

119

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

Versie 2006

Herziene versie

DECNR: 2011-003

Ontvangen: 26-05-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag ₂
24-06-2011	Nieuw

VROM/GGONR ³
nvt

LNV/CBDNR⁴

Hoofdproject	X	1	Hersenen en gedrag		Ander UM	Geen UM
--------------	---	---	--------------------	--	----------	---------

Deelproject	2.	1. 2. 3. 4.	1. 2. 3.	1. 2. 3.		
-------------	----	-------------	----------	----------	--	--

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

Budgetnummer 3098.2.263N

Titel van het onderzoek:

Rescue of cardiac hypertrophy by knockout of microRNA-199a and microRNA-214

startdatum January 2011

einddatum⁹ January 2012

Duur van de proef¹⁰: 1 day

	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					
4. overige uitvoerenden					
5.					

Diergroep	1	2	3	4	5	6	
ctrl/exp/sham	Exp1	Exp2					
Diersoort	02	02					
Stam	Wistar	Wistar					
Construct / mutatie ?	-	-					
Herkomst (leverancier) *	01	01					
Aantal	40	320					
Geslacht	female	Female/male					
Dieren immuuncompetent ?	Yes	Yes					
Leeftijd/gewicht	pregnant	Neonatal (3 days)					
Doel van de proef *	37	37					
Belang van de proef *	01	01					
Toxicologisch onderzoek *	01	01					
Bijzondere technieken *	01	02					
Anesthesie *	01	01					
Pijnbestrijding *	01	01					
Mate ongerief *	01	02					
Toestand dier einde exp*	02	01					

* VHL-coderingen zie bijlage

1 Verantwoording

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

Titel: Rescue of cardiomyocyte hypertrophy by knockout of microRNA-199a and microRNA-214

1. Doel van de proef.

It has already been shown that single microRNAs can regulate genes that play important roles in progression to heart failure. Previously acquired array data in our lab showed that microRNA-199a and microRNA-214 is upregulated in failing human and mouse hearts compared to the controls. The hypothesis in this project is that downregulation of microRNA-199a and microRNA-214 can prevent hypertrophy by upregulation of PPAR β protein levels.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang



In the western world heart failure has the highest mortality and morbidity of all diseases, which puts great strain on our societies, both from an economical as well as a medical point of view. Therefore, it is of enormous importance to gain better insight in the (molecular) mechanisms that drive myocardial pathogenesis, which may help discovering novel therapeutic treatments.

3. Alternatieven

This study deals with heart remodelling and its physiological function. There are up to date no cell lines in culture that can provide the type of information that we investigate. In our lab we use neonatal rat cardiomyocytes because these cells can be kept in culture for a few days, which is just enough to perform all experiments we need.

4. Ethische afweging

Heart failure is a leading cause of morbidity and mortality in the Western world. In the Netherlands, 45.000 people die each year because of cardiovascular diseases (approximately 120 per day). Many research efforts in the past decade have focused on the identification of the molecular pathways that mediate progressive cardiac remodeling. However, progress in developing new heart failure therapies has been impaired by an incomplete comprehension of the signaling events underlying cardiac hypertrophy and failure. The scientific profit and potential clinical application justify the use of these animals to achieve the above mentioned study goals especially because human and cellular alternatives are not an option.

2 Wetenschap

5. Wetenschappelijke onderbouwing.

Heart failure is a disease with a high mortality and an increasing incidence and prevalence. Neonatal cardiac myocytes are terminally differentiated and thus unable to divide, and respond to growth stimuli by individual growth (hypertrophy) or by death (cell death or apoptosis). Hypertrophy is the most significant risk factor for developing heart failure. Therefore, a better fundamental understanding of the molecular signals that drive the hypertrophic response of the cardiac muscle will provide better insight into the particulars of heart failure, and may have significant therapeutic consequences for clinical management of heart failure patients.

The aim of this study is to investigate the role of microRNA-199a and microRNA-214 in posttranscriptional regulation of PPAR β (Peroxisome Proliferator Activated Receptor β) transcription factor.

MiRNAs are small, non-coding ~22-nucleotide RNAs that can regulate a gene expression program on the post-transcriptional level by inhibiting the translation of proteins from mRNA or by promoting the degradation of mRNA. Although the role of miRNAs in the context of the cardiovascular system has only recently begun to be explored, changes in their expression have already been associated with cardiac development and with several pathophysiological states including myocardial hypertrophy and heart failure.

PPAR β belongs to the Hormone receptor family of transcription factors, which play an essential role in cardiac metabolism. Previous findings of our research group showed that PPAR β expression is increased in hearts of calcineurin transgenic mice and in murine hearts that were subjected to aortic constriction (TAC), two animal models of pressure overload-induced cardiac hypertrophy. We have observed that PPAR β expression during heart failure is decreased which is characterised by biventricular dilation and severe compromised contractility. Furthermore recent preliminary data of our group shows that PPAR β is regulated by MicroRNAs (MiRNAs), which are known as effective genes regulators.

Micro-RNA micro-array analyses of cardiac biopsy samples from patients at different stages of heart failure, as well as RNA samples from calcineurin-induced heart failure animal models, uncovered that microRNA-199a and microRNA-214 is significantly altered in hearts of these subjects compared to the levels of the control group. Predictive bioinformatics algorithms suggest that microRNA-199a and microRNA-214 is able to bind to the 3'-untranslated region (UTR) of the PPAR β mRNA and that the seed region is well conserved between the species.

This strongly suggests that expression level of PPAR β can be regulated by artificially modulating microRNA-199a and microRNA-214 expression in the heart.

6. Wetenschappelijke beoordeling

This study has been approved by the PI of this project

3 Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

We will use adult rat females (wild type) for breeding (they will not be sacrificed). We will use rat pups for the experiment. They will be sacrificed and heart tissue will be collected for cells isolation and cell culture.

7b. Sexe

We will use rat females for breeding. Rat pups of both sexes will be used to prevent unnecessary extra breeding.

7.c. Aantallen

This study has a qualitative and not a quantitative character, indicating that we do not need a power calculation. From experience we know that for a molecular biological and microscopical analysis, 6 cm culture plate dishes in triplicate are sufficient to perform all required analyses.

Normally, 8 pups can be obtained from one single pregnant female. From each pup 1 million cells can be isolated. Once isolated, the cells are plated and cultured for a few days in a 6 cm dish (1 million cells / 6 cm culture plate).

Per experiment we will need to test 27 different conditions (see table under 8). Next, we will need three isolations (protein isolation, RNA isolation and immunostaining) per condition ($3 \times 27 = 81$). All experiments are performed in triplicate, indicating that we will need $3 \times 81 = 243$ conditions.

Therefore, we will need $243 \times 6\text{cm}$ dishes (243 million cells). If we divide the amount of cells needed by the amount of cells that can be obtained per neonatal heart, we will need 243 hearts. If one pregnant female gives birth to 8 pups then we will need 31 pregnant females for the real experiment.

Next to this, we also need to optimize the transfection conditions by testing and determine the best working concentrations of precursors and LNA probes for this specific cell type. We will test 4 different concentrations: 0, 5, 15 and 30 nM in untreated as well as in stimuli-treated cells. This means 8 conditions per precursor/probe. Since we want to test 3 different precursor molecules and 3 different LNA probes, we will have 72 different conditions ($8 \times 3 \times 3$). In conclusion, for the optimization we will need 72 million cells and thus 72 neonatal hearts. To obtain this amount of hearts/cels we will need to use 9 pregnant females (72 million cells/8 pups per female).

In total, for optimization and the real experiment we will need 40 pregnant females (320 pups). All neonatal pups from these 40 pregnant females will be used in the experiment.

4 Dierproef

8. Experiment

Experimental set-up:

	Ad GFP			Ad CnA			PE		
	Proteins	RNA	Staining	Proteins	RNA	Staining	Proteins	RNA	Staining
-	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells
Pre miR-199a	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells
Pre mir-214	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells
Pre mir-199a/pre-miR-214	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells
LNA – 199a	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells
LNA – 214	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells
LNA – 199a/LNA-214	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells
Scrambled LNA	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells
Scrambled Precursor	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells	1*10 ⁶ cells

Experimental setup:

Two – tree days old rat pups will be removed from the mother's cage. They will be sacrificed by decapitation and the head will be dropped in liquid nitrogen. We will open the chest, remove the hearts and cut it in to pieces. The cells will be isolated using collagenase digestion. When the cells are isolated they will be count and plated as 1*10⁶ per 6cm dish. Cells will be treated with precursors, LNA probes and then stimulated with AdCnA or PE (phenylephrine) (table) to develop hypertrophy. As control cells will also be treated with AdGFP. All treated cells will be used for protein, RNA isolation and immunostaining in order to asses cell surface area and cardiac markers.

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

n.a.

9b. Pijnbestrijding

n.a.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

The females are not going to be sacrificed; they will be used only for breeding. Rat pups will be decapitated and heads of the sacrificed pups will be dropped in liquid nitrogen.

10a. Ongerief



Estimated discomfort levels:

- Removal of pups from the mother's cage – estimated discomfort level 2
- Decapitation of the pups, head in liquid nitrogen open chest, removal of the heart – estimated discomfort level 2

In total the discomfort level is classified as: 2

10b. Welzijnsevaluatie

n.a

11. Verzorging en huisvesting

The Animal Facility (CPV) of the University of Maastricht will be responsible for the housing and caring of the animals during the pregnancy. The rats will be housed in standard cages with standard enrichment, in a sound-proof room under conditions of controlled humidity, temperature and a 12 h light-dark cycle (lights on 7 AM to 7 PM). Rats will be allowed free access to tap water and chow. The animal caretaker from CPV will inform article 9 person when the rats are born and isolation can start. Decapitation of the neonatal rats and isolation of cardiomyocytes will be performed in the Department of _____, and the _____ will occur in the laboratory of the department of _____.

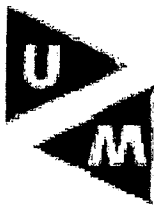
12. Deskundigheid

All procedures will be performed by _____ from the _____ (decapitation of rat pups harvesting hearts and isolating cells). Researchers with article 9 have experience with handling the rats and performing all mentioned techniques. In case of emergency / questions on the condition of the animals, we will contact a person with WOD art.12 and/or a person with WOD art. 14.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

All procedures described bellow will be in accordance to the SOPs established by the University of Maastricht (www.cpv.unimaas.nl):

Relevante literatuur



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: "*Rescue of cardiac hypertrophy by knockout of microRNA-199a and microRNA-214*", is op de DEC vergadering van 28 januari 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De DEC verzoekt de aanvraag in één taal aan te leveren.
- Het ongerief op het voorblad en bij punt 10a stemmen niet overeen. De DEC verzoekt deze in overeenstemming te brengen.
- De DEC is van mening dat het aantal moeders niet juist is. De DEC adviseert de berekening bij punt 7c opnieuw te maken, uitgaande van het aantal 8.
- Bij punt 7c- in het eerste deel, mist de DEC de statistische onderbouwing van de groepsgrootte. De DEC is verbaasd dat er slechts 1 waarneming per conditie plaats vindt.
- De DEC verzoekt bij punt 9c na "nitrogen" een punt te zetten en de rest van de zin te verwijderen.

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 2011-003, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend

Voorzitter DEC-UM

Voorzitter DEC-UM

Ons kenmerk:

Uw kenmerk:

Maastricht University

Datum: 26 mei, 2011

Geachte heer

Onze projectaanvraag getiteld "*Rescue of cardiac hypertrophy by knockout of microRNA-199a and microRNA-214*" is besproken op de DEC vergadering van 28 januari 2011.

De hoofdaanvrager, werkt niet langer aan de UM en dit project zal worden voortgezet door en (VVO). Deze informatie is gewijzigd op het voorblad en grijs gemarkeerd.

Via dit schrijven beantwoorden wij tevens de vragen van de DEC commissie.

Vraag 1: *"De DEC verzoekt de aanvraag in één taal aan te leveren."*

Antwoord 1: De aanvraag is nu aangeleverd in één enkele taal, namelijk de engelse taal. Zowel de VO als de VVO bezigen de engelse taal, niet de nederlandse taal.

Vraag 2: *"Het ongerief op het voorblad en bij punt 10a stemmen niet overeen. De DEC verzoekt deze in overeenstemming te brengen..."*

Antwoord 2: Het ongerief op het voorblad is gewijzigd conform de aanwijzingen van de DEC. De veranderingen zijn grijs gemarkeerd.

Vraag 3: *"De DEC is van mening dat het aantal moeders niet juist is. De DEC adviseert de berekening bij punt 7c opnieuw te maken, uitgaande van het aantal 8."*

Antwoord 3: Wij hebben de berekeningen van het aantal moeders opnieuw uitgevoerd. De veranderingen zijn grijs gemarkeerd op zowel voorblad als DEC aanvraag.

Visiting- and Postal address:

Vraag 4: "Bij punt 7c- in het eerste deel, mist de DEC de statistische onderbouwing van de groepsgrootte. De DEC is verbaasd dat er slechts 1 waarneming per conditie plaats vindt."

Antwoord 4: Wij zijn het eens met de DEC dat slechts 1 waarneming per conditie niet voldoende is. Dit hebben wij veranderd in 3 waarnemingen per condities. Wat betreft de statistische onderbouwing, merken wij op dat deze studie een kwalitatief en niet een kwantitatief karakter heeft, waardoor een powerberekening niet noodzakelijk is. Uit ervaring weten wij dat voor moleculair biologische en microscopische analyses 3 waarnemingen per conditie voldoende is om de benodigde analyses uit te voeren en uitspraken te doen mbt endogene microRNA inhibitie en cellulaire fenotypes.

Vraag 5: "De DEC verzoekt bij punt 9c na "nitrogen" een punt te zetten en de rest van de zin te verwijderen."

Antwoord 5: Deze zin is aangepast conform aanwijzingen van de DEC. De veranderingen zijn grijs gemarkeerd.

Met vriendelijke groet,

Quaden M (CRISP)

From:

Sent: donderdag 26 mei 2011 17:48

To:

Cc:

Subject: Re: Project 2011-003-w

Attachments: 11018-DEC2011003.pdf; ATT00001.htm; DEC_2011-003.doc; ATT00002.htm; Voorblad DEC_2011-003.doc; ATT00003.htm; Wijzigingsbrief project 2011-003-037.doc; ATT00004.htm

Beste

Projectaanvraag 2011-003 is op de DEC vergadering van 28 januari 2011 besproken, en wij ontvingen daarover een aantal vragen en opmerkingen.

Hierbij dien ik namens de verantwoordelijk onderzoeker en de VVO een gewijzigde DEC aanvraag in, inclusief antwoord op de vragen van de DEC UM.

Tot slot wil ik je mededelen dat de originele VO, , niet langer werkzaam is aan de UM. De nieuwe VO is en de nieuwe VVO is beiden bekend bij de DEC UM en artikel 9 gecetrificeerd. Deze nieuwe gegevens zijn in grijs gemarkeerd op het voorblad.

Ik vertrouw erop dat deze gewijzigde DEC aanvraag in de eerstvolgende DEC vergadering wordt behandeld, of dat het administratief wordt afgehandeld door het DEC secretariaat.

Met vriendelijke groet,

Aan:

Ons kenmerk

Doorkiesnummer
043-

Maastricht
28-06-2011

Project: *Rescue of cardiac hypertrophy by knockout of microRNA-199a and microRNA-214.*

DEC-UM
Voorzitter DEC-UM

Verantwoordelijk onderzoeker (VO):

p/a secretariaat DEC-UM

Hierbij 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: 2011-003

Postadres

Diersoort: rat

Postbus 616

Aantal dieren: 40 moeder ratten en 320 ratten pups

6200 MD Maastricht

Einddatum: 24-06-2015

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