

48

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

DECNR: 2011-001

Versie 2006

Herziene versie

Ontvangen: 11-02-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag ₂
02-03-2011	Nieuw

VROM/GGONR ³
IG02-282

LNV/CBDNR ⁴
n.v.t.

Hoofdproject	CARIM	NUTRIM	Hersenen en gedrag	GROW	biomaterialen	Ander UM	Geen UM
--------------	-------	--------	--------------------	------	---------------	----------	---------

Deelproject		2					
-------------	--	---	--	--	--	--	--

Financieel beheerder	
----------------------	--

Budgetnummer	31962174N
--------------	-----------

Titel van het onderzoek:

Investigation of the role of Glycogen Synthase Kinase-3 bèta (GSK-3β) in unloading-induced skeletal muscle atrophy

startdatum **01-03-2011** einddatum ⁹ **31-12-2012** *Duur van de proef¹⁰: Max. 7 dagen*

Naam	Tel (+ Tel privé enkel VO, VVO en VM)	E-mailadres	Bevoegdheid ⁵	Cap. groep /afdeling
1. Verantwoordelijk onderzoeker (VO)			Art. 9 + 12	
2. Vervanger VO (VVO)			Art. 9	
3. VM GGO ⁷			Art. 9	
4. overige uitvoerenden			Art. 9	
5.			Art. 9	

Diergroep	1	2	3-5	6-8
ctrl/exp/sham	ctrl	ctrl	exp (HS)	exp (HS)
Diersoort	Mus musculus	Mus musculus	Mus musculus	Mus musculus
Stam	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6
Construct / mutatie?	MLC-Cre ^{-/-} /GSK-3β ^{n/n}	MLC-Cre ^{+/-} /GSK-3β ^{n/n}	MLC-Cre ^{-/-} /GSK-3β ^{n/n}	MLC-Cre ^{+/-} /GSK-3β ^{n/n}
Herkomst (leverancier) *	01	01	01	01
Aantal	9	9	27	27
Geslacht	man	man	man	man
Dieren immuuncompetent?	Ja	Ja	Ja	Ja
Leeftijd/gewicht	12 weken	12 weken	12 weken	12 weken
Doel van de proef *	33	33	33	33
Belang van de proef *	01	01	01	01
Toxicologisch onderzoek *	01	01	01	01
Bijzondere technieken *	01	01	01	01
Anesthesie *	01	01	04	04
Pijnbestrijding *	01	01	01	01
Mate ongerief *	02	02	04	04
Toestand dier einde exp*	01	01	01	01

* VHI-coderingen zie bijlage

Verantwoording

Aanvraag dierproef DEC-UM

Titel: Investigation of the role of Glycogen Synthase Kinase-3 β in unloading-induced skeletal muscle atrophy

1. Doel van de proef.

De afgelopen jaren is in diverse klinische trials de effectiviteit onderzocht van beschikbare geneesmiddelen gericht op stimulatie van spiergroei en voorkomen van spieratrofie via de Insulin-Growth-Factor I (IGF-I) signaal-transductie route bij patiënten met chronisch obstructief longlijden (COPD), chronisch hartfalen (CHF) en kanker, die lijden aan gewichts- en spierrmassaverlies (cachexie). Deze interventies hebben slechts wisselende positieve resultaten opgeleverd, waarbij sommige patiënten wel en anderen niet goed reageren op de anabole stimuli. Daarnaast zijn er sterke neveneffecten gerapporteerd waaronder insulineresistentie. Om selectiever en specifiek skeletspieratrofie te kunnen voorkomen is een beter inzicht in de (cellulaire) mechanismen van IGF-I gestimuleerde spierrmassamodulatie nodig. **De centrale hypothese van dit projectvoorstel is dat GSK-3 β vereist is voor spieratrofie.** Deze hypothese is gebaseerd op resultaten afkomstig uit eerder *in vitro* en associatief dierexperimenteel onderzoek van onze groep. Nu dient de causaliteit te worden geverifieerd *in vivo*. Spierrmassaverlies zal daarom worden geïnduceerd bij muizen met en zonder GSK-3 β expressie in de skeletspieren door de belasting op de achterpootspieren te ontnemen. De inzichten die dit project zullen opleveren in de signaaltransductie van spieratrofie en specifiek de mogelijk beschermende effecten van GSK-3 β inhibitie op spieratrofie, kunnen de weg openen voor een meer gerichte therapeutische aanpak van spierrmassaverlies om de kwaliteit van leven en levensverwachting van een substantieel deel van de patiënten met chronisch orgaan falen en kanker te verbeteren.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang



Gewichtsverlies (cachexie) en specifiek verlies van spierrmassa (spieratrofie) komt vaak voor bij chronische ziekten zoals chronisch obstructief longlijden (COPD) en chronisch hartfalen (CHF), evenals bij kankerpatiënten. Ruim 35% van alle sterfgevallen in Nederland zijn het gevolg van deze ziekten (bron: www.rivm.nl). Spierrmassaverlies is, onafhankelijk van de ernst van de primaire stoornis, verantwoordelijk voor de kenmerkende spierzwakte en verminderde inspanningstolerantie bij deze aandoeningen, hetgeen resulteert in een verminderde kwaliteit van leven en zelfs een verhoogd overlijdensrisico (zie foto). Spierrmassaverlies treft uiteindelijk 10-20% van de patiënten met deze aandoeningen. Behandeling van spierrmassaverlies is daarom een belangrijke doelstelling in een geïntegreerde aanpak van deze ziektebeelden, die zich niet uitsluitend richt op de primaire orgaanfunctiestoornis, maar ook op systemische manifestaties om zo de kwaliteit van leven en prognose van deze patiënten te verbeteren.



3. Alternatieven

1. Vervanging:

Een groot deel van de experimenten van het totale onderzoeksproject is uitgevoerd in gekweekte spiercellen (hier niet beschreven). De hieruit verkregen evidentie voor een belangrijke rol van GSK-3 β in spiergroei (1), naast data die aangeven dat GSK-3 β ook een rol speelt in de inductie van atrofie (Verhees *et al.* submitted), noopt ons tot het testen van de rol van GSK-3 β in een dierexperimenteel model van spieratrofie. De kennis van naar de mens extrapolerbare mechanismen van skeletspiergroei stamt uit dierexperimenteel onderzoek in gewervelde dieren, en dan met name muizen en ratten,

waardoor vergelijking met de literatuur van onze data het meest valide zou zijn door gebruik te maken van een muizenmodel.

2. Vermindering:

Dankzij een powerberekening (bijgesloten) die we hebben gebaseerd op gegevens uit voorgaande studies in hetzelfde model hebben we het minimale aantal benodigde dieren exact kunnen berekenen.

3. Verfijning:

Om de klinische situatie na te bootsen (inactiviteit geïnduceerde atrofie) is het doel van onze experimentele opzet om atrofie te induceren door verminderde/niet-belasting van de ledematen. Er werd gekozen voor het hind-limb suspension (HS) model waarbij de musculatuur van de achterpoten atrofieert als gevolg van een gebrek aan belasting. In de literatuur is dit een algemeen geaccepteerd model van omkeerbare spieratrofie, waarmee wij zelf ook uitvoerige ervaring hebben opgedaan en in vergelijking tot de literatuur al een aantal verfijningen hebben doorgevoerd. Zo zijn meerdere dieren (4 maximaal) tijdens de hind-limb suspension gezamenlijk gehuisvest [**sociale huisvesting**] en is er naast circulaire bewegingsvrijheid ook verplaatsing mogelijk in de lengterichting van de kooi. Ook wordt door een adaptatie van het staartharnas het gewicht verdeeld over de gehele lengte van de staart.

Naast de door ons voorgestelde wijze van atrofieren van de achterpootspieren, zijn alternatieve methoden om atrofie te induceren overwogen. Een voorbeeld hiervan betreft het inspalken van een achterpoot. Het nadeel van dit model is dat van elk dier de spieren van maar 1 achterpoot bruikbaar zijn, omdat de contralaterale poot niet is ingespalkt en er tweemaal zoveel dieren nodig zouden zijn voor dezelfde hoeveelheid spiertjes. Het argument dat “elk dier zijn eigen controle is” gaat helaas niet op omdat de niet-gespalkte poot extra wordt belast, wat mogelijk een *confounder* introduceert aangezien dit ook spiergroei zou kunnen induceren. Tenslotte is het erg lastig om te voorkomen dat de diertjes de spalk gaan aanvreten, wat mogelijk een hoog uitvalpercentage teweeg zou brengen als gevolg van een tussentijdse beëindiging van de atrofieëriingsperiode. **Recentelijk is er vergelijkbare studie gepubliceerd waarbij er 1 achterpoot werd geïmmobiliseerd met behulp van een stalen nietje (24). De contralaterale achterpoot diende wederom als controle. Voor dit model geldt eveneens dat de contralaterale achterpoot extra belast wordt, hetgeen hypertrofie zou kunnen induceren. Naast deze *confounding* factor, zou de keuze voor dit model de inclusie extra dieren noodzakelijk maken (zie boven). Ten slotte zal het implementeren van een nieuw immobilisatieprotocol ons niet in staat stellen die hier uit verkregen data te vergelijken met de reeds uitgevoerde HS-studies (DEC-2009-074).**

4. Ethische afweging

Zoals boven reeds beschreven treft spiermassaverlies 10 tot 20% van de patiënten met COPD, CHF en kanker en zijn deze ziekten gezamenlijk verantwoordelijk voor 35% van de overlijdensgevallen in Nederland. Naast een bijdrage aan een verhoogd sterfterisico bij deze aandoeningen is spiermassaverlies verantwoordelijk voor ernstige fysieke beperkingen en een sterke vermindering van de kwaliteit van leven (zie foto in sectie 2). Als met behulp van gerichte therapeutische strategieën de spiermassa genormaliseerd (c.q. behouden) zou kunnen worden, kan dit een enorme verbetering in de kwaliteit van leven en een verkleining van het sterfterisico betekenen voor deze patiënten. Hiertoe zijn dierexperimentele studies soms onontbeerlijk. In dit geval dient het inzetten van muizen in het voorgestelde hind-limb suspension model ertoe om als “proof of principle” de effecten van GSK-3 β afwezigheid op spieratrofie te toetsen. In het geval van een positieve bevinding kan dit de weg openen voor het ontwikkelen van GSK-3 β remmers die selectief op de spieren van patiënten toegepast kunnen worden. Wij hopen om deze redenen dan ook dat de DEC onze mening deelt dat vanuit ethisch perspectief het ongerief waaraan de dieren in dit experiment zullen worden onderworpen opweegt tegen het uiteindelijke doel van dit experiment, zijnde de ontwikkeling van therapieën ter voorkoming van uitmergeling van bovengenoemde patiënten tot aan de dood.

Wetenschap

5. Wetenschappelijke onderbouwing

COPD, CHF en kanker zijn ziekten die vaak gepaard gaan met een onvrijwillig verlies aan

lichaamsgewicht (cachexia). Een significant deel van dit verlies is toe te schrijven aan de afname van spiermassa (spieratrofie). Spieratrofie treft ongeveer 10-20% van deze patiënten en samen zijn deze aandoeningen verantwoordelijk voor ongeveer 35% van alle overlijdensgevallen in Nederland. Spieratrofie heeft ernstige fysieke gevolgen en draagt bij tot een verminderde kwaliteit van leven, mede dankzij de afname van spierkracht en uithoudingsvermogen (2-4). Het is algemeen aanvaard dat skeletspieratrofie, of gewoonweg *wasting*, in verband wordt gebracht met een toegenomen morbiditeit en mortaliteit (5). Uit klinisch oogpunt is het daarom zeer belangrijk om op zoek te gaan naar therapeutische strategieën die ons in staat kunnen stellen het verlies aan spiermassa bij patiënten met COPD, CHF of kanker te remmen of om te keren. Zulke strategieën moeten gericht zijn tegen belangrijke regulatoren van skeletspier plasticiteit. Het is met andere woorden noodzakelijk om regulatoire eiwitten te identificeren die de balans tussen spiergroei en spieraafbraak coördineren. In beide gevallen lijkt er een belangrijke rol te zijn weggelegd voor Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) signalering (6, 7). Verscheidene belangrijke componenten (kinases) van deze signaal-transductie cascade, waaronder PI-3K, Akt en Glycogen Synthase Kinase-3 β (GSK-3 β) zijn reeds geïdentificeerd (8-12). Studies uit ons lab hebben aangetoond dat inhibitie van GSK-3 β de groei van spierweefsel stimuleert (1). Daarnaast hebben we ook aangetoond dat spierregeneratie na atrofie samenhangt met een afname van GSK-3 β activiteit (23). Uit deze studies blijkt dus dat er een belangrijke (onderdrukkende) rol is weggelegd voor GSK-3 β in de vorming van spierweefsel. Naast een rol in spiergroei blijkt GSK-3 β ook een belangrijke rol te spelen in de inductie van atrofie. Recente data tonen immers aan dat de mRNA expressie van twee belangrijke atrofiegerelateerde genen (Atrogin-1 en MuRF1) afhankelijk is van GSK-3 β (Verhees *et al.* submitted). Uit deze *in vitro* studie bleek dat de afwezigheid van GSK-3 β het atrofiefenotype in gekweekte spiercellen gedeeltelijk kon omkeren. **De centrale hypothese van dit project is dat GSK-3 β vereist is voor de inductie van inactiviteit geïnduceerde skeletspieratrofie.** Deze hypothese wordt getest in muizen met een spierspecifieke knock-out van GSK-3 β . *Unloading-induced atrophy* wordt in deze dieren bewerkstelligd door middel van het *Hind-limb suspension* model, waarbij er verwacht wordt dat de achterpootspieren van GSK-3 β -deficiënte dieren (gedeeltelijk) gespaard zullen blijven van atrofie.

6. Wetenschappelijke beoordeling

De geplande muizenexperimenten maken deel uit van een project dat gefinancierd wordt door het) en werd bijgevolg onderworpen aan een wetenschappelijke beoordeling. Daarnaast is dit DEC protocol ingekeken en goedgekeurd door de PI (#5 voorblad).

Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

De experimenten zullen worden uitgevoerd op 12 week oude muizen, met een C57BL/6 achtergrond. In deze studie zal er gebruik worden gemaakt van muizen met een spierspecifieke knock-out voor GSK-3 β (MLC-Cre ^{+/+}/GSK-3 β ^{fl/fl}) en haar respectievelijke genotypische controle (MLC-Cre ^{-/-}/GSK-3 β ^{fl/fl}). De muizen worden verkregen uit eigen fok, gelokaliseerd in de IVC-unit van het CPV. Nadat het experimentele protocol doorlopen is zullen de muizen worden opgeofferd waarna totaal bloed en spierweefsel zal worden geïsoleerd.

7b. Sexe

De belangrijkste experimentele parameter in dit voorstel is de bepaling van het natte spiergewicht. Het spiergewicht wordt sterk bepaald door de leeftijd en het geslacht van het dier. Om eenduidige en reproduceerbare data te genereren met betrekking tot spiergewicht is het belangrijk om uit te gaan van 1 geslacht. Op grond daarvan stellen we voor alleen mannelijke dieren te includeren, daar ons dit in staat zal stellen de data te vergelijken met vorige studies, waarin ook alleen mannelijke dieren werden gebruikt.

7c. Aantallen

In een vorige hind-limb suspension studie (DEC-2009-074) waren we in staat een verschil (d) te detecteren tussen WT en genetische gewijzigde dieren. Deze verschillen kwamen het sterkst tot uiting in de *M. soleus* – de spier die het meest in massa afneemt na hind-limb suspension (HS) – en bedroeg 15.75% met een variantiecoëfficiënt (σ) van 11.5%. Als we aannemen dat er een lineair verband bestaat tussen het spiergewicht en de cross-sectional area (CSA) dan zou de benodigde groepsgrootte als volgt kunnen worden bepaald:

$$n = 15.7 \times \frac{[\sigma]^2}{(d)^2} = \frac{[11.5]^2}{[15.75]^2} = 8.4 \text{ dieren}$$

In dit protocol wordt er ongeveer 5% uitval verwacht. Dus $(8.4 \text{ dieren}/95\%) \times 100 = 8.8 \text{ dieren}$. Afgerond komt dit neer op 9 dieren per groep, rekening houdend met een uitvalspercentage van 5%. Om deze studie uit te voeren hebben we een totaal van 72 dieren nodig ($9 \times 2 \text{ genotypes} \times 4 \text{ condities} = 72 \text{ dieren}$).

Dierproef

8. Experiment

Mannelijke muizen met een spierspecifieke knock-out voor GSK-3 β (MLC-Cre ^{+/+}/GSK-3 β ^{fl/fl}) en hun genotypische controle (MLC-Cre ^{-/-}/GSK-3 β ^{fl/fl}) worden na het spenen samen opgekoooid in de groepsindeling zoals ze in experiment zullen gaan. Deze methode is voorheen door Nicky Pansters (DEC-2009-074) met succes toegepast. Als de dieren de leeftijd van 3 maanden hebben bereikt, zullen ze worden ingedeeld in volgende groepen: a) Baseline (Groepen 1-2) b) Hind-limb suspension (HS) gedurende 2, 4 of 7 dagen (Groepen 3-8).

Het hind-limb suspension model: HS is een bekend en uitvoerig beschreven atrofie-model (17, 18). In onze groep hebben we er meermaals met succes gebruik van gemaakt (23); DEC-2009-074 (vraagstelling daarbij betrof het belang van GSK-3 β bij spierregeneratie tijdens herstel na HS). HS wordt bewerkstelligd door gebruik te maken van een ophangstelsel voor de staart. Deze inrichting bestaat uit

een met plastic gecoate ijzerdraad, die voorzichtig rond de staart van de muis wordt getapet. Deze draad wordt vervolgens bevestigd aan een spoelkop waardoor cirkelvormige bewegingen mogelijk blijven. De opstelling laat met andere woorden toe dat de muis vrij rond zijn eigen as kan bewegen. Deze spoelkop is op zijn beurt bevestigd aan een Teflon ring die over een lange ijzeren staaf kan schuiven. Deze staaf is aangebracht over de hele lengte van de kooi. Hierdoor is de muis in staat zich in de lengterichting van de kooi voort te bewegen. Het staartharnas wordt aan de staart bevestigd onder lichte anesthesie (isoflurane inhalatie). Het harnas wordt over de hele lengte van de staart aangebracht waardoor de gewichtsverdeling ideaal is. De muizen worden voldoende hoog gehangen waardoor de achterpoten de bodem van de kooi niet raken (SOP1). Op deze manier kunnen de muizen in groepjes van 4 gehuisvest worden in 1 rattenkooi.

	Baseline		HS					
Group	1	2	3	6	4	7	5	8
Genotype	MLC- Cre ^{-/-} /GSK- 3β ^{n/n}	MLC- Cre ^{+/-} /GSK- 3β ^{n/n}	MLC- Cre ^{-/-} /GSK- 3β ^{n/n}	MLC- Cre ^{+/-} /GSK- 3β ^{n/n}	MLC- Cre ^{-/-} /GSK- 3β ^{n/n}	MLC- Cre ^{+/-} /GSK- 3β ^{n/n}	MLC- Cre ^{-/-} /GSK- 3β ^{n/n}	MLC- Cre ^{+/-} /GSK- 3β ^{n/n}
HS(days)	-	-	2	2	4	4	7	7
# animals	9	9	9	9	9	9	9	9

HS: hind-limb suspension

Anesthesie en euthanasie: Zie sectie 9.

De drie HS tijdstippen worden nu verder toegelicht:

- Dag 2: Tot en met dag 2 spreken we van de initiatie fase. De signalering leidend tot het atrofieproces wordt op gang gebracht.
- Dag 4: Op dit tijdstip is de intracellulaire atrofiesignalering volop in werking getreden. De afbraakprocessen worden geïnduceerd.
- Dag 7: Op dit tijdstip heeft de signaaltransductie geleid tot meetbare atrofie eindparameters. De afbraak van structurele spiereiwitten is op dit moment meetbaar.

In deze studie is het niet alleen belangrijk om een meetbaar atrofiefenotype te bewerkstelligen (dag 7). Het is tevens belangrijk om verschillen in atrofiesignalering tussen beide genotypes in kaart te brengen. De inductie van signaleringsmoleculen die een rol spelen tijdens atrofie zijn enkel meetbaar tijdens de eerste dagen van het proces (dag 2 en 4).

Isolatie van de achterpootspieren en totaal bloed:

Het bloed zal worden verzameld via een hartpunctie. De spieren van de achterpoot *M. soleus* (S), *M. gastrocnemius* (G), *M. plantaris* (P), *M. tibialis* (T) en *M. extensor digitorum longus* (EDL) zullen worden verzameld volgens een gestandaardiseerd protocol (SOP3). Deze spieren werden gekozen omdat S en G onderhevig zijn aan atrofie in tegenstelling tot P en E (controlespieren). De parameters die zullen worden bepaald op dit materiaal staan beschreven in de appendices.

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

Het staartharnas wordt aan de staart van de muis bevestigd terwijl deze onder een lichte anesthesie wordt gehouden (isoflurane inhalatie) (SOP1).

9b. Pijnbestrijding

Uit ervaring weten we dat het HS protocol geen pijn veroorzaakt. Bijgevolg zal het gebruik van analgetica niet noodzakelijk zijn (zie ook sectie 10).

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

Nadat de dieren het experimentele protocol doorlopen hebben zullen ze worden opgeofferd om vervolgens het totaal bloed en de achterpootspieren te isoleren (SOP 3). De muizen zullen worden ge-euthaniseerd door het induceren van een algemene terminale anesthesie door middel van een i.p. injectie pentobarbital (115mg/kg), gevolgd door een cardiale punctie.

Humane eindpunten: De dieren worden dagelijks gecontroleerd. Verder zal er extra aandacht besteed worden aan het water -en voedsel verbruik. Als het gewichtsverlies meer dan 20% bedraagt, zal het worden ge-euthaniseerd door middel van een i.p. injectie pentobarbital (115mg/kg), alvorens het protocol te beëindigen. Er zal dagelijks veel aandacht besteedt worden aan de algemene gezondheidstoestand en responsiviteit van het dier.

Zorg

10a. Ongerief



In een eerder DEC-protocol (**DEC-2009-074**) waarin de hind-limb suspensie (HS) techniek is toegepast is het ongerief, de gezondheidstoestand en het welzijn van de dieren uitvoerig opgevolgd. Hieruit menen wij te mogen concluderen dat de mate van ongerief mede wordt bepaald door de achtergrond van de muizenstam. Het viel op dat muizen met een C57BL/6 achtergrond veel minder tekenen van stress en ongerief vertoonden (minder verlies van lichaamsgewicht en een hogere voedselinname), waardoor we het ongerief voor de dieren in dit DEC protocol (C57BL/6 achtergrond) schatten op 4 in plaats van 5, zoals eerder was geschat voorafgaand aan **DEC-2009-074**. Daarnaast wordt HS niet voor 14 dagen maar voor maximaal 7 dagen toegepast. De anesthesie, door middel van isoflurane inhalatie, veroorzaakt het minste ongerief. Het ongerief wordt daarom geschat op 02.

Groep	1,2	3-8	
Aard	<i>anesthesie</i>	<i>anesthesie</i>	<i>HS</i>
Duur	10 minuten	10 minuten	2, 4 of 7 dagen
Frequentie	1x (02)	1x (02)	1x (04)
Totaal Ongerief	02	04	

10b. Welzijnsevaluatie

De gezondheidstoestand van de muizen zal dagelijks worden opgevolgd. Tevens zal er logboek worden bijgehouden waarin dagelijks de muizengewichten worden genoteerd. Naast het lichaamsgewicht zal het water -en voedselverbruik ook nauwlettend in de gaten worden gehouden. Het waterverbruik wordt ook gecatalogiseerd. Verder zijn de fysieke activiteit van het dier en het algemene voorkomen (*grooming*) belangrijke parameters die ons in staat stellen de ernst van het protocol in te schatten. Indien nodig worden de dieren handmatig ontdaan van urine/uitwerpselen en/of vuil.

11. Verzorging en huisvesting

De dieren zullen gedurende het hele experiment worden gehuisvest onder standaard omstandigheden (water en voedsel *ad libitum*) in de experimentele eenheid van het CPV. Tijdens het HS-protocol zullen de dieren worden ondergebracht in aangepaste rattenkooien, alsook ondergebracht in de experimentele eenheid van het CPV. Elke rattenkooi zal 4 muizen kunnen accommoderen (zie beschrijving model). De voedsel *pellets* worden binnen het bereik van de dieren over de bodem van de kooi verdeeld. Zowel water als voedsel is *ad libitum* beschikbaar. Het opofferen van de dieren en het verzamelen van het spierweefsel zal in de OK op (ruimte

12. Deskundigheid

Alle bovengenoemde onderzoekers beschikken over een Art. 9 en hebben ruime ervaring met anesthesie en alle aspecten van het HS protocol.

13. Standard Operation Procedures (SOP): zie bijlage (Engelstalig)

Investigation of the role of Glycogen Synthase Kinase-3 β in skeletal muscle atrophy

Parameters that will be determined in skeletal muscle

- *Muscle mass:*

Muscle wet weight will be determined as a measure of muscle mass (SOP3).

- *Muscle specific gene expression:*

To investigate whether muscle mRNA expression is differentially affected during muscle atrophy in L mRNA will be extracted from various hind-limb muscles (soleus, gastrocnemius and plantaris) to compare the expression levels of muscle specific mRNA such as the E3-ligases MuRF1 and Atrogin-1, by Q-PCR.

- *Muscle morphology:*

Skeletal muscle will be assessed for fiber atrophy. Fiber size will be determined as fiber cross sectional area (CSA). FoXO translocation will be evaluated using an immunohistochemical approach.

- *Assessment potential targets of GSK-3 β :*

Protein abundance, cellular localization of FoXO transcription factors, GSK-3 β and p-GSK-3 β will be determined by Western Blotting and immunohistochemical analyses. GSK-3 β activity will also be determined.

SOPs

SOP 1: Tail suspension of the mice

Materials

- adapted mouse cage
- plastic coated iron wires with swivel hook
- 70% ethanol and paper tissue
- 'sport' tape and scissors
- weighing scale (suitable for grams)
- isoflurane anesthesia unit

Method:

1. Measure the body weight of the mouse
2. Anesthetize the mouse lightly using isoflurane
3. Take the mouse out and keep it anesthetized
4. Clean the tail with 70% ethanol
5. Wrap the first piece of tape around the base of the tail once
6. Position the iron wire and wrap the rest of tape 1 around the base of the tail
7. Align the iron wire with the tail, and starting from the top of the tail, wrap a second piece of tape around the tail and wire, all the way down to the base of the tail
8. Allow the mouse to recover from anesthesia, but make sure it will not nibble on the suspension device
9. Attach the swivel hook to the iron rod spanning the cage, and lift the rod until the mouse is raised sufficiently to prevent the hindlimb from touching the cage floor or walls

SOP2: Release from tail suspension

Materials

- 70% ethanol and paper tissues
- scissors
- Anesthesia unit (isoflurane)

Method:

1. Disconnect the swivel hook from the iron rod
2. Anesthetize the mouse lightly
3. Remove the tape from the tail by hand, or use scissors if necessary
4. Clean the tail with 70% ethanol
5. Allow the mouse to recover while monitoring it

SOP3: Euthanasia, blood collection and excising 3 hindlimb muscles

Materials

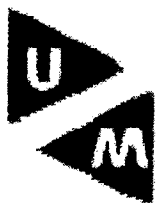
- Surgical equipment; tweezers, scissors
- 70% ethanol and paper tissues
- Pentobarbital
- Cryovials
- Blood collection vials
- OCT
- 1-methyl butane
- Liquid nitrogen

Method:

1. Euthanize the mouse by i.p. injection of 115mg/kg pentobarbital
2. Total blood will be drawn from the mouse by cardiac puncture.
3. make a circumventing incision in the skin around the ankle joint; make sure not to cut the Achilles tendon
4. Make medial incision in the skin of the hindlimb, and remove the skin up to $\pm$ 1cm above the knee joint
5. Remove the upper hindlimb musculature, which covers the lower part of the hindlimb; the gastrocnemius (G) is completely uncovered now
6. Stretch the limb, and cut the Achilles tendon, while holding it with tweezers
7. Pull the muscle down towards the knee joint, while holding the foot
8. Excise the soleus (S) muscle from the G and plantaris (P) complex
9. Excise the GP complex by cutting the 2 tendons connected to the knee joint
10. Excise the P from the G muscle
11. Collect these muscles from both hindlimbs and measure their pared weights
12. For RNA or protein lysate purposes: collect the muscles in cryovials and snap-freeze liquid nitrogen and store at -80°C . For immunohistochemistry: embed the muscles (stretched) in OCT and freeze in 1-methyl butane and store at -80°C
13. Discard the mouse cadaver according to CPV regulations

Relevante literatuur

1. van der Velden JL, Langen RC, Kelders MC, Wouters EF, Janssen-Heininger YM, and Schols AM. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 β activity is sufficient to stimulate myogenic differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;290:C453-62.
2. Bernard S, LeBlanc P, Whittom F, Carrier G, Jobin J, Belleau R, and Maltais F. Peripheral muscle weakness in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:629-34.
3. Gosselink R, Troosters T, and Decramer M. Peripheral muscle weakness contributes to exercise limitation in COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:976-80.
4. Serres I, Gautier V, Varray A, and Prefaut C. Impaired skeletal muscle endurance related to physical inactivity and altered lung function in COPD patients. *Chest* 1998;113:900-5.
5. Schols AM, Slangen J, Volovics L, and Wouters EF. Weight loss is a reversible factor in the prognosis of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:1791-7.
6. Adams GR, and Haddad F. The relationships among IGF-1, DNA content, and protein accumulation during skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol* 1996;81:2509-16.
7. Barton-Davis ER, Shoturma DI, and Sweeney HL. Contribution of satellite cells to IGF-1 induced hypertrophy of skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 1999;167:301-5.
8. Jiang BH, Zheng JZ, and Vogt PK. An essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in myogenic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:14179-83.
9. Jiang BH, Aoki M, Zheng JZ, Li J, and Vogt PK. Myogenic signaling of phosphatidylinositol 3-kinase requires the serine-threonine kinase Akt/protein kinase B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:2077-81.
10. Kaliman P, Canicio J, Shepherd PR, Beeton CA, Testar X, Palacin M, and Zorzano A. Insulin-like growth factors require phosphatidylinositol 3-kinase to signal myogenesis: dominant negative p85 expression blocks differentiation of L6E9 muscle cells. *Mol Endocrinol* 1998;12:66-77.
11. Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R, Nunez L, Stitt TN, Yancopoulos GD, and Glass DJ. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat Cell Biol* 2001;3:1009-13.
12. Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, Zlotchenko E, Scrimgeour A, Lawrence JC, Glass DJ, et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol* 2001;3:1014-9.
13. Cossu G, and Borello U. Wnt signaling and the activation of myogenesis in mammals. *Embo J* 1999;18:6867-72.
14. Ridgeway AG, Petropoulos H, Wilton S, and Skerjanc IS. Wnt signaling regulates the function of MyoD and myogenin. *J Biol Chem* 2000;275:32398-405.
15. Petropoulos H, and Skerjanc IS. Beta-catenin is essential and sufficient for skeletal myogenesis in p19 cells. *J Biol Chem* 2002;277:15393-9.
16. Antos CL, McKinsey TA, Frey N, Kutschke W, McAnally J, Shelton JM, Richardson JA, Hill JA, and Olson EN. Activated glycogen synthase-3 β suppresses cardiac hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:907-12.
17. Mitchell PO, and Pavlath GK. A muscle precursor cell-dependent pathway contributes to muscle growth after atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;281:C1706-15.
18. Hunter RB, Stevenson E, Koncarevic A, Mitchell-Felton H, Essig DA, and Kandarian SC. Activation of an alternative NF-kappaB pathway in skeletal muscle during disuse atrophy. *Faseb J* 2002;16:529-38.
19. Ryves WJ, and Harwood AJ. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 by competition for magnesium. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;280:720-5.
20. Marples D, Christensen S, Christensen EI, Ottosen PD, and Nielsen S. Lithium-induced downregulation of aquaporin-2 water channel expression in rat kidney medulla. *J Clin Invest* 1995;95:1838-45.
21. Bikle DD, Halloran BP, and Morey-Holton E. Impact of skeletal unloading on bone formation: role of systemic and local factors. *Acta Astronaut* 1994;33:119-29.
22. Cappeliez P. Comparing oral lithium carbonate and intraperitoneal lithium chloride chronic administrations on rats' activity levels. *Neuropsychobiology* 1986;16:103-8.
23. van der Velden J, Langen RC, Kelders MC, Wouters ER, Janssen-Heininger Y and Schols AM. Myogenic differentiation during regrowth of atrophied skeletal muscle is associated with inactivation of GSK-3 β . *Am J. Physiol Cell Physiol*, C453-462
24. Caron, A. Z., Drouin, G., Desrosiers, J., Trens, F., Grenier, G. A novel hindlimb immobilization procedure for studying skeletal muscle atrophy and recovery in mouse. *J Appl Physiol*, 106, 2009



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, 02-02-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Investigation of the role of Glycogen Synthase Kinase-3 β (GSK-3 β) in unloading-induced skeletal muscle atrophy*", is op de DEC vergadering van 28 januari 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De duur van de proef op het voorblad is niet juist (dit is de langste periode binnen één project dat één dier in proef is). De DEC verzoekt dit aan te passen.
- De DEC verzoekt de startdatum op het voorblad aan te passen (2010 is reeds voorbij).
- De DEC merkt op dat er niet voldoende onderbouwd is bij punt 3, waarom of er geen alternatieven mogelijk zijn. De DEC deelt mede dat er in 2010 een artikel is verschenen over een mogelijk alternatief voor dit model met referentie: J Appl Physiol. 2009 jun;106(6):2049-59. Epub 2009 Apr 2 "A novel hindlimb immobilization procedure for studying skeletal muscle atrophy and recovery in mouse", Caron AZ, Drouin G, Desrosiers J, Trens F, Grenier G. en verzoekt te verwijzen naar deze referentie.

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 2011-001, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Dierexperimenten Commissie (DEC)
Secretariaat CPV-UM

Your reference Email

Direct line

Maastricht

+31-43-

14/02/2011

DEC projectaanvraag: 'Investigation of the role of Glycogen Synthase Kinase-3 bèta (GSK-
in unloading-induced skeletal muscle atrophy'

Geachte leden van de DEC,

T + 31 4
F + 31 4

Bijgevoegd vindt u een aangepaste versie van de DEC projectaanvraag getiteld:
'Investigation of the role of Glycogen Synthase Kinase-3 bèta (GSK-3 β) in unloading-
induced skeletal muscle atrophy'.

Visiting address

De vragen en opmerkingen die tijdens de DEC vergadering van 28 januari 2011 naar voren
werden geschoven zijn allen beantwoord en gemarkeerd aangeduid in de DEC-aanvraag
(zie bijlage).

Postal address
P.O. Box 5800
6202 MZ Maastricht
the Netherlands

Wij hopen dat u een positief advies zult uitbrengen betreffende onze projectaanvraag.

Hoogachtend, namens onze onderzoeksgroep,

Aan:

*Ons kenmerk**Doorkiesnummer**Maastricht*
07-03-2011

Project: Investigation of the role of Glycogen Synthase Kinase-3 bèta (GSK-3 β) in unloading-induced skeletal muscle atrophy.

DEC-UM
Voorzitter DEC-UM
|
p/a secretariaat DEC-UM

Verantwoordelijk onderzoeker (VO):

Secretariaat DEC-UM
T (04.

Hierbij delen wij U mede dat voornoemd project aan de ethische toetsingscriteria voor proefdiergebruik voldoet.
De DEC maakt geen bezwaar tegen uitvoering van dit project zoals aangevraagd en geeft een **positief advies**.

Bezoekadres

Projectnummer: 2011-001
Diersoort: muis
Aantal dieren: 72
Einddatum: 02-03-2015

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

Vice-Voorzitter DEC-UM