# Deelproject aanvraag

Projectnummer: -176
Ontvangst: 02-09-2010

## I Project

Onderzoek

- *Aanvrager*

| | |
|---|---|
| **Naam** | |
| **Organisatie/Eenheid** | |
| **Onderafdeling** | |
| **Adres** | |
| **Postcode** | |
| **Plaats** | |
| **Telefoon** | |
| **E-mail** | |
| **Vergunninghouder** | [1] RUG |

- *Algemeen*

| | |
|---|---|
| **Titel basisproject** | Ontrafeling van de neurodegeneratieve ziekte SpinoCerebellaire Ataxie in vivo modellen |
| **Aanvang basisproject** | 01-10-2010 |
| **Gewenste duur** | 4 jaar |
| **Voorgaande (deel)project(en)** | |
| **Geldstroom** | [1] 1e geldstroom |
| **Subsidiegever** | |

- *Eind- of medeverantwoordelijke*

| | |
|---|---|
| **Titel en naam** | |

- *Andere personen betrokken bij de handelingen aan proefdieren*

| Naam | Functie |
|---|---|
| | |

### Deelproject

- *Algemeen*

| | |
|---|---|
| **Titel deelproject** | Karakterisatie van PDYN transgene muizen |
| **Aanvang deelproject** | 01-10-2010 |
| **Gewenste duur** | 1 jaar |

## II Onderzoeksopzet

- *Behaalde resultaten*

Recentelijk hebben we een nieuw spinocerebellair ataxie gen ondekt in de nederlandse ataxie populatie. Missense mutaties in coderende regio van PDYN blijken SCA23 te veroorzaken. Echter de rol van PDYN in cerebellaire neurodegeneratie is onbekend. Wel hebben we recentelijk aangetoond dat SCA23-mutant PDYN toxisch is voor striatale neuronen en leidt tot verhoogde celdood. Om toch de rol van PDYN in het cerebellum te kunnen bestuderen en in de Purkinje cellen (DE plek van pathologie in patienten) hebben we een conditionele transgene PDYN muis gemaakt die het humane wild type en het mutante (R212W) PDYN tot expressie kan brengen via de Cre promotor. We hebben van elke conditionele transgene muis 5 verschillende lijnen.

- *Vraagstelling van het deelproject*

Om het transgen tot expressie te brengen zullen de conditionele transgene PDYN muizen eerst gekruisd moeten worden met Purkinke cell-specifieke Cre muizen of met muizen die Cre overal tot expressie brengen. Omdat we nog niet weten wat de expressie level is van het wild type PDYN en R212W-mutante PDYN na activatie via Cre-recombinase, zal de expressie bepaald worden in de verschillende weefsels van interesse. Deze expressie zal vergeleken worden met wild-type muizen(nakomelingen zonder transgen expressie onder cre promoter. Op basis van deze resultaten zal bepaald worden met welke muizenlijn vervolg onderzoek gedaan wordt.

- *Onderzoeksopzet*

Om transgen expressie te kunnen bepalen in verschillende cellen en weefsels van interesse zullen eerst de conditionele transgene muizen gekruisd moeten worden met Cre-specifieke transgene muizen zoals de pcp2-cre (Purkinje cel specifiek) en de meox-cre (algemene promotor voor algemene expressie) transgene muis. In de F1 van deze kruizing wordt de expressie bepaald nadat de muizen verdoofd zijn met isofluraan en vervolgens geeuthanaseerd worden door cervicale dislocatie. Daarna zullen de verschillende cellen en weefsels zoals Purkinje cellen, cerebellum, cerebrum, ruggemerg, darm, lever, hart, spier, long en nier bepaald worden. Eiwit expressie zal vervolgends bepaald worden met immunoblotting en immunohistochemie.

- *Beschrijving van de uitvoering van de experimenten*

De conditionele transgene PDYN muizen zullen gekruisd worden met de Cre-lijnen; Pcp2 en meox. De nakomelingen zullen op 4 verschillende leeftijden (2-12 maanden) gewogen en verdoofd worden met isofluraan en vervolgens geeuthanaseerd door middel van cervicale dislocatie. Vervolgens worden de cellen en de weefsels geisoleerd.

- *Ongerief voor dieren*

| Handeling | Ongerief |
|---|---|
| Gewicht bepaling<br>Muizen worden gewogen met een balans om het gewicht te bepalen | [1] gering |
| Euthanasie<br>De muizen zullen op verschillende tijden worden geeuthanaseerd. De muizen worden verdoofd met isofluraan en vervolgens geeuthanaseerd door middel van cervicale dislocatie. De organen en lichaamsvloeistoffen zullen verzameld worden om gebruikt te worden voor verdere biochemische en functionele karakterisatie van de muizen. | [1] gering |
| Inductie expressie trangen wat leidt tot ataxie<br>De conditionele trangene muizen zullen gekruisd worden met de verschillende cre-lijnen. Hierdoor zal het transgen selectief tot expressie komen in het gewenste weefsel op basis van de gekozen cre-lijn. De expressie van het transgen zal leiden tot ataxie en motorcoordinatie problemen. Hierdoor zouden de muizen matige moeilijkheden kunnen krijgen met het eten en drinken. Individuele huisvestiging is niet nodig. | [3] matig |

**Totaal ongerief deelproject**

[3] matig

**Toelichting**

Het wegen van de dieren zal gering ongerief veroorzaken. De expressie van het transgen kan mild tot matig ongerief veroorzaken. De muizen worden onder verdoving geeuthanaseerd door middel van cervicale dislocatie. Hierna worden de weefsels geisoleerd.

De muizen die het trangen tot expressie brengen worden nauwkeurig gevolgd in de tijd. Mocht het zo zijn dat de muizen meer dan 5% van hun lichaamsgewicht verliezen dan zullen ze uit het experiment genomen worden. Ook worden uiterlijke kenmerken van de dieren in de gaten gehouden zoals hun vacht en natuurlijke kooigedrag. Wanneer het actactische ongerief meer wordt dan matig zullen de experimenten ingekort worden (<12 maanden).

**Verfijning van uitvoering**

Wanneer de mate van ongerief meer wordt dan matig wordt de proef ingekort. De dieren worden eerst verdoorfd alvorens ge-euthananiseerd middels cervicale dislocatie.

- *Dieren: soort(en) en aantal(len) voor de periode van dit deelproject*

| Diersoort | Stam | Inteelt | Aantal |
|---|---|---|---|
| Muizen | 129Sv+transgen | Transgeen (tevens inteelt) | 640 |
| Muizen | 129Sv-transgen | Transgeen (tevens inteelt) | 640 |

**Motivering aantal dieren**

We hebben een wild type conditionele transgene PDYN muis lijn en een mutante conditionele transgene PDYN muis lijn. Beide lijnen, zowel wild type als mutant, hebben het humane PDYN onder expressie van de Cre-promoter).

Per conditionele transgene lijn (wild type en mutant) zijn er 5 conditionele transgene sublijnen. In totaal zijn er dus 10 conditionele transgene sublijnen (2x5=10). Van deze 10 conditionele transgene sublijnen weten we dus nog niet wat de expressie van het transgen (PDYN)is.

De conditionel transgene sublijnen zullen gekruisd worden met de pcp2-cre en meox-cre muis lijnen. In nakomelingen van deze kruizing zal dan de expressie bepaald worden van het humane wild type en mutante PDYN in het brein en in andere weefsels zoals spinal cord, darm, lever, longen etc.

Per sublijn zullen er 4 muizen geofferd worden die het transgen tot expressie brengen onder cre-promoter op 4 tijdstippen. Dit is 4 tijdstippen x 4 muizen x 10 sublijnen x 2 cre-lijnen = 320 muizen

Per sublijn op de verschillende tijdspunten zullen zowel mannetjes en vrouwtjes vergeleken worden in trangen expressie. Aangezien de muislijnen nieuwe stammen zijn zullen zowel vrouwlijke als mannelijke dieren gebruikt worden, zodat er optimaal kennis genomen kan worden van de nieuwe lijnen.
Hierdoor komt het aantal muizen op 2x320=640 muizen.

Als controle gebruiken we nakomelingen van de kruizing die het transgen niet tot expressie brengen onder de Cre promotor (dit zijn de niet trangene nakomelingen en zijn dus gewoon wild type muizen en dus geen GGO). Ook hier voor gebruiken we 4 muizen per sublijn per tijdspunt en zowel mannetjes als vrouwtjes. Ook hier gebruiken we dan 4 tijdstippen x 4 muizen x 10 sublijnen x 2 cre-lijnen x 2( man en vrouw = 640 muizen

Dit brengt het totaal op 1280 muizen. Waarvan 640 transgeen en 640 wild type littermate (dus geen GGO en kan deze muizen niet opgevoeren bij opgave dieren want ze zijn nakomemlingen van de 129Sv+trangeen en geen Bl6 niet-trangeen)

**Vermindering van aantallen**

Als controle voor alle lijnen gebruiken we nakomelingen die niet het transgen onder de Cre promotor tot expressie brengen.
Daarnaast gebruiken we het minimale aantal muizen voor dit experiment om een goede indruk te krijgen van de expressie van het transgen in het brein en verschillende andere weefsels.

## III Proefdierkundige gegevens

- *Dieren: herkomst en huisvesting*

**Herkomst van dieren**

[1] aankoop

**Toelichting herkomst van dieren**

**Dieren uit ander onderzoek**

Niet mogelijk; dit zijn nieuwe transgene muizen lijnen

**Afwijkende huisvesting**

standaard volgens richtlijnen CDL met kooiverijking

**Locatie van de experimenten**

[5] CDL

**Elders**

niet van toepassing

- *Anesthesie en pijnbestrijding*

**Anesthesie**

[1] wordt niet toegepast (geen aanleiding)

**Welke of waarom niet**

niet van toepassing omdat anesthesie wordt toegepast in het kader van de euthanasie

**Pijnbestrijding (per- en) postoperatief**

[1] wordt niet toegepast (geen aanleiding)

**Zo ja: Welke**

| Diersoort | Medicament | Dosering (mg/kg) | Route | Interval (uur) |
|---|---|---|---|---|
| anders .nl | zie hieronder | | | |

**Eventuele andere pijnbestrijding**

niet van toepassing

**Toedieningsschema: frequentie en periode**

niet van toepassing

- *Einde experiment*

**Toestand dier na proef**

[1] dood in kader van de proef

**Indicaties humane eindpunten**

Er is geen ervaring uit voorgaand onderzoek want het gaat hier om nieuwe muizenlijnen. Echter mocht het zo zijn dat de muizen achter blijven in hun groeicurve en meer dan 5% van hun lichaamsgewicht hebben verloren dan zullen ze uit het experiment genomen worden.

**Wijze van termineren**

Muizen worden verdoofd met isofluraan en vervolgens geeuthaniseerd door middel van cervicale dislocatie.

## IV Biotechnologie

| Type | Nummer en specificatie |
|---|---|
| GGO (VROM) | |