

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM Versie 2006 Herziene versie	DECNR: 2011-140 Ontvangen: 25-11-2011
--	--

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag 2	VROM/GGONR ³	LNV/CBDNR ⁴
16-12-2011	Nieuw	IG 10-012	

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

Deelproject			MaastRO		
-------------	--	--	---------	--	--

Financieel beheerder	Budgetnummer 30943149E
----------------------	------------------------

Titel van het onderzoek:

Leidt blootstelling aan hypoxie tot activering van Notch signalering?

startdatum 1 Januari 2012
 einddatum ⁹ 1 Januari 2016
 Duur van de proef¹⁰: 12 maanden

Naam	Tel (+ Tel privé enkel VO, VVO en VM)	E-mailadres	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	
5.			Art.9	
			Art. 9	

Diergroep	1	2	-	-	-	-	-
ctrl/exp/sham	Exp	Exp					
Diersoort	01	01					
Stam	C57BL/6	C57BL/6					
Construct / mutatie ?	N1-Cre/+; R26R-EYFP	N1-Cre/+; R26R-EYFP					
Herkomst (leverancier) *	02	02					
Aantal	2	24					
Geslacht	m/v	m/v					
Dieren immuuncompetent ?	Ja	Ja					
Leeftijd/gewicht	8w, 30 - 35g	8w, 30 - 35g					
Doel van de proef *	10	30					
Belang van de proef *	01	01					
Toxicologisch onderzoek *	01	01					
Bijzondere technieken *	02	01					
Anesthesie *	01	01					
Pijnbestrijding *	01	01					
Mate ongerief *	03	03					
Toestand dier einde exp*	01	01					

* VHI-coderingen zie bijlage

1 Verantwoording

Aanvraag dierproef DEC-UM (kaders zijn licht flexibel, maar het geheel is max. 5 pag. versie 2006)
Titel: Leidt blootstelling aan hypoxie tot activering van Notch signalering?

1. Doel van de proef.

Notch signalering is zeer geconserveerd in eukaryoten en essentieel tijdens de ontwikkeling en het in stand houden van volwassen weefsels en organen. Notch signalering zorgt voor het in stand houden hiervan door receptor-ligand interacties tussen nabijgelegen cellen. Wanneer er fouten optreden tijdens dit proces doordat de Notch signalering verstoord is kan dit leiden tot defecten in de ontwikkeling en kanker. Zo is de Notch signalering verstoord in verschillende humane kankertypen, waardoor Notch een belangrijke kandidaat kan zijn voor het bestrijden van verschillende soorten kanker.

Een andere factor die ook zowel tijdens de **ontwikkeling als bij tumorvorming** van belang is is hypoxie (lage zuurstof). Sommige processen tijdens de ontwikkeling vinden plaats in gebieden van lage zuurstof. Daarnaast is bekend dat hypoxie een rol speelt tijdens de vorming van nieuwe bloedvaten. Verder is hypoxie ook een belangrijk kenmerk van (solide) tumoren, ten gevolge van een snelle groei en slechte bloedvoorziening. Zo is bekend dat hypoxische tumoren minder gevoelig zijn voor klassieke therapie, zoals bestraling en chemotherapie, en is er overtuigend bewijs dat **hypoxische tumoren een slechtere prognose geven voor de patient.**

Op het niveau van celweefsel is aangetoond dat er een interactie bestaat tussen hypoxie en Notch signalering. Zo blijkt dat wanneer (tumor-)cellen blootgesteld worden aan hypoxie dit leidt tot een verhoogde Notch signalering, wat leidt tot meer agressievere cellen. Verder is Notch signalering belangrijk gebleken bij de vorming van nieuwe bloedvaten in respons op lage zuurstof, wat ook duidt op een interactie tussen hypoxie en Notch signalering. **Verder zijn zowel Notch als Hypoxie signalering ook belangrijk voor het in stand houden van stam cellen.** Echter, er is niks bekend over de activering van Notch signalering door hypoxie in normale weefsels en in welke specifieke celtypen.

Het doel van deze (pilot)-studie is:

Bepalen of lage zuurstof leidt tot activering van de Notch signalering in normale weefsels en het identificeren van de **specifieke cel typen waarin dit gebeurt.**

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang



Zowel de expressie van Notch als hypoxie zijn factoren die belangrijk zijn tijdens de ontwikkelingsbiologie, het in stand houden van normale weefsels en tumor biologie. Door meer inzicht te krijgen in de interactie tussen deze componenten verkrijgt men een beter inzicht in zowel de normale als ook de tumor biologie. Een beter begrip van de complexe interacties in gezonde weefsels die ook van belang zijn in tumoren kan uiteindelijk bijdragen aan betere therapieën tegen ziekten zoals kanker, en eventueel ook voor andere ziekten.

3. Alternatieven

In ieder weefsel vinden er verschillende complexe interacties plaats die *in vitro* niet kunnen worden nagebootst. Om te kunnen bepalen of hypoxie in gezonde/normale weefsels een effect heeft op Notch signalering en de complexiteit van weefsels in ogenschouw te nemen zal er dus gebruik gemaakt moeten worden van een model waarbij deze interacties plaats vinden in **een levend gewerveld organisme.**

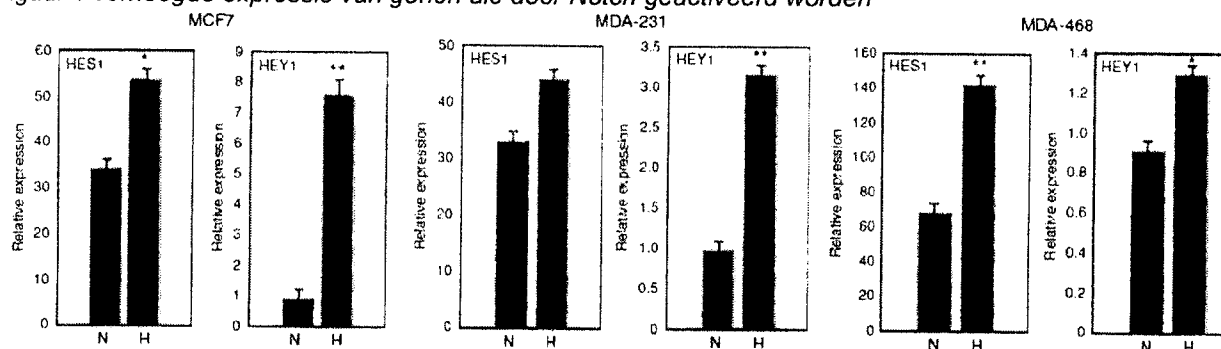
4. Ethische afweging

In deze studie wordt gemiddeld een ongerief van 3 (matig) verwacht. Tijdens de experimenten wordt gestreefd naar een minimalisatie van pijn en lijden. Naar onze mening weegt het belang van dit onderzoek zwaarder door dan het veroorzaakte ongerief omdat uiteindelijk dit soort onderzoek kan leiden tot een betere begrip van de complexe interacties die optreden in zowel gezonde als tumor weefsels. Deze inzichten kunnen uiteindelijk bijdragen aan betere behandelingen.

5. Wetenschappelijke onderbouwing

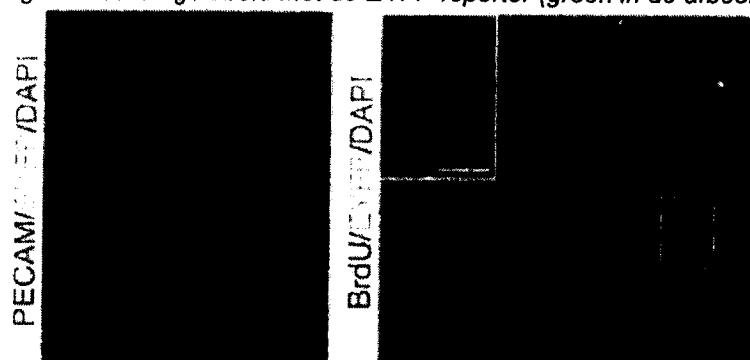
Uit eerdere studies die gedaan zijn in celwee is gebleken dat wanneer verschillende (kanker) cel typen blootgesteld worden aan hypoxie dit leidt tot een verhoogde expressie van verschillende componenten van de Notch signalering. Zo blijkt uit deze studie dat onder hypoxie zowel de Notch receptoren, als de liganden voor deze Notch receptoren een hogere expressie vertonen. Daarnaast blijken ook de zogenaamde target genen die geactiveerd worden door Notch signalering een hogere expressie te vertonen na blootstelling aan hypoxie (1), zoals te zien in figuur 1. Dit betekent dat de verschillende componenten van de Notch signalering zowel meer aanwezig zijn en daarnaast ook actiever zijn. Naast een verhoogde Notch signalering leidt deze interactie tussen hypoxie en Notch in deze kanker cellen vervolgens ook nog eens tot een agressievere fenotype, waarbij cellen een grotere capaciteit hebben om te migreren (2), wat samenhangt met het uitzaaien van kanker *in vivo*.

Figuur 1 verhoogde expressie van genen die door Notch geactiveerd worden



In deze studie is het doel om te kijken of hypoxie bijdraagt aan de activiteit van de Notch signalering. Om dit te kunnen bepalen hebben we een methode nodig om te kijken naar de activering van Notch in de verschillende weefsels. Hiervoor maken we gebruik van NIP:cre (3) muizen die gekruist zijn met ROSA26R-EYFP muizen (4) wat leidt tot NIP:cre;R26R-EYFP muizen. Bij deze muizen leidt activering van de Notch signalering tot activering van het CRE recombinase, waardoor de reporter, in dit geval YFP, afgeschreven zal worden. Dit betekent dat alle cellen die Notch activering ondervonden hebben gelabeld zullen worden met YFP, zoals te zien in figuur 2. Deze YFP reporter kan vervolgens zichtbaar gemaakt worden in coupes van de verschillende weefsels middels fluorescentie microscopie.

Figuur 2 cellen gelabeld met de EYFP reporter (groen in de afbeelding)



Het doel van deze studie is: om te bepalen of lage zuurstof bijdraagt aan de activering van Notch signalering.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Dit DEC protocol is wetenschappelijk beoordeeld door de _____ (Lab Leadership Team) onder leiding van _____ in en vervolgens goedgekeurd. De principal investigator van dit project vanuit _____ is _____

3 Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Muis, C57BL/6, NIP1-cre/+;R26R-EYFP (3,4).

Deze muizen zijn gekozen omdat in deze muizen Notch activering zichtbaar gemaakt kan worden in weefsels middels visualisatie van het fluorescente eiwit YFP. Na activering van Notch vindt er Cre gemedieerde deletie in R26R muizen plaats welke irreversibel is. Dit betekent dat alle cellen die Notch activering hebben ondergaan en de afgeleide cellen hiervan gelabeld zijn met YFP. Op deze manier kan er in kaart worden gebracht waar Notch activering heeft plaatsgevonden in de muis. Aangezien in de NIP1-cre/+ muizen het andere allel niet gemodificeerd is zullen deze muizen fenotypisch volledig normaal zijn. De hier voor gestelde experimenten betreffen dus een gedetailleerde immunohistochemische analyse van verschillende weefsels van volwassen muizen voor Notch signalering na blootstelling aan lage zuurstof.

De dieren zullen geleverd worden door een van de reguliere UM leveranciers).

De muizen zullen aan het einde van het experiment opgeofferd worden, en dus niet worden hergebruikt.

7b. Sexe

Voor onze experimenten is de sexe van de muizen niet van belang.

7c. Aantallen

Doelstelling 1: Optimaliseren van experimentele condities en protocollen

Voor deze doelstelling vragen we een zo klein mogelijk aantal proefdieren van 2 om voor de verschillende weefsels de verschillende experimentele protocollen te vergelijken. Hierbij is vooral de manier van weefsel fixatie van belang na het opofferen van de dieren, aangezien dit gevolgen kan hebben voor de latere immunohistochemische analyse. **Zo werken sommige immunohistochemische kleuringen alleen op vriescoupes, waar andere kleuringen juist werken op paraffine coupes. Vandaar dat we eerst onze experimentele procedure willen testen alvorens de eigenlijke proef te beginnen. Deze immunohistochemische analyse is dan ook de uitlees parameter van dit experiment.**

In totaal vragen we 2 proefdieren voor deze doelstelling.

Doelstelling 2: Bepalen of lage zuurstof bijdraagt aan de activiteit van Notch signalering

Voor deze doelstelling vragen we op basis van een beoogd verschil van 30 % en een variabiliteit van 18 %, rekening houdend met een power van 80 % en een uitvalspercentage van 20 %, 7 proefdieren aan ($N = 5.652$ zonder en 7,07 met uitvalspercentage) per behandelgroep. **De uitleesparameter voor dit experiment is een immunohistochemische analyse van de verschillende weefsels om Notch activering te beoordelen.**

In totaal vragen we voor deze doelstelling 8 (proefdieren per behandelgroep) x 3 (verschillende behandelgroepen) = 24 proefdieren

In totaal vragen we voor deze studie $2 + 24 = 26$ proefdieren

4 Dierproef

8. Experiment

Algemeen:

Alle experimenten beschreven in dit onderzoek gebeuren rekening houdende met de code of practice met betrekking tot dierproeven binnen kankeronderzoek (5). Eveneens werden de humane eindpunten op basis van dit document beargumenteerd.

NIP:Cre ROSA26-EYFP muizen worden 5 dagen blootgesteld aan lage zuurstof ademen door de concentratie zuurstof geleidelijk te verlagen van 21 % naar 8 %. De eerste dag zal de concentratie verlaagd worden van 21 % naar 12 %, de volgende dag naar 10 % en uiteindelijk op de derde dag naar 8 % (conform DEC 2008-154 van **waarna nog 2 dagen blootstelling aan 8 % volgt.** Vervolgens wordt er direct (op dag 5) of twee weken later (op dag 19), na opoffering gekeken in welke weefsels lage zuurstof ademen heeft geleid tot activering van Notch signalering. Verder wordt er gekeken of er een correlatie bestaat tussen de hypoxische gebieden en de gebieden waar Notch signalering geactiveerd wordt, met andere woorden of dit op dezelfde plaats gebeurt binnen een weefsel. **Hier toe zal er een uur voor opoffering zowel een marker voor hypoxie (pimonidazole 60 mg/kg) en een marker voor proliferatie (BrdU 30 mg/kg) intraperitoneaal worden geïnjecteerd. Een minuut voor opoffering zal er een marker voor perfusie/vaatdoorbloeding (15mg/kg) worden geïnjecteerd.** Door de proefdieren direct na de behandeling op te offeren of 2 weken later kan er een onderscheid gemaakt worden tussen korte en lange termijn effecten van blootstelling aan hypoxie.

In deze studie willen we bepalen of hypoxie bijdraagt aan de activering van de Notch signalering. Om dit te bepalen zullen de proefdieren opgedeeld worden in 3 groepen (groep 2, 3 en 4), elk met een eigen behandeling. **Groep 1 zal niet aan een behandeling worden blootgesteld, maar zal dienen ter optimalisatie van de experimentele procedure. Nadat de experimentele procedure geoptimaliseerd is, na het succesvol afronden van doelstelling 1, zal er vervolgd worden met doelstelling 2, groep 2, 3 en 4.**

Groep 1 Deze proefdieren worden niet aan een behandeling blootgesteld, maar worden gebruikt voor optimalisatie van de experimentele procedure en protocollen. Deze dieren worden opgeofferd na aankomst voor optimalisatie van de analyse. **Deze dieren zullen net zoals de overige groepen wel geïnjecteerd worden met de markers voor hypoxie, proliferatie en perfusie.**

Groep 2 wordt behandeld onder normale zuurstof (21%) condities.

Groep 3 wordt blootgesteld aan lage zuurstof ademen gedurende een totaal van 5 dagen. Hierbij wordt de zuurstofconcentratie geleidelijk verlaagd van 21 % naar 8 % in 3 dagen en blijft deze op 8 % in de twee daaropvolgende dagen. Hierdoor zal de zuurstofopname in de verschillende weefsels af nemen. Deze groep zal op dag 5 opgeofferd worden.

Groep 4 wordt blootgesteld aan lage zuurstof ademen gedurende een totaal van 5 dagen. Hierbij wordt de zuurstofconcentratie geleidelijk verlaagd van 21 % naar 8 % in 3 dagen en blijft deze op 8 % in de twee daaropvolgende dagen. Hierdoor zal de zuurstofopname in de verschillende weefsels af nemen. Deze groep zal 2 weken na de blootstelling aan lage zuurstof ademen (op dag 19) opgeofferd worden.

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

In deze studie wordt er geen gebruik gemaakt van anesthesie.

9b. Pijnbestrijding

De procedures beschreven in deze studie veroorzaken geen significante pijn. De intraperitoneale en intraveneuze injecties zullen naar verwachting geen pijn met zich meebrengen.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

De muizen zullen aan het eind van het experiment ge-euthanaseerd worden onder verdoving met sodium pentobarbital (120 mg/kg) middels een intraperitoneale injectie gevolgd door cervicale dislocatie.

Humane eindpunten waarbij euthanasie gebeurd zijn ziekte (vast te stellen door onderzoeker, proefdierversorger), sterke vermagering (> 20%/dag of >10% totaal tijdens de studie) of dyspnee.

Aangezien er mogelijk gewichtsverlies op kan treden door lage zuurstof ademen zal het gewicht van de muizen regelmatig (iedere 2/3 dagen) gecontroleerd worden en bij gehouden worden in het ongerieflogboek.

10a. Ongerief



Gering	= 01
Gering/matig	= 02
Matig	= 03
matig/ernstig	= 04
Ernstig	= 05
Zeer ernstig	= 06

Lage zuurstofconcentratie ademen (matig = 03, 5 dagen, 1x, doelstelling 2): Door het ademen van gereduceerde hoeveelheid zuurstof kan het proefdier ofwel sneller gaan ademen ofwel dieper gaan ademen. Het ongerief dat wordt veroorzaakt is bij eenmalige blootstelling 02 (gering/matig). Echter omdat het proefdier 5 dagen achtereenvolgens wordt blootgesteld verhogen we de ongeriefscore naar 03 (matig).

Injectie pimonidazole/BrdU (gering/matig = 02, 1x, doelstelling 1 en 2)

Een uur voor het euthanaseren van de dieren wordt door middel van een i.p. injectie pimonidazole (60 mg/kg) en BrdU (30 mg/kg) toegediend.

Injectie Hoechst (matig = 03, 1x, doelstelling 1 en 2)

1 minuut voor euthanaseren wordt door middel van een i.v. injectie t 33342 (15 mg/kg) toegediend.

Injectie sodium Pentobarbital (gering/matig = 02, 1x, doelstelling 1 en 2)

Vlak voor euthanaseren wordt door middel van een i.p. injectie sodium pentobarbital (120 mg/kg) toegediend

In onderstaand schema zijn alle handelingen met hun ongeriefscore, duur en frequentie weergegeven

Doelstelling 1

Groep 1

Aard	Ernst	Duur	Frequentie
Injectie pimonidazole/BrdU	02 gering / matig	Ip injectie, pimonidazole 60mg/kg, BrdU 30mg/kg	1x
Injectie	03 matig	Iv injectie, 15mg/kg	1x
Injectie sodium pentobarbital	02 gering / matig	Ip injectie, 120 mg/kg	1x
Totaal ongerief	03 matig		

Doelstelling 2

Groep 2

Aard	Ernst	Duur	Frequentie
Injectie pimonidazole/BrdU	02 gering / matig	Ip injectie, pimonidazole 60mg/kg, BrdU 30mg/kg	1x
Injectie	03 matig	Iv injectie, 15mg/kg	1x
Injectie sodium pentobarbital	02 gering / matig	Ip injectie, 120 mg/kg	1x
Totaal ongerief	03 matig		

Groep 3

Aard	Ernst	Duur	Frequentie
Lage zuurstof concentratie ademen	03 matig	5 dagen	1x
Injectie pimonidazole/BrdU	02 gering / matig	Ip injectie, pimonidazole 60mg/kg, BrdU 30mg/kg	1x
Injectie hoechst	03 matig	Iv injectie, 15mg/kg	1x
Injectie sodium pentobarbital	02 gering / matig	Ip injectie, 120 mg/kg	1x
Totaal ongerief	03 matig		

Groep 4

Aard	Ernst	Duur	Frequentie
Lage zuurstof concentratie ademen	03 matig	5 dagen	1x
Injectie pimonidazole/BrdU	02 gering / matig	Ip injectie, pimonidazole 60mg/kg, BrdU 30mg/kg	1x
Injectie	03 matig	Iv injectie, 15mg/kg	1x
Injectie sodium pentobarbital	02 gering / matig	Ip injectie, 120 mg/kg	1x
Totaal ongerief	03 matig		

10b. Welzijnsevaluatie

Een welzijnsevaluatie (ongerieflogboek) wordt bijgehouden. Hierbij zal er met name gelet worden op gewichtsverlies ten gevolge van de blootstelling aan lage zuurstof.

11. Verzorging en huisvesting

Zowel de diervverzorgers van het CPV als de onderzoekers verzorgen de dieren. Op deze wijze is het toezicht op en het welzijn van de dieren gewaarborgd. De proefdieren zullen worden gehuisvest in de experimentele afdeling, in groepen van max 3. Water en voedsel worden verstrekt ad libitum. Kooien worden volgens de standaardregels onderhouden. In het geval van calamiteiten contact opnemen met VO () of VVO

12. Deskundigheid

De experimenten zullen hoofdzakelijk worden uitgevoerd door een art. 9. Verdere zullen er drie mensen met art 9 en een art 12 meehelpen aan het experiment, allen met jaren ervaring.

13. Standard Operation Procedures (SOP)**Lage zuurstof concentratie ademen**

Muizen worden geplaatst in een hypoxie box. Vervolgens wordt in deze hypoxie box de zuurstof concentratie stapsgewijs verlaagd van 21 % naar 8 %. Op dag 1 wordt de concentratie verlaagd van 21 naar 12 %, de dag erna naar 10 % en op dag 3 naar 8 %. Vervolgens blijft de zuurstofconcentratie in de hypoxie box 8 % tot en met dag 5.

Relevante literatuur

- 1) Chen et al, 2010, BJC 102(2), 351 - 360
- 2) Sahlgren et al, 2008, PNAS 105(17), 6392 - 6397
- 3) Vooijs et al, 2007, development 134, 535 - 544
- 4) Liu et al, 2011, JCI 134(2), 800 - 808
- 5) Code of Practice: dierproeven in het kankeronderzoek. Inspectie W&V

Form 5-1

i Science Institute
OUTGOING MATERIAL TRANSFER AGREEMENT

Instructions: Please replace the areas in red with the appropriate information and then delete this area before submitting to Recipient and the Brain Science Promotion Division.

This Material Transfer Agreement (hereafter "MTA") is effective on the date of the latter of the two authorized signatures of parties. The parties of this agreement are:

PROVIDER: i Science Institute

Provider's Scientist: _____
 Laboratory: _____
 Provider's Laboratory Head: _____

RECIPIENT: Institution receiving the Original Material. **Maastricht University Medical Center+**
 Recipient's Scientist: _____
 Laboratory: _____

PROVIDER agrees to transfer to **RECIPIENT** the following Original Material:
 mKO2-hCdt1(30/120) / pCSII-EF-MCS (lentivirus vector)
 mAG-hGeminin(1/110) / pCSII-EF-MCS (lentivirus vector).

The **RECIPIENT** shall use the Original Material for: See "Intended use of requested material".

I. Definitions

MATERIAL: Original Material plus Progeny and Unmodified Derivatives. The **MATERIAL** shall not include (i) Modifications or (ii) other substances created by the **RECIPIENT** through the use of the **MATERIAL** which are not Progeny or Unmodified Derivatives.

Progeny: unmodified descendant from the **MATERIAL**, such as virus from virus, cell from cell, or organism from organism.

Unmodified Derivatives: substances created by **RECIPIENT** which constitute an unmodified functional sub-unit or an expression product of the Original Material. Some examples include: subclones of unmodified cell lines, purified or fractionated sub-sets of the Original Material, proteins expressed by DNA/RNA supplied by Provider, monoclonal antibodies secreted by a hybridoma cell line, sub-sets of the Original Material such as novel plasmids or vectors.

Modifications: substances created by **RECIPIENT** which contain/incorporate the **MATERIAL** (Original Material, Progeny or Unmodified Derivatives).

II. Terms and Conditions of Agreement

1. The **MATERIAL** is the sole property of **PROVIDER** and is to be used by **RECIPIENT** solely for not-for-profit research at **RECIPIENT's** institution and only under the direction of the Recipient's Scientist for the research described within this MTA. The **MATERIAL** may not be used in human subjects or in clinical trials involving human subjects without the written permission of **PROVIDER**.

Outgoing Material Transfer Agreement (Form 4-1)

2. The Recipient's Scientist agrees not to transfer the MATERIAL to any third party without the prior written consent of PROVIDER.
3. Under no circumstance may the MATERIAL's gene sequence corresponding to fluorescence protein be modified in any way.
4. RECIPIENT shall keep confidential any or all information marked "CONFIDENTIAL" that is received from PROVIDER and related to the MATERIAL including oral discussions if they are reduced to writing within thirty (30) days and are marked "CONFIDENTIAL".
5. (a) Except as expressly provided in this Agreement, no rights are provided to RECIPIENT under any patents, patent applications, or other proprietary rights of PROVIDER.
(b) RECIPIENT shall supply PROVIDER's Scientist with a written report about research results related to the MATERIAL as outlined in the Research Plan, if requested.
(c) RECIPIENT agrees to acknowledge PROVIDER's Scientist and Dr. Hiroyuki Miyoshi (the developer of pCSII-EF-MCS) in all oral presentations and written publications as related to the MATERIAL and provide a copy of the publication to the PROVIDER's Scientist.
6. The provision of the MATERIAL to RECIPIENT shall not alter any preexisting right to the MATERIAL by a third party.
7. Any MATERIAL delivered pursuant to this Agreement is understood to be experimental in nature and may have hazardous properties. PROVIDER MAKES NO REPRESENTATIONS AND EXTENDS NO WARRANTIES OF ANY KIND, EITHER EXPRESSED OR IMPLIED. THERE ARE NO EXPRESS OR IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, OR THAT THE USE OF THE MATERIAL WILL NOT INFRINGE ANY PATENT, COPYRIGHT, TRADEMARK, OR OTHER PROPRIETARY RIGHTS.
8. Except to the extent prohibited by law, RECIPIENT assumes all liability for damages which may arise from its use, storage or disposal of the MATERIAL. PROVIDER will not be liable to RECIPIENT for any loss, claim or demand made by RECIPIENT, or made against RECIPIENT by any other party, due to or arising from the use of the MATERIAL by RECIPIENT, except to the extent caused by the gross negligence or willful misconduct of PROVIDER.
9. RECIPIENT agrees to use the MATERIAL in compliance with all applicable statutes and regulations.
10. The MATERIAL is provided at no cost, or with an optional fee to reimburse the PROVIDER for its preparation and shipping costs.

Fee for MATERIAL: _____ 0

11. This MTA constitutes the entire agreement between the PROVIDER and RECIPIENT concerning the MATERIALS and supersedes any prior understanding or written or oral agreement.

The preceding constitutes the entire MTA and is followed by the Research Plan drawn up under this Agreement for reference.

Each party shall sign two (2) identical copies of this MTA, one of which shall be kept by PROVIDER and one by RECIPIENT.

SIGNATURES BELOW

AGREED:

PROVIDER

Provider's Scientist

Institute:

Address:

Authorized Official:

Title: Director, Research Resources Center

Name:

Title: Laboratory Head

Signature:

Signature:

Date:

Date:

RECIPIENT

Recipient's Scientist

Institute:

Address:

Authorized Official:

Title:

Name:

Title:

Signature:

Signature:

Date: 6-10-11

Date: 6-10-11

Recipient's Laboratory Head

Name:

Title:

Signature:

Date: 6-10-11

By signing, I indicate that I have read and understood the terms outlined in this MTA and agree to abide by them regarding use of the MATERIAL.

Intended use of requested material

Name:

Affiliation: Maastricht University Medical Center +

The fucci reagents will be to transfect mammalian cell lines and study the effect of hypoxia and radiotherapy on cell cycle distribution and to evaluate signaling pathways that modify these effects.



University Maastricht

Faculty of Health, Medicine
and Life Sciences

Dierexperimenten Commissie

DEC

Aan:

1, voorzitter
p/a Secretariaat DEC-UM
Postbus 616
NL-6200 MD Maastricht
Telefoon: 0-

Uw referentie:

Onze referentie :

Maastricht, 26-10-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Leidt blootstelling aan hypoxie tot activering van Notch signalering?*", is op de DEC vergadering van 21 oktober 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De DEC verzoekt op het voorblad de codes aanpassen, te weten: wanneer de code voor bijzondere technieken 02 is, dienen de codes eronder 01 te zijn. De code van het doel van de proef van de 2 experimenten verschillen, graag aanpassen! Wat is de code voor de anesthesie van beide groepen, graag juiste code vermelden, dit moet in overeenstemming zijn met 9a.
- 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 (19 dg).
- Punt 1- De DEC verzoekt het laatste stukje, van de laatste zin van de 2^e alinea, aan te passen (tumoren geven een slechtere prognose voor de patiënt).
- De DEC verzoekt bij punt 7c de uitleesparameter te vermelden.
- Groep 1- punt 8- Het nut en het exact beoogde doel en de aard van de handelingen van experiment 1 zijn niet duidelijk en consistent in de verschillende onderdelen van het DEC protocol. De DEC verzoekt dit te verduidelijken en aan te passen.
- Groep 1- punt 8- De DEC verzoekt de eerste zin in overeenstemming te brengen met punt 10a en het voorblad conform aan te passen.
- Gezien de permanente aard van de recombinate, raadt de DEC aan dit experiment gefaseerd op te zetten, te beginnen met het langdurige experiment (hypoxiebehandeling - groep 4).
- De DEC stelt vast dat op basis van de protocollen van _____ moet worden uitgegaan van een uitvalspercentage van 20% en het lichaamsgewicht regelmatig vastgesteld moet worden (in verband met mogelijke reductie).

Conclusie:

Het project wordt aangehouden.

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 2011-140, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

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

L.S.

Naar aanleiding van uw brief van 26 – 10 – 2011 met het verzoek om aanpassingen te maken

Maastricht, 25-11-2011

en verduidelijking te geven over DEC protocol 2011 – 140 (*Leidt blootstelling aan hypoxie tot activering van Notch signalering?*) vindt u hieronder ons antwoord op uw vragen. Bijgaand tevens ons aangepaste DEC protocol en voorblad.

- De DEC verzoekt op het voorblad de codes aanpassen, te weten: wanneer de code voor bijzondere technieken 02 is, dienen de codes eronder 01 te zijn. De code van het doel van de proef van de 2 experimenten verschillen, graag aanpassen! Wat is de code voor de anesthesie van beide groepen, graag juiste code vermelden, dit moet in overeenstemming zijn met 9a.
De codes vermeld op het voorblad zijn aangepast. De codes voor het doel van de proef zijn nu dezelfde en verder is de code voor anesthesie in overeenstemming met met punt 9a gemaakt.
- 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 (*19 dg*).
Dit is aangepast naar 19 dagen.
- Punt 1- De DEC verzoekt het laatste stukje, van de laatste zin van de 2^e alinea, aan te passen (tumoren geven een slechtere prognose voor de patiënt).
Deze zin is aangepast conform het advies van de DEC.
- De DEC verzoekt bij punt 7c de uitleesparameter te vermelden.
De uitleesparameter (immunohistochemische analyse) is toegevoegd.
- Groep 1- punt 8- Het nut en het exact beoogde doel en de aard van de handelingen van experiment 1 zijn niet duidelijk en consistent in de verschillende onderdelen van het DEC protocol. De DEC verzoekt dit te verduidelijken en aan te passen.
In de DEC zijn aanpassingen gemaakt die het doel van de proef verduidelijken. Verder zijn de handelingen voor deze groep uitgebreider beschreven en is er gelet op consistentie voor de beschrijving van deze groep. Kort samengevat is het doel van dit

Maastricht University Medical Center
University of Maastricht

P.O. Box 616, 6200 MD, Maastricht
Phone: +31 - 43 - 386 2111 Fax: +31 - 43 - 386 2112
E - mail: info@umc.maastricht.nl
Web: www.umc.maastricht.nl

experiment het optimaliseren van de experimentele procedures rondom de proef, aangezien er geweten is dat er voor verschillende immunohistochemische analyses verschillende experimentele protocollen vereist zijn.

- Groep 1- punt 8- De DEC verzoekt de eerste zin in overeenstemming te brengen met punt 10a en het voorblad conform aan te passen.

Bij punt 8 groep 1 zijn de handelingen zoals vermeld in punt 10a beschreven. Verder is de ongeriefscore op het voorblad aangepast conform punt 10a.

- Gezien de permanente aard van de recombinatie, raadt de DEC aan dit experiment gefaseerd op te zetten, te beginnen met het langdurige experiment (hypoxiebehandeling - groep 4).

De reden waarom wij het experiment juist niet gefaseerd willen opzetten is omdat we de experimentele condities gelijk willen houden. Zo kunnen er schommelingen in de zuurstof niveau's plaatsvinden in de zogenaamde hypoxische incubatie kisten. Om ervoor te zorgen dat groep 3 en groep 4 aan dezelfde behandeling worden blootgesteld (met dezelfde schommelingen in zuurstof niveau) is het daarom van belang deze twee groepen op hetzelfde moment bloot te stellen aan de lage zuurstof. Alleen op deze manier kan geëvalueerd worden wat de verschillen zijn tussen de lange en korte termijn effecten van blootstelling aan lage zuurstof ademen.

- De DEC stelt vast dat op basis van de protocollen van moet worden uitgegaan van een uitvalspercentage van 20% en het lichaamsgewicht regelmatig vastgesteld moet worden (in verband met mogelijke reductie).

Het uitvalspercentage is aangepast naar 20 % (zie punt 7c) en verder is er in de DEC opgenomen dat het lichaamsgewicht van de muizen regelmatig gecontroleerd zal worden.

Met vriendelijke groet,

Maastricht University Medical Center
University of Maastricht

P.o. Box 616, 6200 MD, Maastricht
Phone: +31 - 43 - Fax: +31 - 43 -

E - mail:

Web

Aan:

*Ons kenmerk**Doorkiesnummer**Maastricht*
19-12-2011

*Project: Leidt blootstelling aan hypoxie tot activering van Notch
signalering?*

DEC-UM
Voorzitter DEC-UM

Verantwoordelijk onderzoeker (VO):

p/a secretariaat DEC-UM

Secretariaat DEC-UM

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

Bezoekadres

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

Postadres
Postbus 616
6200 MD Maastricht

Projectnummer: 2011-140

Diersoort: muis

Aantal dieren: 26

Einddatum: 16-12-2015

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