

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

DECNR: 2011-067

Versie 2006

Herziene versie

Ontvangen: 14-09-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag 2
29-09-2011	Nieuw / Herz.versie / Pilot

VROM/GGONR ³

LNV/CBDNR ⁴

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

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

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

Budgetnummer	3098 3284B
--------------	------------

Titel van het onderzoek:

Notch activatie in retinale tip en stalk cellen

startdatum 15-5-2011

einddatum⁹ 31-12-2012

Duur van de proef¹⁰: 5 dg

	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				Art. 12	
5.				Art.9/12 ⁸ Anders ⁶ :	

Diergroep	1	2	3	4			
ctrl/exp/sham	leerfase	exp	leerfase	exp			
Diersoort	muis	muis	Muis, pups	Muis, pups			
Stam	C57/BL6	C57/BL6	C57/BL6	C57/BL6			
Construct / mutatie ?							
Herkomst (leverancier) *	CR	CR	CR	CR			
Aantal	1	5	6	30			
Geslacht	v	v	m/v	m/v			
Dieren immuuncompetent ?	ja/nee ⁸	ja/nee ⁸	ja/nee ⁸	ja/nee ⁸	ja/nee ⁸	ja/nee ⁸	ja/nee ⁸
Leeftijd/gewicht	zwanger	zwanger	4 dg	4 dg			
Doel van de proef *	01	01	01	01			
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 *	01	01	02	02			
Toestand dier einde exp*	03	03	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: Notch activatie in retinale tip en stalk cellen

1. Doel van de proef.

In ons lichaam groeien voortdurend nieuwe bloedvaten, en dit is essentieel voor het voortbestaan van het individu maar ook van de soort (zonder bloedvat groei geen voortplanting). Bovendien vindt ongewenste groei van bloedvaten plaats in tumoren. Het is dus van groot belang om dit proces tot in detail te begrijpen. Vaatgroei vindt plaats doordat een endotheelcel –de zogenaamde tip cel– het vat verlaat en de omgeving gaat verkennen. Deze cel wordt gevolgd door de zogenaamde stalk cel. Vascular endothelial growth factor (VEGF), het Notch-Dll4 signalling systeem en enzymen uit de a desintegrin associated metalloproteinase (ADAM) familie spelen hierin een grote rol.

De vragen die we in deze studie willen beantwoorden zijn:

1. Kan VEGF Notch activeren in afwezigheid van liganden zoals Dll4?
2. Leidt VEGF tot ADAM10 of ADAM17 activatie en is dit signaal alleen gelocaliseerd in de tip cel?
3. Is ADAM10 of ADAM17 noodzakelijk voor Notch activatie in de tip cel?
4. Is ADAM10 of ADAM17 activatie voldoende voor Notch activatie in de tip cel?

Onze hypothese is dat VEGF via ADAMs, Notch activeert in de tip cel en dat ADAMs noodzakelijk en voldoende zijn om Notch te activeren in de afwezigheid van klassieke Notch liganden.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang



Dit is een fundamenteel onderzoek dat leidt tot een beter begrip van bloedvat groei. Dit is van belang omdat bloedvat groei soms tekort schiet bij hart- en vaatziekten, en soms ongewenst is, zoals bij kanker. Een beter begrip van bloedvat groei kan leiden tot het ontwerp van selectieve geneesmiddelen die bloedvat groei bevorderen of juist remmen.

3. Alternatieven

Bloedvat groei is een complex cellulaire en moleculaire proces dat nog onvoldoende wordt begrepen om in computer modellen te simuleren. Daarnaast zijn veel van deze processen context afhankelijk. De specifieke biochemische omgeving is van belang alsmede de aanwezigheid van naburige cellen en contact met die cellen. Door de complexiteit hiervan zijn we nog onvoldoende in staat om deze in celkweek na te bootsen. Met de huidige celkweek methoden zijn endotheelcellen snel gedifferentieerd en nemen ze een eenvormig fenotype aan, zodat subtiele onderscheiden tussen tip cellen en stalk cellen bijvoorbeeld niet meer is te maken. Doordat uit neonaten de retina wordt verwijderd en de verdere proeven in vitro gebeuren is het ongerief minimaal.

4. Ethische afweging

Het verbeterd begrip van bloedvat nieuwvorming is van belang voor het ontwikkelen van therapieën voor ischemische hartziekten en voor kanker. Samen leiden deze ziekten tot verreweg de hoogste mortaliteit bij mensen. De huidige studie houdt weefselloogst in van neonatale muizen. Het zijn terminale experimenten en de muizen worden ge-euthanaseerd voordat het weefsel wordt verwijderd. Hierdoor is het ongerief minimaal en gerechtvaardigd, gegeven de mogelijke invloed van uitkomsten op het welzijn van mensen.

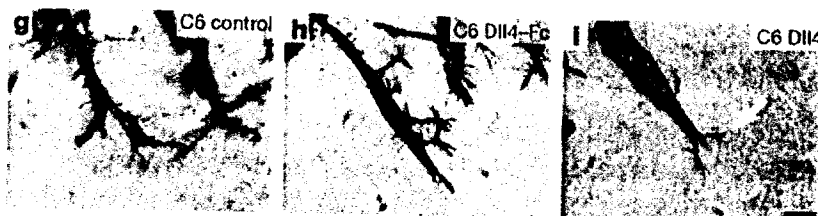
5. Wetenschappelijke onderbouwing

Groei van bloedvaten gebeurt o.a. door spruiten van andere vaten. Voor dit proces moet een endotheel cel op een bepaalde plaats zich losmaken van het bloedvat en via allerlei tentakels zich een weg vormen bijvoorbeeld haaks op het oorspronkelijke vat. Deze cel wordt de "tip cel" genoemd. Daarna volgen andere endotheelcellen, de zogenaamde "stalk cells", de tip cel om het bloedvat te vormen. Het lijkt erop dat deze cellen, die van dezelfde oorsprong zijn, toch heel verschillende reageren op de omgeving en op bijvoorbeeld groeifactor signalen, doordat ze verschillende receptoren tot expressie brengen. De neonatale retina van de muis is hiervoor een geschikt model omdat het vaatnetwerk bij de geboorte nog niet is voltooid en tip cells dus nog steeds actief zijn. Bovendien kan de retina gemakkelijk worden verwijderd en ex vivo nog tot 10 uur worden gebruikt voor bloedvat gerelateerd onderzoek (Sawamiphak, Ritter et al. 2010).

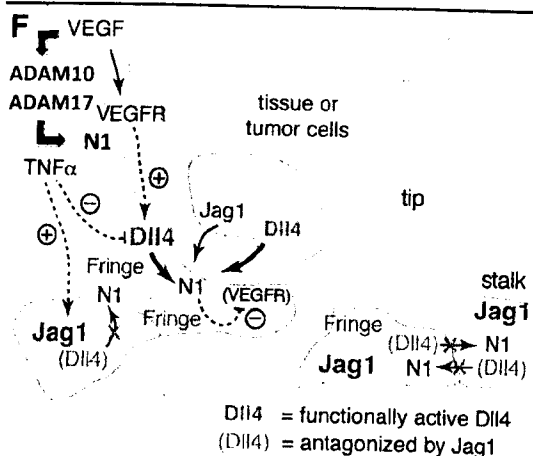
Het Notch receptor systeem bepaalt in een aantal organen en celsoorten hoe de cel zich uiteindelijk differentieert. De receptor is gebonden aan het celmembraan en wordt o.a. geactiveerd door Delta-like4 (Dll4), dat eveneens membraan gebonden is. Voor activatie is dus cel-cel contact nodig en dit maakt regulatie over zeer kleine afstanden mogelijk, precies zoals nodig is in de tip-stalk cel interactie.

Het blijkt dat de tip cel geen Dll4-afhankelijke signalling heeft, maar dat er wel Notch activatie plaatsvindt. Notch kan ook door vascular endothelial growth factor (VEGF) worden geactiveerd, maar het is onduidelijk hoe dat in afwezigheid van Dll4 gebeurt. Activatie van Notch vereist twee enzymatische stappen. In de eerste stap wordt het extracellulaire deel van de receptor afgesplitst door a desintegrin associated metalloproteinase (ADAM, vooral ADAM10 en ADAM17), waarbij Dll4 binding nodig is om Notch gevoelig te maken voor dit enzym. We hebben recent aangetoond dat VEGF ADAM10 en ADAM17 ook kan activeren in de afwezigheid van Dll4 of een van de andere liganden van de receptor (Donners, Wolfs et al. 2010).

Het bewijs dat Notch activatie door VEGF in de tip cel verloopt via ADAM in afwezigheid van Dll4 moet komen van activatie studies in een model tip en stalk cellen goed kunnen worden onderscheiden, zoals in het retina model.



Retina tip cellen met veel (g,h) of weinig lamellopodia (i). Dll4 reduceert lamellopodia en maakt van een endotheel cel een stalk cell



Naar Benedito et al (Benedito, Roca et al. 2009). VEGF stimuleert tip cellen die vervolgens Dll4 maken en volgende endotheelcellen tot stalk cellen maken. Hoe VEGF Dll4 in de tip cel stimuleert is niet bekend (zie gestippelde pijl). Wij hebben aangetoond dat Notch activatie hiervoor nodig is (N1). De vraag is echter hoe Notch wordt geactiveerd in afwezigheid van Dll4. Onze hypothese is dat deze stimulatie van Notch verloopt via ADAMs (in donkerrood)

6. Wetenschappelijke beoordeling

Dit dierexperimentele project is beoordeeld door _____
_____ en wetenschappelijk valide bevonden, zowel wat betreft vraagstelling als de uitwerking
in experimenten.

4 Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Voor deze studie zijn neonatale pups van C57/BL6 muizen nodig. Aangezien de geboortedatum precies bekend moet zijn worden zwangere muizen besteld en worden de pups 4 dagen na geboorte gebruikt.

Voor de weefselloogst zijn de dieren dood op het moment van weefselafname. Resterende organen of weefsels van de pups mogen worden gebruikt door andere onderzoekers. Na opofferen van de pups mogen de moeders worden gebruikt voor andere experimenten.

7b. Sexe

Er worden zwangere moeders gebruikt en pups van beide geslachten.

7c. Aantallen

Het zijn overwegend kwalitatieve experimenten met een ja/nee uitkomst (Notch/ADAM activatie of niet). Per vraagstelling hebben 5 geslaagde retina experimenten nodig, behalve voor de controle van ADAM inhibitie waar 3 experimenten volstaan. Met een gemiddelde litter grootte van 6, 2 ogen per pup en in totaal 9 experimenten van $n=5$ (zie tabel), en 2 experimenten van $n=3$, zijn 5 zwangere moeders nodig. Voor de pilotfase hebben we nog 1 zwangere moeder nodig, dus in totaal 6 moeders en 36 pups.

5 Dierproef

8. Experiment

fase 1. Leerfase

Onze groep heeft geen ervaring met het prepareren van de retina en de verdere analyse. zal de dieren anesthesie geven, euthanaseren en de ogen enucleëren. Een andere analist zal de retina's van de uitgenomen ogen prepareren en verder voor analyse opwerken.

Fase 2. Experimentele fase

Er zijn 4 onderzoeksvragen: 1. VEGF activatie zonder ligand; 2. ADAM10 of 17 activatie en localisatie door VEGF; 3. ADAM10 of 17 nodig voor Notch activatie; 4. ADAM10 of 17 voldoende voor Notch activatie.

	vraag 1	vraag 2	vraag 3	vraag 4
VEGF	+	+	+	
sNotch	+ (5)			+
α -ADAM10		+ (5)		
α -ADAM17		+ (5)		
ADAM10 sub		+ (5)	+ (3)	
ADAM17 sub		+ (5)	+ (3)	
ADAM10 inh			+ (5)	
ADAM17 inh			+ (5)	
ADAM10				+ (5)
ADAM17				+ (5)

Tabel. Te testen stoffen per onderzoeksvraag. "+" geeft aan of stof wordt gegeven, tussen haakjes wordt het aantal experimenten beschreven. sNotch=soluble Notch, " α -ADAMx": antilichaam tegen ADAM, "sub" substraat om ADAM activiteit aan te tonen, "inh" ADAM inhibitor.

De pups worden 4 dagen na de geboorte ge-euthanaseerd onder ijs-anesthesie en de retina wordt verwijderd en in kweek medium op een filter gebracht. De retina's worden op deze wijze tot tenminste 10 uur in leven gehouden, zodat bovenbeschreven immunohistochemische en farmacologische experimenten kunnen worden gedaan.

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

De 4 dagen oude pups worden op ijs onder anesthesie gebracht. Bij afwezigheid van pijn reflexen wordt de pup gedecapiteerd mbv een schaar.

9b. Pijnbestrijding

Het betreft een weefseloogst experiment onder narcose. Verdere pijnbestrijding is niet nodig

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

- Euthanasie onder narcose dmv decapitatie.
- Weefsel oogst experiment, dieren overleven niet.

Zorg

10a. Ongerief

groep 1 en 2. Moeders bevallen 1x

groep 3 en 4. Pups worden geanestheseerd en ge-euthanaseerd 1x

ongerief code 01

ongerief code 02

10b. Welzijnsevaluatie

nvt

11. Verzorging en huisvesting

Standaard huisvesting. Moeder bij pups ivm zogen.

12. Deskundigheid

De VO heeft 2 jaar ervaring met proefdier onderzoek en de art 12 functionaris die de dieren zal euthanaseren heeft vele jaren ervaring met anesthesie en euthanasie.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

Verdoof de 4 dagen oude pup of ijs gedurende enkele minuten

Test pijn reflex door in de poot of start te knijpen. Bij voldoende diepe anesthesie:

Euthanaseer de pup door decapitatie met een schaar.

Euthanaseer maar een dier tegelijk omdat extractie van retina ongeveer 15 minuten in beslag neemt

Extraheer retina en start met experiment

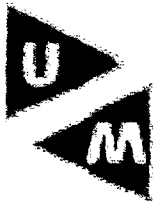
Relevante literatuur

Zie onder

Benedito, R., C. Roca, et al. (2009). "The notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis." Cell **137**(6): 1124-1135.

Donners, M. M., I. M. Wolfs, et al. (2010). "A disintegrin and metalloprotease 10 is a novel mediator of vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell function in angiogenesis and is associated with atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **30**(11): 2188-2195.

Sawamiphak, S., M. Ritter, et al. (2010). "Preparation of retinal explant cultures to study ex vivo tip endothelial cell responses." Nat Protoc **5**(10): 1659-1665.



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:

Uw referentie:

Onze referentie :

Maastricht, 03-05-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Notch activatie in retinale tip en stalk cellen*", is op de DEC vergadering van 29 april 2011 besproken.

De DEC heeft één enkele vraag/opmerking:

- De DEC verzoekt bij punt 6 aan te geven door wie of welke commissie **dit DEC protocol** wetenschappelijk is beoordeeld en goedgekeurd (je kunt als VVO niet je eigen aanvraag wetenschappelijk beoordelen).

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 **2011-067**, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Cardiovascular Research Institute Maastricht



School for Cardiovascular Diseases Maastricht University



Aan: DEC

Scientific Director

Financial Director

Program Coordinators
Thrombosis and Haemostasis

Cardiac Function

Vascular Biology

International Scientific
Advisory Board

Chairman

Your Ref.

Maastricht, 26-09-2011

Our Ref. CARIM/SV/11-767

Telephone,
www.carimmaastricht.nl

Betreft: protocol "Notch activatie in retinale tip en stalk cellen"

Geachte leden van de DEC,

Ons protocol "Notch activatie in retinale tip en stalk cellen", 2011-067, is door u beoordeeld en is aangehouden in verband met het ontbreken van onafhankelijke wetenschappelijke beoordeling van het project. Inmiddels hebben we bereid gevonden om het project te beoordelen op wetenschappelijke validiteit en hij heeft het geaccordeerd. De betreffende paragraaf in het herziene protocol is overeenkomstig gewijzigd.

Hoogachtend,

Namens

Aan:

*Ons kenmerk**Doorkiesnummer**Maastricht*
29-09-2011**Project:** *Notch activatie in retinale tip en stalk cellen.*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: 2011-067
Diersoort: muis
Aantal dieren: 42
Einddatum: 29-09-2015

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