadert of totdat de muizen ziek zijn als dit eerder gebeurt.

Chloroquine injecties (experiment 2):

Wanneer de tumoren het gewenste volume hebben ($> 200 \text{ mm}^3$) worden de muizen I.P. geïnjecteerd met 60mg/kg chloroquine in fysiologisch zout (groep 2, 4 en 6).

Tumor bestraling:

Wanneer beschreven zullen tumoren van muizen bestraald worden met een enkele dosis van 15 Gy. Dit zal gebeuren binnen het . Hierbij wordt alleen de tumor blootgesteld aan de bestraling, de rest van de muis zal worden afgeschermd en vrijgesteld van straling.

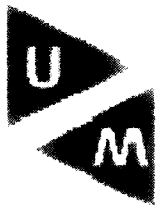
Verwijderen tumoren:

De muizen worden geanesthetiseerd (100 mg/kg + 10 mg/kg ketamine/xylazine mix (= 1 injectie)). Vervolgens worden de tumoren verwijderd en een deel wordt onmiddellijk overgebracht in vloeibare stikstof en zullen bij -80°C worden bewaard voor verdere analyse. Een ander deel wordt overgebracht naar een fosfaat-gebufferde formaline oplossing. Na afloop worden de dieren ge-euthanaseerd door middel van cervicale dislocatie.

Relevante literatuur

- [1] Brizel, DM, Sibley, GS, Prosnitz, LR, Scher, RL, Dewhirst, MW. Tumor hypoxia adversely affects the prognosis of carcinoma of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997;38:285-289.
- [2] Hockel, M, Schlenger, K, Aral, B, Mitze, M, Schaffer, U, Vaupel, P. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res* 1996;56:4509-4515.
- [3] Nordsmark, M. Direct measurements of tumor-tissue pO₂. A way of selecting patients for hyperoxic treatment. *Strahlenther Onkol* 1996;172 Suppl 2:8-9.
- [4] Mizushima, N. The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide. *Cell Death Differ* 2005;12 Suppl 2:1535-1541.
- [5] Rouschop K, VT, Dubois L, Niessen H, Bussink J, Savelkoul K, Keulers, T, Mujcic, H, Landuyt W, Voncken J, Lambin P, van der Kogel A, Koritzinsky M, Wouters B. The unfolded protein response protects cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes LC3b and ATG5. *J Clin Invest* 2009;in press.
- [6] Rouschop, KM, van den Beucken, T, Dubois, L, et al. The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5. *J Clin Invest* 2010;120:127-141.
- [7] Amaravadi, RK, Yu, D, Lum, JJ, et al. Autophagy inhibition enhances therapy-induced

apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. J Clin Invest 2007;117:326-336.
[8] Inspectie W&V, ZDH. CODE OF PRACTICE, DIERPROEVEN IN HET
KANKERONDERZOEK. juli 1999.



University Maastricht



Faculty of Health, Medicine

and Life Sciences

Dierexperimenten Commissie

DEC

Aan:

voorzitter
p/a Secretariaat DEC-UM
Postbus 616
NL-6200 MD Maastricht
Telefoon: 043-

Uw referentie:

Onze referentie :

Maastricht, 26-10-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Autophagy en het potentieel voor kanker therapie*", is op de DEC vergadering van 21 oktober 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De DEC verzoekt bij punt 6, het stukje tekst "door de verantwoordelijke onderzoekers" te verwijderen. Je kunt als verantwoordelijke onderzoeker niet je eigen aanvraag wetenschappelijk beoordelen. (Akkoord bevonden door het hoofd laboratorium).
- Punt 8- De DEC vraagt zich af waarom er gekozen is voor deze 3 tumorcellijnen (waarom bijvoorbeeld niet 2 of 4?). Dit kan consequenties hebben voor het aantal dieren.
- De DEC verzoekt bij punt 9b te vermelden dat als men klinische symptomen ziet, pijnstilling gegeven zal worden.
- Punt 10a- De DEC merkt op dat het ongerief van de tumorimplantatie van experiment 1 en experiment 2 verschillend is. Graag in overeenstemming brengen. De DEC verzoekt het totale ongerief per groep en experiment aan te geven (tabel was behulpzaam geweest).

Gelieve eventuele vragen te beantwoorden in een brief en indien noodzakelijk Uw project aan te passen en duidelijk de aanpassingen grijs te markeren.

Uw project staat bij de DEC geregistreerd onder nummer 2011-138, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Aan: ,
Voorzitter DEC-UM

Maastricht, 10-11-11

Betreft: beantwoording vragen/commentaren DEC aanvraag 2011-138

Geachte ,

Bij deze treft u de puntsgewijze beantwoording van de vragen en commentaren gesteld door de DEC aan.

1. De DEC verzoekt bij punt 6, het stukje tekst "door de verantwoordelijke onderzoekers" te verwijderen. Je kunt als verantwoordelijke onderzoeker niet je eigen aanvraag wetenschappelijk beoordelen. (Akkoord bevonden door het hoofd laboratorium). Deze is aangepast in de aanvraag
2. Punt 8- De DEC vraagt zich af waarom er gekozen is voor deze 3 tumorcellijnen (waarom bijvoorbeeld niet 2 of 4?). Dit kan consequenties hebben voor het aantal dieren. Er is gekozen voor 3 verschillende cellijnen voor verschillende redenen:
 - a) Deze drie modellen zijn veelvuldig in gebruik in ons lab, zowel in vitro als in vivo. Daarnaast zijn deze cellijnen volledig gekarakteriseerd waardoor het vergelijken van de drie cellijnen waardevolle informatie zal geven over de toepasbaarheid in patiënten (elk reageren anders op hypoxie in survival en genexpressie).
 - b) Voor alle drie is bewezen dat de in stand houding van de hypoxische fractie in tumoren zeer sterk afhankelijk is van autofagie.
 - c) Expressie patronen van GABARAPL1 en ULK1 zijn sterk verschillend in deze 3 cellijnen. Te weten, in MCF7 komen GABARAPL1 en ULK1 zeer hoog tot expressie, wat afneemt tijdens hypoxie (geen nieuwe aanmaak). In HT29 worden beiden heel erg sterk geproduceerd onder hypoxie. In U373 zien we een transiente opregulatie van beide eiwitten, gevolgd door een afname.
Alle drie de patronen nemen we ook waar in humaan tumormateriaal. Dit hebben we aangetoond middels immunohistochemie.
3. De DEC verzoekt bij punt 9b te vermelden dat als men klinische symptomen ziet, pijnstilling gegeven zal worden. Deze is aangepast in de aanvraag
4. Punt 10a- De DEC merkt op dat het ongerief van de tumorimplantatie van experiment 1 en experiment 2 verschillend is. Deze is aangepast in de aanvraag
5. Graag in overeenstemming brengen. De DEC verzoekt het totale ongerief per groep en experiment aan te geven (tabel was behulpzaam geweest). Deze toegevoegd aan aanvraag

Ik hoop dat ik uw vragen en commentaren naar behoren heb kunnen beantwoorden. Mocht dit niet het geval zijn dan ben ik bereid om e.e.a. telefonisch of in een direct gesprek toe te lichten.

Met vriendelijke groet,

Aan:

*Ons kenmerk**Doorkiesnummer*
043*Maastricht*
16-11-2011*Project: Autophagy en het potentieel voor kanker therapie.*DEC-UM
Voorzitter DEC-UM**Verantwoordelijk onderzoeker (VO):**

p/a secretariaat DEC-UM

Namens de Vergunninghouder van de DEC-UM, delen wij u mede dat voornoemd project aan de ethische toetsingscriteria voor proefdiergebruik voldoet.

Secretariaat DEC-UM
T (043)

De DEC maakt geen bezwaar tegen uitvoering van dit project zoals aangevraagd en geeft een positief advies.

Bezoekadres

Projectnummer: 2011-138**Diersoort:** muis**Aantal dieren:** 405**Einddatum:** 16-11-2015*Postadres*
Postbus 616
6200 MD Maastricht

Uw project staat bij de DEC en CPV geregistreerd onder bovenstaand nummer. Gelieve dieren, die voor dit project bestemd zijn, ook onder dit nummer aan te vragen.

Voorzitter DEC-UM

Vicevoorzitter DEC-UM