



동물실험계획 승인신청서

접수일자 : 2023 . 03 . 15 .

연구 과제명	(국문) 미세아교세포 내 O-GlcNAcylation Modification의 역할에 대한 연구			
	(영문) Physiological role of O-GlcNAcylation in the microglia			
연구 책임자	성 명	김재익	직 위	부교수
	소 속	UNIST / 생명과학과		
	연락처	010-2019-2844	E-mail	jikim220@unist.ac.kr
	동물실험윤리교육 이수번호		K-2021-43440290	

* 동물실험계획 심의 후 승인 된 건에 한해서만 승인번호를 부여합니다. *

[윤리적 동물실험 방법의 준수]

1. 본인은 UNIST 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee) 규정 및 동물실험 관련 법규를 준수할 것을 약속합니다.
2. 본인은 제출한 계획서의 실험 방법을 준수할 것이며 방법 또는 실험동물 마리 수 등 계획을 변경할 경우 변경신청서를 통해 동물실험윤리위원회에 이를 알리고 동의를 얻을 것입니다.
3. 본인은 동물이 참을 수 없는 고통을 호소하거나 질병에 이환되었을 때 안락사를 포함한 수의사의 응급조치가 이루어지는 것에 동의합니다(응급조치 전에 수의사의 지시가 있을 것입니다).
4. 생체효능검증실 시설을 이용하여 동물실험에 참여하는 경우, 해당 하는 모든 연구자는 생체효능검증실 이용자 교육과 동물실험윤리 교육을 이수하였습니다.
5. 본 계획서와 연관이 있는 논문 발표 후 해당 논문에 대한 정보를 위원회에 제공할 것입니다.
6. 과제 승인 기간은 최대 1년임을 확인하였으며, 1년이 초과할 경우 기간 만료 전 재승인(연장)신청을 통해 동물실험윤리위원회에 이를 알리고 동의를 얻을 것입니다.

계획서에 기재된 사항들은 정확하며 위 사실의 위반 시 동물실험 및 동물실험시설의 이용 제한을 포함한 불이익을 감수할 것을 아래와 같이 서약합니다.

2023년 3월 11일

연구책임자 김 재 익

김재익

1. 실험 수행 기본 정보 (Information of Investigators)

1-1. 동물실험 수행자에 대한 정보를 기입하여 주십시오.

성명 (Name)	소속 (Department)	직급 (Position)	연락처(Contact) (Cell-phone#)	동물실험윤리교육 이수번호	연구자의 역할 (Role) (담당연구자/참여연구자)
김재익	생명과학과	부교수	010-2019-2844	K-2021-43440290	수술,조직채취,안락사 (연구책임자)
김현진	생명과학과	대학원생	010-2071-9671	BIC Study-202203-430	수술,조직채취,안락사 참여연구원
이병은	생명과학과	대학원생	010-2966-3843	BIC Study-202203-446	수술,조직채취,안락사 참여연구원
이영은	생명과학과	대학원생	010-4280-6667	BIC Study-202201-225	수술,조직채취,안락사 참여연구원
이하은	생명과학과	대학원생	010-5054-1495	BIC Study-202203-428	수술,조직채취,안락사 참여연구원
이지은	생명과학과	대학원생	010-4646-6834	BIC Study-202203-454	수술,조직채취,안락사 참여연구원
김혜윤	생명과학과	대학원생	010-9954-8940	K-2021-43290048	수술,조직채취,안락사 참여연구원
김연주	생명과학과	대학원생	010-5713-8837	BIC Study-202107-1422	수술,조직채취,안락사 참여연구원
조은정	생명과학과	대학원생	010-9221-5782	BIC Study-202201-223	수술,조직채취,안락사 참여연구원
정재욱	생명과학과	대학원생	010-7139-4711	BIC Study-202201-061	수술,조직채취,안락사 참여연구원
정민석	생명과학과	대학원생	010-4787-8233	BIC Study-202201-060	수술,조직채취,안락사 참여연구원

* 동물실험을 수행할 모든 연구자를 기입하기 바라며, 각 연구자가 실험 중 어떤 역할을 하는지 기입해주십시오.

연구책임자가 직접 동물실험을 수행할 경우 아래와 같이 위 란에 **해당 정보를 기입하여** 주시기 바랍니다.

* **관리담당연구자**는 동물실험윤리위원회(IACUC) 및 생체효능검증실과 연락 및 관련 업무 관리를 담당해야 합니다.
반드시 한 명 이상 지정해야 합니다.

1-2. 실험수행 기간

동물실험윤리위원회 승인일 ~ 2024년 07월 09일 까지 / 총 (3)년 중 (1)년째

* **1회 과제 승인 기간은 최대 1년**이며, 1년을 초과하여 실험이 진행 될 경우, 반드시 **기간 만료 전 재승인(연장)** 신청이 이루어져야 합니다.

* 재승인 신청은 최대 2회(총 연구기간 3년)까지 가능합니다.

2. 동물실험의 범주 및 종류 (Grade and Procedure of Study)

2-1. 동물실험의 범주를 선택하여 주십시오. (Level of Pain)

Grade A: 죽은 생물체를 이용하는 실험 또는 식물, 세균, 원충 또는 무척추동물을 이용한 교육 또는 연구
Grade B: 척추동물을 사용하지만 거의 스트레스를 주지 않는 교육 또는 연구

	Grade C: 척추동물을 대상으로 단시간의 경미한 통증 또는 스트레스가 가해지는 교육 또는 연구
V	Grade D: 척추동물을 대상으로 중등도 이상의 고통이나 억압을 동반하는 교육 또는 연구
	Grade E: 척추동물을 대상으로 극심한 고통이나 억압 또는 회피할 수 없는 스트레스를 동반하는 교육 또는 연구

2-2. 동물실험의 종류를 선택하여 주십시오. (V) (Select Procedure)

V	시료의 투여 및 접종 (Material injection or inoculation)	V	재료 및 시료의 채취 (Sampling)	V	유전 및 육종 (Genetics or Breeding)
V	외과적 처치 (Surgical procedure)		방사선 조사 (Irradiation)	V	감염 (Infection)
V	생리적 상태 및 행동 관찰 (Observation of physical status or behavior)		발암 (Carcinogenesis)		기타 (Other)

3. 실험동물 (Laboratory Animals)

- * 생체효능검증실험로 동물을 반입할 경우, 지정된 동물생산회사에서는 신청 후 다음 주에 반입 가능합니다.
(대한바이오텍, 오리엔트바이오, 중앙실험동물)
- * 지정되지 않은 동물생산회사 및 연구협력기관(국내외)으로부터의 동물 반입을 원하실 경우 health report(최근 18개월 분량), SPF certification을 사전에 제출하셔야 합니다.

구분	1	2	3
품종(Species)	Mouse	Mouse	Mouse
계통명(Strain)	OGT(fl/Y)	OGT(fl/fl)	CX3CR1-CreER-IRES-eYFP
유전자형 (Genotype_)	Wild() GEM(V)	Wild() GEM(V)	Wild() GEM(V)
성별(Sex)	M	F	M
일령, 주령(Age)	4~8weeks	4~8weeks	4~8weeks
체중(Weight)	20~30g	20~30g	20~30g
수량(Numbers)	10	10	10



미생물 성상 (Microbiological status)	germfree	V SPF	germfree	V SPF	germfree	V SPF
	gnotobiotic	conventional	gnotobiotic	conventional	gnotobiotic	conventional
공급처(시설명) Source(vender)	자체 breeding을 통해 생산		자체 breeding을 통해 생산		자체 breeding을 통해 생산	

구분	4		5		6	
품종(Species)	Mouse		Mouse		Mouse	
계통명(Strain)	CX3CR1-CreER-IRES-eYFP		CX3CR1-Cre/+;OGT(fl/Y)		CX3CR1-Cre/+;OGT(fl/fl)	
유전자형 (Genotype_	Wild()		Wild()		Wild()	
	GEM(V)		GEM(V)		GEM(V)	
성별(Sex)	F		M		F	
일령, 주령(Age)	4~8weeks		4~8weeks		4~8weeks	
체중(Weight)	20~30g		20~30g		20~30g	
수량(Numbers)	10		510		510	
미생물 성상 (Microbiological status)	germfree	V SPF	germfree	V SPF	germfree	V SPF
	gnotobiotic	conventional	gnotobiotic	conventional	gnotobiotic	conventional
공급처(시설명) Source(vender)	자체 breeding을 통해 생산		자체 breeding을 통해 생산		자체 breeding을 통해 생산	

구분	4		5		6	
품종(Species)	Mouse		Mouse			
계통명(Strain)	B6SJL-Tg(APP ^{Sw} FLon,PSEN1 ^{M146L} *L286V)6799Vas/M mjax (Jackson stock #: #034840-JAX)		B6SJL-Tg(APP ^{Sw} FLon,PSEN1 ^{M146L} *L286V)6799Vas/M mjax (Jackson stock #: #034840-JAX)			
유전자형 (Genotype_	Wild()		Wild()			
	GEM(V)		GEM(V)			
성별(Sex)	M		F			



일령, 주령(Age)	4~12months		4~12months			
체중(Weight)	20~30g		20~30g			
수량(Numbers)	16		16			
미생물 성상 (Microbiological status)	germfree	V SPF	germfree	V SPF		
	gnotobiotic	conventional	gnotobiotic	conventional		
공급처(시설명) Source(vender)	자체 breeding을 통해 생산		자체 breeding을 통해 생산			

* 필요한 경우 동물정보 입력 칸은 추가하여 입력가능 하며, 추가하실 경우 위 표를 [복사]해서 이 줄에 [붙여넣기]하시면 됩니다.

4. 동물실험 대체법과 불필요한 동물실험의 금지 (Alternatives and Rationale for Animal use)

* 가능한 경우 동물실험을 줄이기 위한 노력을 확인하고자 합니다.

4-1. 동물실험의 타당성을 확인하기 위한 것입니다. 다음 사항을 기술하여 주십시오.

(To verify the validity of animal experiments. Please describe the followings.)

정보 확인처 또는 데이터 베이스(Data References):

- 1) Dejanovic, Borislav, et al. "Complement C1q-dependent excitatory and inhibitory synapse elimination by astrocytes and microglia in Alzheimer's disease mouse models." Nature Aging 2.9 (2022): 837-850.
- 2) Ennerfelt, Hannah, et al. "SYK coordinates neuroprotective microglial responses in neurodegenerative disease." Cell 185.22 (2022): 4135-4152.
- 3) d'Errico, Paolo, et al. "Microglia contribute to the propagation of Aβ into unaffected brain tissue." Nature Neuroscience 25.1 (2022): 20-25.
- 4) Ziegler-Waldkirch, Stephanie, et al. "Seed-induced Aβ deposition is modulated by microglia under environmental enrichment in a mouse model of Alzheimer's disease." The EMBO journal 37.2 (2018): 167-182.
- 5) Maezawa, Izumi, et al. "Kv1. 3 inhibition as a potential microglia-targeted therapy for Alzheimer's disease: preclinical proof of concept." Brain 141.2 (2018): 596-612.
- 6) Umpierre, Anthony D., et al. "Microglial calcium signaling is attuned to neuronal activity in awake mice." Elife 9 (2020): e56502.
- 7) Hong, Soyon, et al. "Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models." Science 352.6286 (2016): 712-716.
- 8) Huang, Yubin, et al. "Repopulated microglia are solely derived from the proliferation of residual microglia after acute depletion." Nature neuroscience 21.4 (2018): 530-540.

동물 중 선택의 적절성(Appropriateness of the selected species):

기존에 보고된 연구들을 바탕으로 미루어봤을 때, mouse에서의 microglia 연구는 주로 C57BL/6 mouse에서 수행되었다. 새로운 실험적 가설을 입증하기 위해서 선행 연구 참고가 필수적이므로, 본 연구에서도 C57BL/6 mouse를 사용하고자 한다. 특히나 microglia는 세포 자체로서도 높은 이질성을 지녔기 때문에 초파리나 개구리 같은 타 동물 중에서 연구를 시행할 시에는 기존 연구를 참고함에 어려움을 겪기 때문에 본 연구는 필수적으로

C57BL/6 mouse에서 시행되어야 한다.

사용동물 수에 대한 적절성(Appropriateness of the number of animals):

Central nervous system에 존재하는 microglia의 O-GlcNAcylation이 미치는 영향을 연구하기 위하여, 아래의 실험에 마우스를 동원하여 실험하고자 한다. 특이적으로 microglia에서 OGT 유전자를 제거하기 위하여 CX3CR1-Cre mouse와 OGT mouse를 교배하여 태어난 CX3CR1-Cre/+;OGT(f/f) 또는 CX3CR1-Cre/+;OGT(f/Y) mouse를 실험군으로 사용한다. 대조군으로는 CX3CR1-Cre/+ mouse를 사용한다.

1) Immunohistochemistry (IHC)

A) CX3CR1-Cre/+;OGT(f/f)와 CX3CR1-Cre/+;OGT(f/Y) mouse의 brain을 추출하여 면역조직염색법을 시행한다. Microglia에서 높은 발현도를 보이는 IBA1과 phagocytosis 정도를 나타내는 CD68 등 15종 이상의 단백질군의 염색을 통해 microglia에서 O-GlcNAcylation level을 조절하였을 때 기능적 변화를 보이는 단백질들을 스크리닝 하고자 한다. 본 실험은 실험적 타당성을 고려하여 control group과 experimental group에서 실험당 각각 8마리를 사용한다.

2 그룹 X 8마리 X 독립적 실험 15번
= 240마리

B) Microglia의 기능적 변화에 따른 주변 synapse의 감소 혹은 증가를 관찰하기 위하여 synapse imaging을 시행하고자 한다. synapse 형광은 AAV-Synaptophysin-GFP 와 AAV-mDlx-mCherry를 주입하여 Presynaptic terminal을 표지할 것이다. 또한 AAV-GAD67-GFP와 AAV-mDlx-mCherry를 주입하여 postsynaptic membrane을 표지하고자 한다.

2 그룹 X 8마리 X 독립적 실험 3번
= 48마리

C) Brain에서뿐만 아니라 척수에서의 microglia의 차이를 살펴보기 위하여 Kv1.3 channel 등 이미 연구되었던 단백질군 5종을 염색하여 변화를 관찰한다.

2그룹 X 8마리 x 독립적 실험 5번
= 80 마리

D) Microglia에서 OGT cKO 후 neurotransmission의 변화를 면밀히 살펴보기 위하여 AAV-mDlx-mCherry-chR2 virus와 AAV-Flex-GFP virus를 co-injection하고자 한다. 이후 recording하여 neuron으로 들어오는 optogenetic stimulation에 의한 IPSC를 측정할 것이다. 또한 이러한 반응이 LPS로 유도된 neuroinflammation 상황에서 어떻게 다른지 알아보고자 LPS와 PAP-1을 i.p. 주입하여 이후 virus injection을 시행하고자 한다. 이후 희생하여 면역조직염색법을 시행할 것이다.

2그룹 x 12마리 8번 독립적 실험
= 192마리

E) 5XFAD Alzheimer 유도 모델에서 microglia의 O-GlcNAcylation 부재가 pathology에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 amyloid beta 등을 염색하여 살펴본다.

4그룹 x 8마리
= 32마리

2) Whole patch recording

최근 neuron에서뿐만 아니라 brain에 존재하는 glial cell들의 ion channel이 주요 기능을 조절한다는 논문이 보고되었다. 따라서 OGT KO에 따른 O-GlcNAcylation의 부재로 인해 발생한 전기생리학적 변화를 관찰하기 위하여 뇌 절편에서 관찰된 microglia의 whole cell patch recording을 시행한다.
다른 조건에서의 반응성 차이를 살펴보기 위하여 LPS, 4AP, TTX 등의 약물을 처리하여 독립적으로 실험을 시행한다.

2그룹 x 10마리 x 약물 5종
= 100마리

3) qRT-PCR

OGT cKO에 따른 microglia의 유전적 발현량 차이를 관찰하기 위하여 pro-inflammatory cytokines와 anti-inflammatory cytokines 등을 위주로 qRT-PCR을 시행한다.

2그룹 x 8마리 x 5번 반복실험 x 5번 독립적 실험
= 400마리

따라서 실험에 필요한 총 마우스 수는 다음과 같다.

[592 (IHC) + 100 (recording) + 400 (qRT-PCR) = 1092 마리]

5. 실험동물의 사육관리 (Husbandry Management)

- * 생체효능검증실 이용자 교육을 이수하지 않은 연구자는 생체효능검증실에 출입할 수 없습니다.
- * 생체효능검증실에서 사육되는 실험동물은 수의사와 실험동물 기술사에 의해 사육관리가 수행됩니다.
- * 생체효능검증실에서는 정기적으로 미생물 모니터링과 환경모니터링을 실시합니다.

5-1. 실험동물 사육장소 (V) (Housing Zone)

V	Small animals zone	V	Return animal zone
V	BSL-2 zone		Others (_____)

* 생체효능검증실 이외 시설에서의 사육 또는 실험 시 해당 건물명, 층·호수, 연구실 명 등을 기재하여 주시기 바랍니다.

5-2. 실험에 필요한 특수한 반입 물품 (Special Materials)

5-2. 실험에 필요한 특수한 반입 물품 (Special Materials)	No search remarks (v)
생체효능검증센터에 반입이 필요한 장비 및 도구:	
Stereotaxic system, 마우스 stereotaxic surgery에 필요한 수술도구, Genotyping용 도구, 바이러스(AAV)	
특정사료 공급:	
PLX 약물이 포함된 사료. 자체 케이지 관리.	V
그 외 기타:	

* 생체효능검증실에서 제공하는 물품 이외의 장비 및 도구를 연구자가 실험실 내로 직접 반입하고자 하는 경우, 사전에 담당자와 협의 후 멸균하여 반입

5-3. 실험동물 사육구역 이외의 장소로 실험동물 이동(Relocation)	No search remarks (v)
장소: Behavior analysis lab	
사용장비: 동물행동분석장비, 마우스 stereotaxic	
실험내용: 동물행동분석(open field, elevated plus maze, rotarod, etc.), 바이러스 주입	

- * 생체효능검증실 SPF 구역 내의 mouse, rat은 외부 반출 후 SPF zone으로의 재반입이 불가능합니다.
- * 동물이 반출되는 모든 경우, 반출되기 최소 2일전에 허가를 받아야 합니다. (반출신청서 작성하여 제출)
- * 실험동물 사육구역(4zone) 내에서 해당 구역 이외의 장소로 동물을 이동시켜 실험할 경우 장소, 이용 장비 및 연구 내용을 기재하여 주십시오. (생체효능검증실 지하층 영상분석실은 사육구역에 포함되지 않습니다.)

5-4. 사료 및 음수 제한 (실험과정 중 실험동물의 사료 및 음수 섭취를 강제로 제한 할 경우) (Restriction of Feed and Water)	No search remarks (v)
실험기간	V
방 법	V
1회 처치 시간	V
반복 횟수	V
제한 사유	V

5-5. 실험 기간 중 운동제한 (실험과정 중 실험동물의 운동을 강제로 제한할 경우) (Require of Mechanical Restraint)	No search remarks (v)
실험기간	V
방 법	V
1회 처치 시간	V
반복 횟수	V
제한 사유	V

6. 실험동물의 수의학적 관리 (Veterinary care)

- * 실험과정 중 또는 종료 시에 실험동물의 고통을 줄이기 위해서 적절한 조치를 취해야 합니다.
- * 해당 약제에 표시하여 주십시오. 기타 약제일 경우 기타 난에 기입하여 주십시오.

- * 약품 구입시 처방전이 필요할 경우 생체효능검증실에서 발행해 드립니다.

(문의 : 생체효능검증실 수의사 이윤진, T.5214, leeyj0926@unist.ac.kr)

6-1. 실험 중 실험동물의 고통 관리(마취제/ 용량/투여방법/횟수) Pain Control (description of agent name, dose and route)	실시자 (Operator)	No search remarks (v)
진정/마취제 (Tranquilization/Anesthesia)	① Zoletil / Rompun ② Zoletil(96 mg/kg) / Rompun(24 mg/kg) ③ IP(복강주사)	연구책임자 및

	<p>④ 총 세 종류의 마취제 사용 실험에 대한 마취제 사용량 계산</p> <ul style="list-style-type: none"> - (25g 마우스 기준 두당 용량 Zoletil 2.4 mg, Rompun 0.6 mg, 0.9% 식염수에 섞어서 사용) × 32 마리 × 1회 주입 = Zoletil 76.8 mg, Rompun 19.2 mg 필요 - (25g 마우스 기준 두당 용량 Zoletil 2.4 mg, Rompun 0.6 mg, 0.9% 식염수에 섞어서 사용) × 292 마리 × 2회 주입 = Zoletil 1401.6mg, Rompun 350.4 mg 필요, - (25g 마우스 기준 두당 용량 Zoletil 2.4 mg, Rompun 0.6 mg, 0.9% 식염수에 섞어서 사용) × 768 마리 × 3회 주입 = Zoletil 5529.6 mg, Rompun 1382.4 mg 필요 <p>총 1회 주입 (76.8 mg) + 2회 주입 (1401.6 mg) + 3회 주입 (5529.6 mg) = 7008 mg</p> <p>※ 부피로 계산했을 때</p> <ul style="list-style-type: none"> - (25g 마우스 기준 두당 용량 Zoletil 0.096 ml, Rompun 0.024 ml, 0.9% 식염수에 10배 희석해서 사용) × 32 마리 × 1회 = Zoletil 3.072 ml, Rompun 0.768 ml 필요, - (25g 마우스 기준 두당 용량 Zoletil 0.096 ml, Rompun 0.024 ml, 0.9% 식염수에 10배 희석해서 사용) × 292 마리 × 2회 = Zoletil 56.064 ml, Rompun 14.016 ml 필요, - (25g 마우스 기준 두당 용량 Zoletil 0.096 ml, Rompun 0.024 ml, 0.9% 식염수에 10배 희석해서 사용) × 768 마리 × 3회 = Zoletil 221.184 ml, Rompun 55.296 ml 필요 <p>총 1회 주입 (3.072 ml) + 2회 주입 (56.064 ml) + 3회 주입 (221.184 ml) = 280.32 ml</p> <p>280.32 ml / 5 ml (5 ml zoletil 1 바이알 기준) = 56.064 바이알</p> <p>따라서 총 zoletile 57 바이알이 필요</p>	참여연구원	
진통(Analgesics)			V
기타방법(Others)	① Isoflurane ② O2에 2.5% ③ 흡입마취 / 1회	연구책임자 및 참여연구원	

6-2. 안락사 방법 (Method of Euthanasia)	Operator
CO ₂	김재익

- * 일반적으로 물리적 방법(경추탈골, 단두)보다 화학적 방법(흡입약제, 주사제, CO₂)을 권장합니다.
* 안락사에 대한 2007년 미국 수의사회 가이드라인(AVMA Guideline on Euthanasia : Formerly Report of the AVMA Panel on Euthanasia, 2007) : <http://www.avma.org/resources/euthanasia.pdf>참고

6-3. 수술 후 관리(*생존성 수술인 경우, 약제종류/용량/투여방법/횟수 등) (Postoperative Care (Describe agent name, dose and route in the survival surgery))	실시자 (Operator)	No search remarks (v)
항생제 투여 (Antibiotics Therapy)		V
진통제 투여 (Analgesics Therapy)	Ketorolac, 1 mg/kg, 정맥주사	
기타 (Others)	1. Brain surgery 이후 마우스의 회복을 돕기 위해 포도당 /식염수(5% dextrose in saline)를 IP 주사로 전달(마우스 당 200 ul 주사). 2. 마취로 인해 수술중과 후에 떠져있는 눈의 각막을 보호하기 위해 눈용 항생연고를 적당량 눈에 발라줌 (ophthalmic eye ointment, antibiotics 포함 또는 미포함, 젤타입)	연구책임자 및 참여연구원

6-4. 인도적인 실험 종료의 기준 (*만약 인도적인 안락사 기준이 필요 없을 시라도 그 사유에 대하여 기술해 주십시오.) (Criteria of Endpoint in Animal study (*If don't need criteria, describe what the reason))	No search remarks (v)
실험 중 임상증상의 발현 등이 관찰되거나 감염 등으로 인해 비슷한 주령의 정상동물의 체중과 비교하여 20%이상의 체중감소가 있을 시 실험을 중단하고 안락사 예정	

- * 동물에 극도의 통증 또는 스트레스를 가하는 결과가 예상되는 경우, 적절한 중재, 인도적인 실험종료(humane endpoint) 또는 안락사를 취하기 위한 기준을 제시하여 주십시오. (예: 통증으로 인한 사료섭취량의 감소나 정상 체중의 20% 이상 체중감소 시, 정상 체중의 10%를 초과하는 종양의 형성, 발암 실험의 경우 암 병소의 지름이 20mm이상 발생 시 등)

7. 생물학적 위해 물질 실험 (Animal Study using Biohazards)

- * 안전성 관련 서류를 계획서에 첨부해 주십시오. (예: RI 동위원소의 경우 "방사성동위원소 사용허가증" 첨부, 생물학적 안전도에 대한 근거자료 및 LMO신고서류 등)
* Infectious agent의 경우 미국 CDC의 Biological level을 참조하시기 바랍니다. 판매처에 근거자료를 요청하시면 편리합니다.
* 생체효능검증실은 BSL 1~2 등급의 생물학적 위해물질을 이용한 동물실험이 가능한 시설입니다. 그 외 병원균을 이용한 실험은 생체효능검증실로 문의해 주십시오. (이용 가능 물질 : 유전자재조합지침 별표2 참고)

7-1. 실험과정 중 방사선 핵종, 생물학적 물질, 위험 화학물, 재조합 DNA 등을 투여하	No search
---	-----------



는 경우 (Injection of Radionuclides, Biological agents, hazardous chemicals, recombinant DNA and Others)				remarks (v)
투여 물질(Agent): Adeno-associated virus (AAV viral vector), wild-type virus 아님				
용량 및 횟수(Dose): 마우스 뇌 각 반구(R and L hemisphere)별 500 ~ 900 ul 주입(1회)				
투여 방법(Route): Stereotaxic injection				
처리 방법(Disposal Method): 바이러스 용기(e-tube)의 경우 의료폐기물로 처리				
위해도 유무 및 정도(Infectious potential of Biohazards): 위해도 없음				
N	동물 → 사람 전염 가능성 (Animal to person)	N	동물 → 동물 전염 가능성 (Animal to Animal)	
N	생물 유해 물질이 동물에서 배출될 가능성 (Excretion)	배출 경로(Excretion route) :		
7-2. 생물학적 안전도 (생물학적 물질을 투여하는 경우)(v) (Bio-safety Level)				No search remarks (v)
Grade	BS- I	BS- II	BS- III	BS- IV
	V			

8. 동물실험의 내용 (Outline of Animal Study)

- * 실험동물에 행해지는 동물실험의 내용에 관하여 상세히 기술해 주십시오.
특히 실험동물을 각 군으로 나눌 경우 이에 관하여 상세히 기술하십시오.
- * 비전문가도 이해할 수 있는 용어로 써주시고, 인간과 동물복지, 학문 및 사회발전에 미치는 영향에 대해 설명하여 주십시오.
- * 필요한 만큼 칸을 확장하여 기술해 주십시오.
- * 필요한 경우, 관련 서류를 첨부해 주십시오.

8-1. 동물실험의 목적과 예상되는 성과 (Objective and Expected Results of Animal Study)

O-GlcNAcylation은 생물 시스템에 존재하는 post translational modification의 일부로서, CNS에서 높은 수치를 보인다. 이전의 연구에서 neuron에서의 O-GlcNAcylation 조절이 synaptic transmission 변화를 유도했을 뿐만 아니라 Alzheimer's disease, Parkinson's disease 등 neurodegenerative disease의 병적 양상을 심화시킨다는 실험 결과가 보고된 바 있다. 기존에는 뇌에서 O-GlcNAcylation 연구는 주로 neuron을 대상으로 이루어졌지만 최근 astrocyte와 oligodendrocyte을 대상으로 한 논문이 발표되면서 neuron뿐만 아니라 glia 세포에서도 O-GlcNAcylation은 중요한 역할을 할 것으로 사료된다. 그러나 현재까지 microglia 내 O-GlcNAcylation의 역할은 알려진 바가 없다. microglia가 CNS의 주된 면역세포이고, 면역 기능 이외에도 synapse engulfment, neurogenesis 조절, 뇌혈관 투과성 조절 등 다양한 역할을 수행한다는 점을 미루어봤을 때, microglia 내에서 O-GlcNAcylation의 조절이 다방면으로 영향을 끼칠 것으로 예상된다. 나아가, microglia의 기능 조절이 주변 neuron의 기능적, 구조적 변화를 야기할 것으로 기대된다.

8-2. 동물실험 계획 및 방법 (구체적인 기술)

(Schedule and Methods of Animal Study (Describe detail))

[1년차: 실험승인일 ~ 2024.07.09]

Microglia OGT cKO 마우스 모델 형성 및 OGT cKO에 따른 microglia 변화 관찰

1) Microglia OGT cKO mouse breeding

CX3CR1-Cre/+ Male mouse와 OGT (fl/fl) female mouse의 교배를 통해 태어난 CX3CR1-Cre/+;OGT(fl/fl) 또는 CX3CR1-Cre/+;OGT(fl/Y) mouse를 실험에 사용한다. control group으로는 CX3CR1-Cre/+ male mouse와 WT female mouse에서 태어난 CX3CR1-Cre/+를 사용하였다.

성인 주령에서 선택적으로 OGT를 제거하기 위하여, 태어난 후 4주가 되는 시점에 tamoxifen을 injection하여 Cre recombinase의 핵으로의 이동을 유도하였다. 따라서 언급되는 모든 KO mouse는 4주차 되는 시기에 corn oil에 녹인 tamoxifen을 i.p. injection 할 것이며, control mouse에는 corn oil만 injection한다.

2) O-GlcNAcylation cKO에 따른 microglia의 기능적, 구조적 변화 관찰

CX3CR1-Cre/+;OGT(fl/fl or Y) = 184

CX3CR1-Cre/+ = 184

생후 8주가 되는 mouse를 대상으로 면역조직염색법을 시행한다. microglia는 brain에 존재하는 대식세포로서 brain damage뿐만 아니라 neuron의 흥분성에도 반응할 정도로 주변의 변화를 민감하게 감지한다. 따라서 O-GlcNAcylation은 microglia의 다양한 역할에 영향을 끼쳤을 것으로 보이는데, 이를 관찰하기 위해서 먼저 IBA-1 염색을 통해서 microglia의 구조적 변화를 분석한다. 이후 리소솜 용적을 가늠할 수 있는 CD68과 pro-inflammatory cytokines (TNF α , IL-1 β , IL-6 등)을 염색하여 microglia의 주된 기능이라고 할 수 있는 대식 작용 및 염증 반응 유도 cytokines 분비의 변화를 관찰하고자 한다. 또한, microglia는 뇌 뿐만 아니라 척수에서도 axon regrowth, pain 등을 조절한다고 알려져 있다. 특히, microglia에서 높은 발현도를 보이는 p2X4 channel은 pain sensitivity를 직접적으로 조절하는 주요 단백질이라고 알려져 있다. 따라서 OGT cKO 후 척수에서의 변화를 관찰하고자 Kv1.3, p2x4, CD68등을 염색하여 관찰할 것이다. 한편, microglia의 변화에 따른 주변 synapse 및 neuron의 활성 차이를 비교하기 위해서 모든 마우스는 neuron type을 바이러스로 표지하고자 한다. 따라서 두 번 각각 마취한 후 AAV-CaMKII α -GFP와 AAV-mDlx-mCherry를 각각 AAV injection할 것이다. 이후 면역조직염색법을 시행하기 위해 마취한 후 cardiac perfusion을 시행할 예정이다.

[2년차: 2024.07.09~2025.07.09]

1) microglia의 전기생리학적 변화 관찰

CX3CR1-Cre/+;OGT(fl/fl or Y) = 50

CX3CR1-Cre/+ = 50

모든 마우스는 neuron type을 바이러스로 표지하고자 한다. 따라서 두 번 각각 마취한 후 AAV-CaMKII α -GFP와 AAV-mDlx-mCherry를 각각 AAV injection할 것이다. 이후 Microglia의 전기생리학적 변화를 관찰하고자 한다. microglia는 neuron과 다르게 흥분성 세포는 아니지만 최근 THIK-1와 같은 leaky potassium channel이 ramification, surveillance와 같은 기능을 조절한다는 연구가 발표되었다. 따라서 O-GlcNAcylation 제거에 따른 voltage dependent channel의 전도도의 변화를 관찰하기 위하여 whole cell patch clamp를 시행할 것이다. 이후 voltage dependent potassium channel blocker인 4-AP, TEA를 처리하여 voltage dependent potassium channel 인지 검증하고자 한다. 또한 microglia 내 O-GlcNAcylation 부재로 인해 야기된 주변 synapse의 변화를 miniature recording을 통해 관찰하고자 한다. 이때 실험 중 TTX, D-AP5를 처리하여 neuron의 action potential 발생을 막은 후, spontaneous vesicle release를 관찰할 것이다.

2) O-GlcNAcylation 조절에 따라 상이하게 발현하는 유전자군 확보

CX3CR1-Cre/+;OGT(fl/fl or Y) = 200

CX3CR1-Cre/+ = 200

Neuroinflammation을 brain에 직접적으로 유도하기 위해서 LPS를 마취한 후 ventricle에 injection할 것이다. 선행 연구에 의하면 O-GlcNAcylation은 transcription factor (TF) protein에 많은 수로 존재하며, O-GlcNAcylation의 유무는 해당 TF에 의해 조절되는 유전자들의 발현량에도 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 따라서 neuroinflammation 유도 후 O-GlcNAcylation에 의해 다르게 발현되는 microglia의 유전자군을 알아내어 변화된 cellular pathway를 규명하고자 한다. 이를 위해 qRT-PCR을 수행하고자 한다. 이에 앞서, microglia 세포 분리를

위하여 필요한 GFP-magnetic bead 사용을 위해 마취하여 AAV-Flex-GFP를 injection할 것이다. qRT-PCR은 마취 후 microglia 세포 분리 과정이 필수적이다. 특정 뇌 부위를 절제하여 microglia cell 분리를 진행하여야 하기 때문에 최소 8마리의 마우스의 뇌 부위 절제 후 모아 세포 분리를 진행할 것이다. 또한, 학습에 의한 neurotransmission 반응 차이를 비교하기 위하여 뇌 샘플링 전 운동, 감각, 인지, 학습과 기억 등을 측정하는 동물행동분석 실험을 수행할 예정이다.

[3년차: 2025.07.09.~2026.07.09]

1) microglia의 OGT KO에 따른 neurotransmission 변화

CX3CR1-Cre/+;OGT(fl/fl or Y) = 96

CX3CR1-Cre/+ = 96

앞선 계획에서 면역조직염색법을 통해 synapse 수의 변화를 확인한 후 구조적 변화가 neurotransmission로까지 이어졌는지 recording을 통해 확인하고자 한다. 이를 위해서 AAV-mDlx-mCherry virus와 AAV-Flex-GFP virus를 각각 마취한 후 뇌에 injection하였으며 21일이 경과한 후 sacrifice하여 recording을 시행할 것이다.

2) 5XFAD mouse model 형성 및 microglia에 의한 변화 관찰

CX3CR1-Cre/+;OGT(fl/fl or Y) = 16

CX3CR1-Cre/+ = 16

Microglia는 정상 상태뿐만 아니라 Alzheimer's disease, Parkinson's disease 등 neurodegenerative disease에도 기여하는 것으로 알려져 있다. 특히 Alzheimer's disease 유도 mouse인 5xFAD mouse에서 amyloid beta protein의 대식 작용을 통해 neuron에 치명적인 단백질들의 제거에도 도움을 주며, 나아가 neuron의 생존능력 향상에 영향을 끼친다. 따라서 O-GlcNAcylation에 따른 microglia의 변화가 다소 어린 8주 가량의 마우스 뿐만 아니라 6달 이상의 마우스에게는 어떤 영향을 끼치며, 나아가 Alzheimer's disease의 병 증상 완화에도 도움을 주는 지 관찰하고자 한다.

