

	Dossier: AVD10800202216383	
		Aanwezig
1	NTS	X
2	Aanvraagformulier	X
3	Projectvoorstel	X
4	Bijlage beschrijving dierproeven	2X
5	DEC-advies	X
6	Ontvangstbevestiging	X
	Evt. Vragen CCD aan aanvrager	X
	Evt. antwoorden aanvrager	X
7	Beschikking en vergunning	X

NIET-TECHNISCHE PROJECTSAMENVATTING

Naam van het project	Het ontrafelen van de moleculaire en cellulaire mechanismen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling, functie en onderhoud van zenuwcellen
NTS-identificatiecode	NTS-NL-488046 v.1, 05-12-2022
Land	Nederland
Taal	nl
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	Zenuwcel Ontwikkeling van zenuwcellen zenuwcelverbinding transport plasticiteit
Doel(en) van het project	Fundamenteel onderzoek: Zenuwstelsel

DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).	Ons zenuwstelsel (hersenen en ruggenmerg) bestaat uit miljarden zenuwcellen. Zenuwcellen zijn zeer complex van vorm en maken via gespecialiseerde structuren (synapsen) contact met elkaar voor het doorgeven van signalen. Om de ontwikkeling en het functioneren van dit complexe zenuwstelsel goed te laten verlopen is het belangrijk dat de eiwitten die zenuwcelfuncties uitvoeren op de juiste plaats aanwezig zijn. Onze kennis over de moleculen die het ontstaan, vervoeren en de juiste plaats geven van deze eiwitten regelen is incompleet. Het doel van dit project is om de mechanismen te ontrafelen die ten grondslag liggen aan het ontstaan, het vervoeren en het plaatsen van eiwitten in zenuwcellen. Uiteindelijk willen we begrijpen hoe deze mechanismen betrokken zijn bij de ontwikkeling, het onderhoud en het functioneren van zenuwcellen in ons zenuwstelsel. Verstoringen van deze moleculaire mechanismen kunnen de ontwikkeling en werking van zenuwcellen op een bepaalde manier verstoren, wat kan leiden tot neurologische aandoeningen. Door te begrijpen welke moleculaire mechanismen belangrijk zijn voor de complexe werking van onze zenuwcellen, komen we meer te weten over zowel het gezonde als het zieke zenuwstelsel. In de afgelopen jaren heeft ons vorige werk bijgedragen aan de wetenschappelijke mogelijkheden om deze mechanismen te bestuderen.
Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).	Voortbouwend op ons vorige werk, door ons ontwikkelde technieken en infrastructuur en onze gespecialiseerde kennis, hebben we een aantal nieuwe doelen. Wij willen bepalen welke moleculen verantwoordelijk zijn voor het vervoeren van eiwitten en op welke plek in zenuwcellen eiwitten terecht komen. Ook willen we bekijken hoe de verdeling en de positie van deze eiwitten bijdraagt aan de werking van zenuwcellen. Dit kunnen we doen door kunstmatig de positie van eiwitcomplexen te manipuleren. We willen specifiek bekijken hoe dit de ontwikkeling van zenuwcellen en de verbindingen tussen zenuwcellen (synapsen) en hun werking beïnvloedt. Deze experimenten zullen worden uitgevoerd in zowel gekweekte hersencellen als hersenweefsel, waardoor we het functioneren van zenuwcellen op zowel individueel als op systeemniveau beter zullen begrijpen. Tot slot willen we bekijken welke van deze moleculaire mechanismen aangedaan zijn bij het ontstaan van de ziekte van Alzheimer. Dit onderzoek zal leiden tot een beter begrip van de ontwikkeling en het functioneren van zenuwcellen, wat als basis dient voor het verkennen van therapeutische mogelijkheden voor neurologische aandoeningen.

VOORSPELDE SCHADE

<p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>	<p>De dieren worden gedood zodat we vervolgens zenuwweefsel uit de dieren kunnen halen. Voorafgaand aan het doden wordt er niets met de dieren gedaan. Ze worden normaal verzorgd.</p>					
<p>Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?</p>	<p>We verwachten geen negatieve gevolgen voor het welzijn van de dieren. Het doden van dieren wordt door getrainde en ervaren onderzoekers uitgevoerd en veroorzaakt geen pijn voor de dieren.</p>					
<p>Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?</p>	<p>Soort:</p>	<p>Totaal aantal</p>	<p>Geraamde aantallen naar ernstgraad</p>			
			<p>Terminaal</p>	<p>Licht</p>	<p>Matig</p>	<p>Ernstig</p>
	<p>Muizen (Mus musculus)</p>	<p>170</p>	<p>0</p>	<p>170</p>	<p>0</p>	<p>0</p>
	<p>Ratten (Rattus norvegicus)</p>	<p>6136</p>	<p>0</p>	<p>6136</p>	<p>0</p>	<p>0</p>
<p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>	<p>Soort:</p>	<p>Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</p>				
			<p>Hergebruikt</p>	<p>Teruggeplaatst</p>	<p>Geadopteerd</p>	
<p>Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.</p>	<p>Voor het verkrijgen van zenuwweefsel is het noodzakelijk om de dieren te doden.</p>					

TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

1. Vervanging

Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.

Ons project wordt verricht op zenuwcellen. Deze zenuwcellen zijn niet-delende cellen, wat inhoudt dat ze niet vermeerderd kunnen worden. Om deze reden moeten we herhaaldelijk nieuwe zenuwcellen uit dieren halen. Veel moleculen en eiwitten hebben een specifieke functie in zenuwcellen die dus niet bestudeerd kan worden in andere cellen. Bovendien is de omgeving van zenuwcellen belangrijk voor hun functioneren. Daarom is het nodig om de te bestuderen mechanismen binnen het weefsel te bekijken. Dit kunnen we momenteel niet nabootsen in een kweekschaal.

2. Vermindering

Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.

De onderzoeksplannen in ons project zijn gebaseerd op uitgebreid vooronderzoek. Gebruikte technieken zijn geoptimaliseerd door jarenlange ervaring. Indien mogelijk worden verkennende experimenten uitgevoerd in niet-zenuwcellijnen waar geen dieren voor nodig zijn. Daarna doen we onderzoek in gekweekte zenuwcellen. Vervolgens maken we eerst gebruik van kleinschalige 'pilot/test'-experimenten om onze methoden te optimaliseren en te berekenen hoeveel dierlijk materiaal minimaal nodig is om tot wetenschappelijk verantwoorde conclusies te kunnen komen uit onze experimenten. De gekweekte zenuwcellen worden bereid door een vast team met veel ervaring, waardoor kwaliteit gewaarborgd blijft en een zo optimaal mogelijke hoeveelheid zenuwcellen uit de dieren kan worden gehaald. Hierdoor gebruiken we zo min mogelijk dieren. Verder worden de gekweekte zenuwcellen gedeeld met meerdere onderzoeksgroepen binnen de afdeling, en overgebleven dierenweefsel wordt gedeeld met andere onderzoeksgroepen in de omgeving. Voor de meest veelbelovende moleculen die uit onze experimenten met gekweekte cellen naar voren komen, maken wij de overstap naar onderzoek met intact hersenweefsel. Hierbij maken wij gebruik van de nieuwste technieken en materialen, en zorgen wij dat, wanneer mogelijk, meerdere onderzoeksvragen beantwoord kunnen worden met hetzelfde weefsel.

3. Verfijning

Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling, pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf de mechanismen om gedurende de looptijd van het project nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.

We hebben jarenlange ervaring met het hanteren van dieren, wat het mogelijke ongerief van de dieren tot een minimum beperkt. Verder hebben we veel ervaring met het maken van gekweekte zenuwcellen en het werken met hersenweefsels, waardoor we efficiënt en optimaal kunnen werken. Dit werk wordt gedaan door zeer getrainde en ervaren onderzoekers.

Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe

Ratten en muizen lijken qua ontwikkeling en werking van hun zenuwstelsel sterk op de mens. Dit maakt hun zenuwcellen en weefsel uitermate geschikt om onze onderzoeksvragen te beantwoorden. De antwoorden zijn in veel gevallen te vertalen naar het gezonde en zieke zenuwstelsel van de mens. Het gebruikte van gekweekte zenuwcellen uit rattenembryo's en het weefsel uit muizen en ratten is de internationale standaard. Hierdoor is ons onderzoek goed te vergelijken met ander onderzoek in de wereld. Voor het kweken van zenuwcellen maken wij gebruik van hersenweefsel uit rattenembryo's omdat hier meer materiaal uit gehaald kan worden dan bij muis en wij de meeste ervaring hebben met dit systeem. Voor het verkrijgen van weefsel maken wij ook voornamelijk gebruik van rat, maar ook muis omdat genetische modellen (Cas9 en Alzheimer model) alleen in muis ontwikkeld en gevalideerd zijn.

VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT

Project geselecteerd voor BA?	nee
Termijn voor BA	
Reden voor de beoordeling achteraf	
Bevat ernstige procedures	
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

AANVULLENDE VELDEN

Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	
--------------------------------------------------------------	--



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven *Administratieve gegevens*

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl of in de toelichting op de website.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Gegevens aanvrager

- 1.1 Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?
Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.

Ja > Vul uw deelnemernummer 10800

in

Nee > U kunt geen aanvraag doen

- 1.2 Wat voor aanvraag doet u?

Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 1.3

Wijziging > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.1

Melding > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.2

- 1.3 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.

Naam instelling of organisatie Universiteit Utrecht

Titel, voorletters en achternaam van de portefeuillehouder
Titel Voorletters Achternaam Dhr. Mw

E-mailadres contactpersoon info@ivd-utrecht.nl

Titel, voorletters en achternaam van de diens gemachtigde (indien van toepassing)
Titel Voorletters Achternaam Dhr. Mw
n.v.t.

E-mailadres gemachtigde

- Vul de gegevens van het postadres in.

Straat en huisnummer Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht 50

Postcode en plaats 3584 CJ UTRECHT

Postbus, postcode en plaats 80125 3508 TC UTRECHT

- 1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters Dhr. Mw.

Functie Universitair Docent

Afdeling

Telefoonnummer

1.5	<i>(Indien van toepassing)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	E-mailadres	[REDACTED]
		(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
		Functie	Universitair Docent
		Afdeling	[REDACTED]
1.6	<i>(Indien van toepassing)</i> Vul hier de gegevens in van de persoon aan wie de portefeuillehouder de verantwoordelijkheid inzake de algemene uitvoering van het project en de overeenstemming daarvan met de projectvergunning heeft gedelegeerd.	E-mailadres	[REDACTED]
		(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	
		Afdeling	
1.7	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de Instantie voor Dierenwelzijn	Telefoonnummer	030-2531569
		E-mailadres	info@ivd-utrecht.nl
1.8	Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	<input type="checkbox"/> Ja > <i>Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag</i> <input checked="" type="checkbox"/> Nee	

2 Over uw aanvraag

2.1	Gaat uw aanvraag over een <i>wijziging</i> op een vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3 <input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder kort de wijziging en de onderbouwing daarvan weer. Geef in de originele formulieren (niet-technische samenvatting, projectvoorstel en bijlage dierproeven) duidelijk aan (bij voorbeeld in een andere kleur) waar de projectaanvraag wijzigt. Ga daarna verder met vraag 6.
2.2	Gaat uw aanvraag over een <i>melding</i> op een vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3 <input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder weer wat deze melding inhoudt en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

3.1	Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum	1 - 1 - 2023
		Einddatum (t/m)	1 - 1 - 2028
3.2	Wat is de titel van het project?	Molecular and cellular processes controlling the development, maintenance and plasticity of neurons	
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Het ontrafelen van de moleculaire en cellulaire mechanismen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling, functie en het onderhoud van zenuwcellen	
3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) van voorkeur?	Naam DEC	DEC Utrecht
		Postadres	Postbus 85500 3508 GA Utrecht
		E-mailadres	dec-utrecht@umcutrecht.nl

4 Factuurgegevens

4.1 (indien factuuradres afwijkt van de gegevens uit vraag 1.3) Vul de gegevens van het factuuradres in.	Naam: UU-ASC	Afdeling:	
	Straat:		Huisnummer:
	Postcode:	Plaats:	
	Postbus: 80.011	Postcode: 3508TA	Plaats: UTRECHT
	E-mail: asc.factuur@uu.nl		
4.2 (optioneel) Vul hier het ordernummer van de instelling in.	Ordernummer: CB.841910.3.01.011		

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?	Verplicht
	<input checked="" type="checkbox"/> Projectvoorstel Aantal bijlage(n) dierproeven 2
	<input checked="" type="checkbox"/> Niet-technische samenvatting
	Overige bijlagen, indien van toepassing
	<input type="checkbox"/> Melding Machtiging
	<input type="checkbox"/>

6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD en per post naar de Centrale Commissie Dierproeven (voor adresgegevens zie website)
- Ondertekening door de portefeuillehouder namens de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.8). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
 - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
 - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel C van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
 - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
 - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam	[Redacted]
Functie	[Redacted]
Plaats	Utrecht
Datum	12 - 6 - 20
Handtekening	[Redacted]



Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10800
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Utrecht University
1.3 Provide the title of the project.	Molecular and cellular processes controlling the development, maintenance and plasticity of neurons

2 Categories

2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.	<input checked="" type="checkbox"/> Basic research
	<input type="checkbox"/> Translational or applied research
	<input type="checkbox"/> Regulatory use or routine production
	<input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal
	<input type="checkbox"/> Research aimed at preserving the species subjected to procedures
	<input type="checkbox"/> Higher education or training
	<input type="checkbox"/> Forensic enquiries
	<input type="checkbox"/> Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.1.

Neurons are highly complex cells that arbor long and branched extensions to connect with other neurons to form intricate neuronal networks that process and store information. Neurons contain of two morphologically and functionally distinct compartments: the somatodendritic and the axonal compartment. This polarized architecture is fundamental to neuronal function, as it allow directional signaling. At the same time, the vast and complex morphology of neurons exerts a high demand on the processes that underlie the trafficking of material to the correct subcellular destination. To maintain cellular homeostasis, and to rapidly accommodate to changes in environmental cues or synaptic activity, neurons are endowed with a complex cellular machinery that allows the correct sorting of

material to their defined subcellular destination. Receptors, ion channels, adhesion complexes, and other critical membrane components are synthesized, assembled and processed in the ER, from where they undergo a series of intracellular trafficking events that lead to the full maturation and delivery of receptors to the cell surface. Ultimately, surface expressed proteins reach the synapse via lateral diffusion and anchor via interactions with scaffolding proteins that are abundantly present at synapses. Each of these steps is tightly controlled by molecular complexes that impinge on the newly formed protein complexes and are dynamically modulated by extracellular cues and changes in synaptic activity patterns. Importantly, these processes critically rely on the neuronal microtubule-based cytoskeleton that mediates and guides long-range transport of cargo-loaded vesicles to their correct subcellular destination, but also controls neuronal morphology, and compartmentalizes important signaling events. Not surprisingly, dysregulation of these process has been implicated in numerous nervous system disorders, including autism spectrum disorders (ASD), schizophrenia, and Alzheimer's disease (AD).

Our lab has contributed to recent technological advances in fluorescence microscopy that allow the study of these trafficking events and cytoskeletal dynamics at high spatial and temporal resolution, and have rapidly expanded our understanding of how membrane trafficking and cytoskeletal dynamics control key neuronal processes such as molecular transport, polarity, signaling, and plasticity [REDACTED]. Moreover, using novel CRISPR/Cas9-based genome editing tools we developed we can now specifically visualize, and manipulate endogenous molecular components [REDACTED]. This diverse toolset allowed us to tackle outstanding questions in the cell biology of neurons at unprecedented resolution and precision. Using these techniques, in the past years we revealed new insights in how motor proteins transport cargoes over long distances in neurons (see e.g., [REDACTED] how specific subcellular organelles contribute to the maintenance of neurons [REDACTED], and how synaptic proteins are distributed within and around synapses to control synaptic transmission and plasticity [REDACTED]. These cell biological studies provided new insights in how specific proteins are distributed and contribute to the trafficking of protein complexes to specific compartments of neurons.

In this basic research project we will employ these technologies to further investigate the mechanisms that control the biogenesis, trafficking and positioning of protein complexes to and within subcellular compartments of neurons. Because these mechanisms contribute to the development, maintenance and plasticity of neurons, these studies will be of significant relevance to understanding these fundamental processes that underlie proper brain functioning. Even further, since dysregulation of these processes is broadly held to cause neurodevelopmental and degenerative disorders these studies will help to understand the pathogenic mechanisms involved in neurological disorders at the molecular, cellular and systems levels. On basis of our previous work, publications from other groups in the field, public databases (e.g., SynGO, Allen Brain Atlas), and available capacity, we can make an initial selection of 500 candidate proteins for which evidence is available that these are expressed in neurons and contribute to the processes we aim to investigate (molecular transport, polarity, signaling, and plasticity). Starting with this selection we will investigate how these proteins are dynamically distributed in neurons which proteins are key in regulating these processes, how changes in environmental cues or synaptic activity alter the distribution and dynamics of these proteins and whether these proteins are deregulated in disease processes.

Our work over the past 5 – 10 years has contributed to the development of a diverse experimental toolset to approach these directions and a broad basic understanding of these processes. In particular, using molecular and imaging approaches we can now label, manipulate and visualize proteins at high resolution and specificity. This has led to the discovery of new molecular pathways controlling neuronal functions and revealed new insights in how dysregulation of these processes can lead to neuronal disorders. This information can thus also provide a basis for the development of effective therapeutic strategies for neurological disorders such as Alzheimer's disease (AD), autism spectrum disorders (ASD), and amyotrophic lateral sclerosis (ALS). We for instance revealed that mutations in proteins associated with ASD disrupt the trafficking of synaptic receptors [REDACTED]. In this project, we will continue working on how mutations in Shank proteins alter synaptic processes. Moreover, since we know that the accumulation of A β in the brain of AD patients is strongly associated with the decline in synaptic and cognitive functioning, we will further investigate how A β disrupts synaptic structure and function at the molecular levels. Another hallmark of AD, the hyperphosphorylation of tau is known to hamper long-range transport in neurons. Thus, studying how these disease processes alter the processes we study (molecular transport, polarity, signaling, and plasticity), will help us reach a firm mechanistic understanding of how molecular processes in neurons are regulated in physiological conditions, but will also provide new insights in how these diseases develop. Treatments that reverse these specific disruptions could thus be developed as a new approach to treat such disorders.

In the coming five years, these approaches enable us to discover new biological insights in the mechanisms that control the biogenesis, trafficking and positioning of protein complexes to and within subcellular compartments of neurons. An important next frontier is to perform mechanistic studies addressing these questions in intact brain tissue preparations such as organotypic slice cultures and brain tissue from healthy and disease rodent models. In the longer term, this work will provide a mechanistic understanding of the development, maintenance and function of neurons in the central nervous system in health and disease.

3.2 Purpose

3.2.1 Describe the project's immediate and ultimate goals. Describe to which extent achieving the project's immediate goal will contribute to achieving the ultimate goal.

- If applicable, describe all subobjectives

The goal of this project is to define the mechanisms that control the biogenesis, trafficking and positioning of protein complexes to and within subcellular compartments. Ultimately, the overall goal is to understand how these cellular processes drive the development, maintenance and function of neurons in the central nervous system in health and disease.

Specifically, we will focus on:

- 1) intracellular trafficking mechanisms along the secretory pathway that drive the synthesis and maturation of neuronal protein complexes,
- 2) cytoskeleton-based transport mechanisms that mediate the long-range transport of protein complexes to their proper subcellular destinations,
- 3) the molecular mechanisms that control the composition and organization of molecular components at synapses.

3.2.2 Provide a justification for the project's feasibility.

These specific aims are a continuation of work currently ongoing in the group and is strongly embedded in the division of [REDACTED]. The preparation of dissociated hippocampal cultures and organotypic slice cultures is a centralized activity within the Division, ensuring high quality, reproducibility, comparisons and translation of results among individual researchers. The group is also part of the [REDACTED] which is an advanced microscopy facility with a focus on live cell imaging that provides access, support and training for researchers within our biology department, but also for researchers from outside. Expertise in the Division ranges from molecular biology, protein biochemistry, neurophysiology, generation of disease mouse models, to biophysics and advanced imaging, including super-resolution imaging. The Division has a state-of-the-art infrastructure to support excellent multidisciplinary research and strongly focuses on advanced live-cell imaging approaches to study cell biology. To further facilitate the application transgene expression and genome editing in organotypic slice preparations we have set up the infrastructure to produce Adeno-Associated Virus (AAV).

The department/division has a long-standing internationally recognized track record in basic and translational neuroscience research. This is illustrated by numerous publications on this topic (many in respected journals), received (inter)national funding (several ERC starting and consolidator grants) and is frequently asked to share data at leading international conferences. The group is part of several international consortia and has international collaborations with other groups. Altogether, based on our previous work and extensive experience with the described research strategy (3.4), our expertise in molecular neuroscience and microscopy, and the available infrastructure as summarized above, we are confident to achieve the key objectives within the coming five years.

3.2.3 Are, for conducting this project, other laws and regulations applicable that may affect the welfare of the animals and/or the feasibility of the project?

No

Yes > Describe which laws and regulations apply en describe the effects on the welfare of the animals and the feasibility of the project.

[Click or tap here to enter text.](#)

3.3 Relevance

3.3.1 What is the scientific and/or social relevance of the objectives described above?

Our results will contribute to a better understanding of many fundamental aspects of neuron functioning, specifically long-range intracellular transport, neuronal organelle organization and dynamics, structure and function of synapses. These processes are key to the proper functioning of neurons. Understanding these processes has thus direct relevance for comprehending the factors that contribute to neuronal development, maintenance, as well as aspects of neuronal plasticity that underlies cognitive processes such as learning and memory. In addition, this project will further develop exciting new technological developments in the group such as CRISPR/Cas9 genome editing, optogenetics and advanced microscopy techniques that will broadly impact the field.

Importantly, since dysregulation of these processes are broadly held to underlie the development of neurodevelopmental disorders as well neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease (AD), these findings also have a broader societal relevance. In the field of neurodevelopmental and neurodegenerative diseases, there is a general agreement that the currently available pharmacological strategies are insufficient. Therefore, these interventions will not lead to a level of repair that is required to allow patients to return to a normal life. Hence, the long-term goal of the research in this field should be the development of effective therapeutic strategies. However, therefore it is essential to better characterize and understand the affected molecular pathways. Ongoing projects on molecular pathways that are disturbed in ASD (e.g., Shank proteins; [REDACTED] and Alzheimer's disease bring new insights in the molecular pathology of these disorders. Understanding these molecular pathways at molecular and physiological level, will provide a starting point for correcting the pathological effects of these molecular players in disease. Our research is aimed at providing this basic understanding.

In conclusion, this project is important because it will result in fundamental insights into the mechanisms that if perturbed induce developmental and degenerative neurological disease. These fundamental insights will provide potential therapeutic targets for more successful therapeutic intervention in the future.

3.3.2 Who are the project's stakeholders? Describe their specific interests.

Other scientists interested in molecular and cellular processes that underlie neuronal functioning and neurological disorders, but also more generally scientists interested in advanced fluorescence microscopy, molecular tools, genome editing etc. In the longer term, we hope to provide new molecular targets and could contact other research groups or (pharmaceutical) companies interested in pursuing interesting leads for target characterization and validation. This can lead to therapy development which would eventually be implemented by medical doctors to treat patients.

3.4 Strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy). If applicable, describe the different phases in the project, the coherence, the milestones, selection points and decision criteria.

To understand at a molecular level how proteins are formed, trafficked and distributed at subcellular sites to support development, maintenance, and plasticity of neurons, we use a broad array of experimental (phase 1, 2, and 3) as well as computational (Phase 4) approaches. Combining results from these different approaches is important to gain comprehensive understanding of how molecular processes contribute to neuronal functioning. Below we outline the general workflow in this project. Note that the individual phases are highly interlinked and that for each step, decisions will be made regarding which molecule, molecular and cellular mechanism, cellular compartment (e.g. axon or dendrite), cells or brain region and time-point of neuronal development to focus on.

At the beginning of this project, we aim to select **up to 500** candidate molecules that will be used in phase 1. The selection of these candidate molecules will be based on the following:

- existing data acquired in previous research of our lab or provided by collaborators: e.g., data on expression patterns or function of proteins *in vitro*, identified protein-protein interactions and/or regulations,
- data from available databases: e.g., expression databases such as the Allen Brain Atlas, ontology databases such as SynGO, protein function such UniProt
- close examination of available literature: e.g., based on research on protein function in non-neuronal cells

This selection will include proteins with a predicted or known function (e.g., cytoskeletal proteins, motor proteins, secretory pathway proteins, synaptic scaffold proteins and synaptic membrane proteins).

For phase 2 a selection of **up to 100** molecules will be made based on data from Phase 1. Specifically, we will only retain proteins:

- that are expressed in neurons and can be reliably detected with antibodies, CRISPR/Cas9 labeling or other means
- for which the expression pattern, subcellular localization and dynamics can be confirmed and is in line with predictions from the literature and the predicted function of the protein
- that have sufficient supporting evidence to be relevant for development, maintenance, and plasticity of neurons

For phase 3, we will select **up to 50** candidate molecules based on all prior criteria and the ability to manipulate protein position and knockdown efficiency.

Note that phase 4 will be carried out in parallel to further guide the decisions.

For phase 5 proteins that have been implicated in specific disorders will be selected. For instance, ongoing efforts in the group study mutations in Shank proteins associated with ASD, and trafficking of the amyloid precursor protein (APP) that is implicated in AD.

For this project we use two different model systems are used that require two different animal procedures: 1) dissociated neuronal cultures (see appendix 1) and 2) organotypic slice cultures (see appendix 2). The dissociated neuronal cultures allow us to reveal new molecular insights in a relevant model system that is readily accessible for genetic and pharmacological manipulation and high-resolution dynamic imaging. These results can then be translated to the more physiological organotypic hippocampal slice culture system where neurons are embedded in a more natural environment within the anatomically intact hippocampal circuit.

Phase 1: Determining protein distribution and dynamics in neurons

The first step in understanding protein function is determining where it is formed, how it is trafficked and eventually is localized to support neuronal functions. To do so, we use a number of approaches:

- Biochemical methods to isolate proteins from subcellular fractions of dissociated neuronal cultures to determine the expression pattern of proteins during development, and perform immunoprecipitation in combination with large-scale proteomic profiling to discover new protein-protein interactions.
- We use immunohistochemistry, overexpression of fluorescently tagged proteins and CRISPR/Cas9 tools to tag and visualize neuronal proteins. A large number of validated antibodies and overexpression constructs are readily available. The CRISPR/Cas9 approach is

relatively recently implemented but currently a library of >50 knockin constructs is readily available to reliably tag endogenous proteins in dissociated neuronal cultures. Also, we found this approach is feasible in organotypic slice cultures from the Cas9 transgenic mouse, allowing localization of proteins in the anatomical context of the hippocampus. We therefore plan to also use organotypic slice cultures from the Cas9 transgenic mouse for localization experiments (see appendix 2). Notably, this endogenous labeling approach overcomes many artefacts typically associated with traditional overexpression and antibody labeling approaches.

- We use diverse high-resolution microscopy techniques to study where proteins are localized at subcellular resolution. In general, localization studies can be performed on both dissociated cultures and organotypic slice cultures using confocal laser scanning microscopy. For live-cell imaging approaches such as spinning disk confocal microscopy, TIRF imaging, or single-molecule tracking to study dynamics, turn-over and trafficking of proteins we predominantly use dissociated neuronal cultures. To further delineate how proteins are organized within specific subcellular compartments we use super-resolution microscopy techniques such as PALM, STORM and STED. These techniques achieve up to a 10-fold increase in spatial resolution and can be used to resolve the nanoscale organization of proteins within small structures such as synapses. More recently we also implemented expansion microscopy protocols that allow to study substructure in three dimensions in cultured neurons, but also brain tissue. This techniques is thus well-suited to bridge mechanistic findings in dissociated culture systems to organotypic slice cultures and fixed brain tissue.

These experiments will reveal quantitative insights in protein distribution and dynamics in neurons, a critical first step in understanding the contribution of specific proteins to neuronal functioning. Also, the development of new tools, most notably CRISPR approaches to label endogenous neuronal proteins and optimized expansion microscopy protocols, will provide a rich toolset for other research groups in the field.

Phase 2: Manipulation of protein distribution and dynamics in neurons

To determine the contribution of proteins to the development, maintenance and plasticity of neurons we will continue to develop different molecular tools to study the function of proteins:

- To study the effect of loss-of-function of proteins we generate shRNA knockdown or CRISPR/Cas9 knockout constructs to deplete endogenous proteins in neurons. We use bioinformatics tools to predict efficient targeting sequences and first test and validate the effectiveness and specificity of these sequences in non-neuronal cells to limit the number of validation experiments in animal-derived neurons. Constructs are then tested in dissociated neuron cultures for effectiveness and specificity using Western blot analysis or immunohistochemistry.
- To study gain-of-function of proteins on cellular functions we use overexpression constructs that are designed to drive substantial higher expression levels.
- To manipulate localization of proteins, we use inducible recruitment systems that are based on either a chemical or a light-inducible dimerization system. In the chemical dimerization system, the interaction between two proteins, one tagged with FKBP - the other with FRB, can be induced by addition of rapalog, a synthetic analogue of rapamycin. For the light-inducible system, we will implement the recently optimized iLID (light-inducible dimerization) system. These modules will be introduced in dissociated cultures for optimization of experimental conditions and further tested in organotypic hippocampal slice cultures. This is a very versatile system that can be used to acutely reposition proteins to specific subcellular sites, but also to direct or remove specific organelles, such as transport vesicles or the endoplasmic reticulum, to and from specific subcellular compartments.

These tools allow the specific and efficient manipulation of proteins levels, allowing loss-of-function and gain-of-function experiments in a well-controlled manner. The dimerization tools will furthermore allow acute control over protein function – providing a unique approach to study how protein distribution and dynamics underlie neuronal functioning. We have extensive experience with each of these approaches and are confident that these will allow exciting new research directions by us and others.

Phase 3: Investigating how protein distribution and dynamics contribute to neuronal functioning

Guided by the experiments in Phase 1 and 2, we will continue with mechanistic studies for ~50 candidate proteins and/or molecular pathways. We use different read-outs of neuronal functions depending on the specific research questions:

- To study the effect of protein manipulation on neuronal development and cellular homeostasis, we measure morphological characteristics such as axon length, dendritic branching, spine density. Current analysis pipelines are designed to maximize the number of parameters derived from single neurons, optimizing the use of animal-derived neurons.
- To measure the functioning of neuronal synapses we use optical reporters of synaptic activity. We use for instance fluorescent calcium reporters or fluorescent reporters of neurotransmitter release. These experiments determine synaptic function at the level of individual synapses, and can thus for instance reveal intrinsic differences between synapses along a dendrite of a single neuron. This is a very powerful new approach and importantly, significantly reduces the amount of neuronal preparations, and thus animals, needed for experiments.
- To directly measure the electrical properties of neurons, we use electrophysiological techniques. Using whole-cell patch electrophysiology we can measure 1) parameters of axonal functioning, i.e. action potential generation and conduction, 2) synaptic functioning, by determining the amplitude and frequency of evoked or spontaneous postsynaptic currents, and 3) synaptic plasticity induced by pharmacological or electrical stimulation protocols. These techniques can be used in both the dissociated neuronal cultures as well as the organotypic hippocampal slice system, allowing the direct translation of findings in both systems.

Phase 4: Computational integration of experimental data

An important step is to integrate the experimental data from phase 1, 2 and 3 on how the distribution and dynamics of proteins contribute to neuronal functioning. This is an on-going effort to interpret the data and guide decisions on how to prioritize experiments. To do so, we developed several computational models. Most recently, we implemented the use of MCell/CellBlender, a user-friendly and versatile environment that allows spatially realistic simulations of biochemical interactions and protein dynamics in a 3D “in silico” cellular environment. We will specifically incorporate the dynamics of proteins and their subcellular locations to determine how these properties contribute to neuronal functioning. These studies will guide the experimental directions in Phase 1, 2 and 3 and, importantly, will thereby reduce the number of experiments on cultured neuronal preparations.

Phase 5: Investigating the relevance of molecular pathways to the development of neurological disorders

The basic research questions we address in this project are principally aimed to gain a fundamental understanding of the molecular processes that contribute to neuronal functioning. Since it is increasingly clear that these processes are disturbed in neurological disorders, we will proceed to study how these processes are affected in disease models. Particularly, we will focus on the early events in the development of Alzheimer’s disease. To do so, we implemented several models that mimic the pathological events leading to neurodegeneration (). A key process that is broadly held to promote AD pathology is the excess production and accumulation of secreted amyloid-beta (A β) that is toxic for synapses. To model this, we incubate neurons with oligomeric A β , which affects synapse function and induces neuronal degeneration similar to the pathological events in AD patients. In addition, we study tau pathology that is thought to disrupt particularly long-range transport processes. Thus, by studying how these aspects of the disease (A β accumulation and tau hyperphosphorylation) alter molecular transport, synaptic signaling, and plasticity, we will reach a firmer mechanistic understanding of how these processes in neurons are regulated in physiological conditions. At the same time, these studies will also provide new insights in how these diseases develop and these basis research lines are thus also aimed to discover new molecular targets to treat AD. To bring findings from these studies closer to physiologic systems that can be used to develop therapeutic interventions, we plan to test these approaches in organotypic slice cultures from AD mouse models ().

3.4.2 Provide a justification for the strategy described above.

The molecular and cellular processes we study (e.g., long-range transport, synaptic transmission, neuronal polarity) are unique for neurons. In the proposed research we therefore chose to use primary cultures of rat hippocampal /cortical neurons, and organotypic and acute slice cultures. Because neurons are post-mitotic cells, we depend on primary neuron cultures and will use hippocampal and cortical tissue isolated after killing from rat embryos at E18-E19 (appendix/ procedure 1) and organotypic and acute slice cultures from rodent pups (appendix/ procedure 2). This life stage is chosen because neurons isolated from embryonic brain regions still contain the ability to grow and differentiate *in vitro*. These neurons will then be able to develop and mature further in culture, making them suitable to study both neuron development and mature neurons. These cells can be transfected at different time points during development *in vitro* and analyzed with question-specific methods, such as specific immunocytochemistry analysis or live cell imaging of fluorescent-labeled cellular markers, observed under advanced microscopes. We have considered other viable alternatives before using any animal experiments and will continue to seek scientifically valid alternatives. However, there is no valid alternative in which our approaches can be explored at present. As of yet, there are no cell lines available that mimic neurons sufficiently to study the processes that are the subject of this proposal and the vast majority of studies that investigate the cellular and molecular mechanisms underlying neuronal functioning have been carried out in rat or mouse neurons. As an alternative we have also considered the use of iPSC-derived human neurons as a disease-relevant model system, and in fact we have characterized many aspects of this system in the lab. However, these neurons develop very slowly over the course of many weeks, and do not reach a mature stage where synaptic contacts are made and physiological neuronal networks are formed as in dissociated neuron cultures. Thus, while we acknowledge that some aspects of early neuronal development can be studied in this system, we found that at present the processes we are interested in cannot be studied in this system. In particular, aspects of mature synapse function and mechanisms of AD pathology that are only seen in older neurons cannot be captured in the iPSC-derived human neuron culture system. Encouragingly, current developments in the use of iPSC-derived human neuron culture systems are rapidly improving this system and we will keep considering this option for future studies. Altogether, to put our work in physiological context, it is necessary to carry out our experiments in rodent neurons. Rats are the most commonly used species for the *in vitro* procedures detailed within this proposal.

3.4.3 List the different types of animal procedures. Use a different appendix ‘description animal procedures’ for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Sacrifice pregnant rodents to obtain embryos and prepare primary dissociated neuron cultures
2	Killing of rodent pups to prepare organotypic slice cultures
3	Click or tap here to enter text.
4	Click or tap here to enter text.

5	Click or tap here to enter text.
6	Click or tap here to enter text.
7	Click or tap here to enter text.
8	Click or tap here to enter text.
9	Click or tap here to enter text.
10	Click or tap here to enter text.



Appendix Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10800	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Utrecht University	
1.3 List the serial number and type of animal procedure <i>Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.</i>	Serial number	Type of animal procedure
	1	Sacrifice pregnant rodents to obtain embryos and prepare primary dissociated neuron cultures.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

The procedures described in this project are based on a large body of scientific literature in the field and on our own experimental experience. These animal studies are performed worldwide and therefore make a translation and extrapolation of data between research groups feasible.

The goal of this project is to map the cellular 'itinerary' of neuronal proteins, and define the mechanisms that control the biogenesis, trafficking and positioning of protein complexes to and within subcellular compartments. Ultimately, the overall aim is to understand how these cellular processes drive the development, maintenance and function of neurons in the central nervous system in health and disease.

In order to study these processes at high spatial and temporal resolution and translate to physiologically relevant systems, we will use three different model systems: a) primary dissociated neuron cultures from prenatal rat embryos, b) organotypic hippocampal cultures obtained from postnatal mouse and rat pups and c) acute slice preparations from wildtype and Cas9 transgenic mouse line. For (b) and (c), see Appendix 2.

Neurons are postmitotic cells, and neuron cultures can thus not be maintained as continuous cultures but must be prepared from animal tissue each time. To prepare dissociated neuron cultures brain tissue will be isolated from wildtype rats at prenatal stages E18-E19 and hippocampal and cortical neurons will be cultured for further experiments or used for biochemical analysis.

Dissociated neuronal cultures will be used for:

- Bioassays using primary hippocampal or cortical neurons in culture to test e.g. axon outgrowth, dendritic development and synaptic morpho-dynamics as read-out parameters for changes in cytoskeleton dynamics, intracellular transport mechanisms and synaptic

organization.

- b) Manipulation of the cultured cells; for instance, through plasmid-driven gene expression or suppression, lentiviral infections, CRISPR/Cas9 genome editing, or pharmacological agents and subsequent analysis using the techniques mentioned below.
- c) Microscopy: cells will be processed for immunohistochemistry, or expansion microscopy, and imaged with confocal laser scanning microscopy, super-resolution STED/PALM/STORM microscopy to resolve protein organization at high spatial resolution, or directly imaged with live-cell spinning disk or TIRF microscopy to track the dynamic behavior of neuronal proteins in axons, dendrites or synapses.
- d) Biochemical analysis (DNA/RNA/protein extraction, mass spectrometry analysis)

For all approaches in our project, animals will be killed according to Annex IV of directive 2010/63/EU and tissue will be isolated after killing for further experiments (see below).

Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

For dissociated neuron cultures isolated from developing wildtype rats, pregnant mothers will be killed by CO₂/O₂ suffocation. The CO₂ will be used in gradual fill according to Annex IV of directive 2010/63/EU. The death of the animal is carefully monitored with the highest accuracy and will be ensured with additional cervical dislocation. The embryos will then quickly be removed from the uterus, put on ice-water and are subsequently decapitated.* Brains will be isolated from these embryos and kept in cold buffer on ice, after which hippocampi or cortex regions are dissected and processed for neuron cultures or biochemical analyses.

* Decapitation is used because other methods are not suitable for embryos and young pups. Cervical dislocation by squeezing the neck behind the occiput of the cranium to dislocate the atlanto-occipital joint is not recommended because they are still too small and these structures are not sufficiently developed to make cervical dislocation a fast and efficient method of killing. CO₂/O₂ suffocation is not recommended because fetal and neonatal rodents are resistant to hypoxia. Concussion/ percussive blow to the head is also not possible because this will damage the brain tissue that is required for our experiments. Finally, injections with an overdose of anesthetics are not efficient in embryos and pups younger than P8 and will cause more discomfort than decapitation. Therefore, the embryos will be killed by decapitation as listed in Annex IV of directive 2010/63/EU.

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into account to minimise the number of animals.

The number of animals used to obtain primary dissociated neuron cultures is based upon our extensive (>10 years) experience with these cultures which are constantly being refined.

The number of animals depends on the total number of cells that can be harvested from the specified and desired brain regions (hippocampus or cortex). The number of cells obtained from the cortex, which is the larger brain region, is larger than the amount obtained from hippocampi. Therefore, cortical neurons are suitable for biochemical for which larger amounts of neurons are required (e.g. mass spectrometry analysis). However, the cells isolated from hippocampus are more homogenous (neuron type) than cortical neurons. This makes them more suitable for morphological and microscopy analysis. The variability in these hippocampal neurons in such experiments is smaller and therefore less neurons can be used for analyses to obtain statistically meaningful results. Even though the number of cells obtained from hippocampi is smaller, we can obtain a sufficient amount per embryo for several experiments. We take strict care that all isolated neurons are divided among the investigators in the department and that they will all be used (see also 'refinement' in section G). Moreover, we can isolate both cortical and hippocampal neurons from the same embryo, so this requires no additional animals.

Our long-standing experience with primary dissociated neuron cultures allows us to estimate the required amount of cells/neurons per experiment very well. For each type of experiment/approach, one pilot experiment will be performed, before performing three independent experiments under the optimized conditions. Our experience in the past years shows that these pilot experiments help to reduce the amount of neurons needed for one specific experiment/approach. Even though the general techniques (neuron culture, neuron transfection or immunocytochemistry) are optimized and operational in the lab, the manipulations (e.g. knockdown or overexpression) and read-out parameters can be unique and are highly dependent on the specific research question. Pilot experiments also help define the extent of variation after which we can determine the least amount of neurons needed per experiment. When possible, multiple read-out parameters can be acquired from the same cells.

B. The animals

Specify the species, origin, life stages, estimated numbers, gender, genetic alterations and, if important for achieving the immediate goal, the strain.

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
---------------	---------	--------	-------------	--------	--------	---------------------	--------

1	Wild type Rattus norvegicus	Licensed breeder	Adult and embryos	5896 of which less than 10% is adult (estimated 536) is adult	Adult females and male/female embryos	no	Wistar
---	-----------------------------	------------------	-------------------	---------------------------------------------------------------	---------------------------------------	----	--------

Provide justifications for these choices

Species	We will use wildtype rats (Rattus Norvegicus) for our dissociated primary hippocampal and cortical neuron cultures. Rat neuron cultures are a reliable and a widely used and accepted model system for the neurobiological processes we will analyze. Rat brain tissue, rather than mouse brain tissue, is the preferred animal tissue here, since one rat embryo at E18 yields nearly two-fold the amount of neurons compared to mouse brain tissue from the corresponding developmental stage. The harvested rat brain structures are bigger in size and rat neurons are more robust compared to mouse neurons and therefore show a higher survival rate.
Origin	The wildtype rats are obtained from a licensed laboratory animal company.
Life stages	We use adult pregnant females and E18-E19 embryos to obtain primary neuron cultures in accordance with well-established, worldwide used protocols.
Number	<p>In the project proposal we describe how we select candidate molecules and pathways for our studies. In general, for each experiment, one pilot experiment will be performed before performing three independent replicate experiments under the optimized conditions (N = 3). Our past experience has shown that 3 independent experiments are required and sufficient to reach statistically meaningful, significant and reliable results.</p> <p>For phase 1 (Determining protein distribution and dynamics in neurons), we aim to screen up to 500 candidate molecules (see project proposal for selection methods) within the time frame of this project. We use 100,000 neurons per coverslip per condition, which means that per molecule with a pilot and three independent repeats, 400,000 neurons are necessary for determining protein distribution at 1 developmental timepoint. We aim to analyze the distribution and dynamics at 4 timepoints, indicated as day in vitro (DIV): DIV2-4 (developing), DIV7 and DIV14 (maturing) and DIV21 (mature) neurons. For determining protein distribution for all molecules this amounts to 800,000.000 neurons.</p> <p>Within our current protocol, we can isolate around 700,000-900,000 neurons per embryo for hippocampal neurons. This means that $800.000.000 / 700.000 = 1142$ embryos are required for this phase. A normal litter contains 10 embryos on average. Therefore, 1257 animals (1142 embryos + 115 adult rats) are needed. This calculation, based on the expected isolated neurons per embryo will be used throughout this appendix.</p> <p>For analyzing protein dynamics in neurons for the candidate molecules, live-cell imaging is required. These are generally technically more complex experiments which may require more than 1 pilot experiment for optimization of imaging/microscopy and expression conditions. Therefore, we require 500,000 neurons per molecule per timepoint, amounting in 1,000,000,000 neurons for all candidate molecules, thus 1572 animals (1429 embryos + 143 adult rats).</p> <p>In addition to this, biochemical experiments to determine expression patterns and protein-protein interactions are required for which we generally use cortical neurons. Since these can be obtained from the same embryo's, this would not require additional animals.</p> <p>For phase 2 (Manipulation of protein distribution and dynamics in neurons), we will select up to 100 molecules (see project proposal for selection criteria) for manipulation of protein distribution and dynamics. This includes knockdown (and rescue), overexpression and position manipulation using heterodimerization systems, which amounts to at least 8 conditions (1.control, 2.knockdown, 3.rescue; 4.control and 5.overexpression; 6.control, 7.manipulation away from neurites, 8.manipulation towards neurites) per molecule/protein. This means $3,200,000$ neurons per molecule = $320,000,000$ neurons. This requires 504 animals (458 embryos and 46 adult rats).</p> <p>For phase 3 (investigating how protein distribution and dynamics contribute to neuronal functioning, we will select up to 50 molecules (see project proposal for criteria) to study the effect of their distribution and dynamics on neuronal functioning. We will analyze several morphological characteristics, synaptic function reporters as well as electrophysiological readouts. Current analysis pipelines are designed to be able to measure multiple morphological characteristics from the same neuron, thus requiring less neurons and animals. This means per molecule, we have at least 8 different experiments with different readout parameters (i.e. axon length, dendritic branching, spine</p>

	<p>density, calcium release, neurotransmitter release and multiple electrophysiological readouts; see project proposal). For each parameter, several manipulations are performed (knockdown, overexpression, position manipulation; see conditions described in phase 2), which means 64 experiments per molecule to obtain a detailed morphological and functional investigation of these candidate molecules <i>in vitro</i>. Taking into account pilot experiments and replicates, this means 25,600,000 neurons per molecule = 1,280,000,000 neurons. This requires 2012 animals (1829 embryos and 183 adult rats).</p> <p>Finally, for phase 5 (Investigating the relevance of molecular pathways to the development of neurological disorders), we will examine the effect of oligomeric Aβ on synapse structure. For this, we will also incubate dissociated neuron cultures with oligomeric Aβ and analyse the effect on synaptic function, neuronal survival and transport processes. With two conditions and 3-4 readout parameters and several timepoints, we will require 9.600.000 neurons and thus 16 animals (14 embryos and 2 adult rats) for these experiments.</p> <p>Together, for the <i>in vitro</i> experiments using dissociated primary neuron cultures, we thus expect to use: 1257 + 1572 + 504 + 2012 + 16 = 5361 animals (4873 embryos and the corresponding 488 adult rats) in 5 years. However, due to normal technical issues in primary neuron cultures such as contaminations, medium batch dependent variation in neuron viability and comparable unpredictable factors or additional scientific requirements, our experience from the past years has taught us that we factor in an additional 10% of required neurons. Therefore, we estimate that we will use a maximum of 5896 rats of which 5360 are embryos and 536 are adult rats.</p>
Gender	We use both male and female embryos because there are no gender-dependent effects known for the read-out parameters and neurobiological processes we will analyse.
Genetic alterations	NA
Strain	Wistar rats are one of the most widely used strains in scientific research and have been widely used to obtain primary dissociated neuron cultures.

C. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

Yes

No > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices

Click or tap here to enter text.

D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Click or tap here to enter text.

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

Click or tap here to enter text.

Describe which other adverse effects on the animals' welfare may be expected?

Click or tap here to enter text.

Explain why these effects may emerge.

Click or tap here to enter text.

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

Click or tap here to enter text.

E. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question F

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

[Click or tap here to enter text.](#)

Indicate the likely incidence.

[Click or tap here to enter text.](#)

F. Classification of severity of procedures

Provide information on the experimental factors contributing to the discomfort of the animals and indicate to which category these factors are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe'). In addition, provide for each species and treatment group information on the expected levels of cumulative discomfort (in percentages).

The adult animals and embryos may experience mild discomfort during the procedures described in A.

G. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement	Experiments will be performed <i>in vitro</i> or <i>in silico</i> as much as possible prior to performing animal experiments. In case the same research question can be answered using alternative model systems (e.g. immortalized cell lines), this is our first choice. Indeed, we have many different cell lines that can be cultured in our lab and routinely and extensively use these cell lines for experiments, in particular for construct and antibody testing with immunocytochemistry and for biochemical assay such as protein-protein interaction studies. However, our research focuses on the biogenesis, trafficking and positioning of protein complexes in neurons and the role of these processes in neuron development and function. These processes cannot be studied/recapitulated in cell lines. In addition, many proteins are exclusively expressed in neurons or have neuron-specific functions. Primary neuron cultures are widely used to study neurobiological processes and the results we obtained in our studies can therefore be exchanged and extrapolated between research groups.
Reduction	<p>In the division/department, we have extensive experience with generating primary dissociated neuron cultures and thus the protocols have been extensively optimized and refined. We use high-quality and well-established reagents, technical equipment and protocols during the described procedures. Nonetheless, we constantly aim to refine and improve our techniques. For many years, we successfully use our 'neuron culture team' strategy in order to obtain maximum numbers of high-quality primary neurons and we will continue this strategy for the next 5 years. With this strategy, the preparation of neurons is performed by a centralized, well-trained neuron culture team. This team consists of 10 highly skilled researchers from our lab with ample experience and expertise in preparing neuronal cultures. They perform all described steps including killing the animals, isolating brain regions and dissociation of neuronal cultures. These neurons can subsequently be reserved by other researchers in the department based on the number of coverslips needed for their experiments. The system has several main advantages:</p> <ul style="list-style-type: none">- Very high yield of harvested neurons (reduction: less embryos required).- High quality standard conditions (reduction: less replications of experiments due to culture variability; more reliable results).- No 'surplus' embryos. All embryos of one litter are used and both hippocampi and cortex from the same embryo can be used (reduction).- Standardized protocols and core team of people ensures less contamination or other technical issues which could result in the loss of neurons (reduction).- Animals are handled and killed by experienced and skilled researchers (refinement)- No animals are used just for training purposes of all new researchers in the lab that require cultured neurons for their experiments (reduction). <p>In addition to this, we are able to readout multiple parameters from the same experiment in some cases, which reduces the required amount of neurons and thus embryos and adult rats. Moreover, the development of computational models (Phase 4) is an important new direction aimed to integrate the experimental results from Phase 1, 2 and 3. This approach cannot replace experimental studies on cultured neurons, but indirectly reduces the number of experiments as it guides new experimental directions in a better-informed manner. Finally, other</p>

	researchers working in other labs on the campus regularly come to collect the non-neuronal tissue of wildtype rats for their research, for which we have no purpose otherwise.
Refinement	As described above, our teamwork for the primary dissociated neuron cultures in the lab ensures that the animals are handled and killed only by highly experience and skilled researchers. This way, we reduce the distress that animals may experience during the killing, which is the only animal procedure we perform.

Are adverse environmental effects expected? Explain what measures will be taken to minimise these effects.

No

Yes > Describe the environmental effects and explain what measures will be taken to minimise these effects.

[Click or tap here to enter text.](#)

H. Re-use

Will animals be used that have already been used in other animal procedures ?

No > Continue with question I.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

[Click or tap here to enter text.](#)

I. Repetition

Explain for legally required animal procedures what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, describe why duplication is required.

NA

J. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question K.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

[Click or tap here to enter text.](#)

3. End of experiment

K. Destination of the animals

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

[Click or tap here to enter text.](#)

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

For the collection of tissue necessary for primary neuron cultures from rat embryos and organotypic and acute slices (see Appendix 2) as described in A.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

[Click or tap here to enter text.](#)

Yes > Will a method of killing be used for which specific requirements apply?

No > Describe the method of killing.

Click or tap here to enter text.

Yes > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Pregnant mothers will be killed by CO₂/O₂ suffocation. The CO₂ will be used in gradual fill according to Annex IV of directive 2010/63/EU. The death of the animal is carefully monitored with the highest accuracy and will be ensured with additional cervical dislocation. The embryos will then quickly be removed from the uterus, put on ice-water and are subsequently decapitated. Decapitation is used because other methods are not suitable for embryos and young pups. Cervical dislocation by squeezing the neck behind the occiput of the cranium to dislocate the atlanto-occipital joint is not recommended because they are still too small and these structures are not sufficiently developed to make cervical dislocation a fast and efficient method of killing. CO₂/O₂ suffocation is not recommended because fetal and neonatal rodents are resistant to hypoxia. Concussion/ percussive blow to the head is also not possible because this will damage the brain tissue that is required for our experiments. Finally, injections with an overdose of anesthetics are not efficient in embryos and pups younger than P8 and will cause more discomfort than decapitation. Therefore, the embryos will be killed by decapitation as listed in Annex IV of directive 2010/63/EU

If animals are killed for non-scientific reasons, justify why it is not feasible to rehome the animals.

Click or tap here to enter text.



Appendix Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10800	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Utrecht University	
1.3 List the serial number and type of animal procedure <i>Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.</i>	Serial number	Type of animal procedure
	2	Killing of rodent pups to prepare organotypic slice cultures

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

The procedures described in this project are based on a large body of scientific literature in the field and on our own experimental experience. These animal studies are performed worldwide and therefore make translation and extrapolation of data between research groups feasible.

We study fundamental cellular and molecular processes underlying the development, maintenance and plasticity of neurons. Brain slices are essential for these experiments, because in this intact brain material neurons can be studied in their natural environment. Compared to in vivo experiments, cultured brain slices have the advantage that fewer animals are needed and that there is less discomfort for the animals. Brain tissue from pups can be used for a longer period (~2 weeks) and can be used in parallel for several studies. In addition, there is greater experimental control over protein expression and manipulation of signal pathways.

The goal of this project is to define the mechanisms that control the biogenesis, trafficking and positioning of protein complexes to and within subcellular compartments. Ultimately, the overall aim is to understand how these cellular processes drive the development, maintenance and function of neurons in the central nervous system in health and disease.

In order to study these processes at high spatial and temporal resolution and translate to physiologically relevant systems, we will use three different model systems: a) primary dissociated neuron cultures from prenatal rat embryos, b) organotypic hippocampal cultures

obtained from postnatal mouse and rat pups and c) acute slice preparations from wildtype and Cas9 transgenic mouse line. For (a), see Appendix 1.

The organotypic and acute slice cultures will be used:

- 1) Bioassays to test e.g. axon outgrowth, dendritic development and synaptic morpho-dynamics as read-out parameters for changes in cytoskeleton dynamics, intracellular transport mechanisms and synaptic organization.
- 2) Manipulation of neurons; for instance, through plasmid-driven gene expression or suppression, lentiviral infections, CRISPR/Cas9 genome editing, or pharmacological agents and subsequent analysis using the techniques mentioned below.
- 3) Microscopy: slices will be processed for immunohistochemistry, or expansion microscopy, and imaged with for instance confocal laser scanning microscopy, super-resolution STED/PALM/STORM microscopy to resolve protein organization at high spatial resolution, or directly imaged with live-cell spinning disk microscopy, or TIRF to track the dynamic behavior of neuronal proteins in axons, dendrites or synapses.
- 4) Electrophysiology to measure action potential generation, synaptic current (spontaneous and evoked excitatory and inhibitory postsynaptic currents (EPSCs and IPSCs).

For all approaches in our project, animals will be killed according to Annex IV of directive 2010/63/EU and tissue will be isolated after killing for further experiments (see below).

Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

All procedures consist of killing an animal according to the Annex IV Directive.

For organotypic slice preparation, young pups (P5-8, mice and rats) are killed by decapitation using a sharp scissor. This procedure takes a few seconds. Fast handling is necessary to secure the quality of living brain tissue. The brains are removed and prepared for the culture. This procedure is based on five years of experience in the Division of Cell Biology, Neurobiology and Biophysics. Pups are killed without anesthesia because anesthetics are not efficient in pups younger than P8 and will cause more discomfort than decapitation. Fast decapitation is therefore the most humane method and the standard method in the field.

For acute slice preparation, animals (P21-23, mice and rats) are killed by decapitation after sedation by isofluorane. This procedure takes a few seconds and a quick procedure is necessary to ensure the quality of the living brain tissue. Brains are removed and prepared for experiments.

The primary goal of this procedure to collect brain tissue, but other tissue can also be used to study gene and protein expression.

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into account to minimise the number of animals.

In the application we describe how we select candidate molecules and pathways for our studies. The number of candidates and the precise assays determine the number of animals required. Below is a description of how the estimate of the number of animals required per experiment type is made. Subsequently, it is described how the estimation of the number of studies (and thus the number of animals required) per research objective is made.

For organotypic slice cultures, we can culture 5 to 10 brain slices per mouse, and up to 15 slices per rat. The slices are kept in culture for experiments during the 2-3 weeks after decapitation of the animal. For acute slice preparations, 5 to 10 brain slices per mouse, and up to 15 slices per rat can be prepared and are kept for 4 – 8 hours to perform electrophysiological recordings.

For the calculation of the total number of animals, we first distinguish between microscopy studies and physiology studies. For microscopy studies, the tissue is often fixed and a higher number of data points can be collected from a single experiment than in electrophysiology studies where only 2-3 cells per slice can be recorded from. We then calculate per project how many animals are required.

Number of animals per study

microscopy studies: on average 3 slices are used per experimental group. In a typical experiment, 2 groups are compared (control vs. manipulation). Thus, for each experiment 6 slices are required (1 pup). Each experiment will be repeated 3-5 times to reduce variation between individual culture preparations. In total, for a microscopy study on average **4 animals** are required.

electrophysiology studies: on average 10 slices are used per experimental group. Experiments are always performed in pairs (control and experimental group(s) in the same batch slices) to minimize experimental variation between animals and cultures. To avoid bias, brain slices from a different animal are preferably used for each paired experiment and no more than 2 experiments per animal. So, for 10 experiments per study on average **8 animals** are required.

Number of animals per project phase

Phase 1: Determining protein distribution and dynamics in neurons

Based on the findings in dissociated cultures we expect to investigate a number of 25 candidate proteins (see project proposal for selection criteria) using microscopy in organotypic slices. In this first phase of experiments no manipulation is included. We expect to use 2 animals per experiment, i.e., **50 mice** in total.

Phase 2 and 3: Manipulation of protein distribution and dynamics in neurons and investigating how protein distribution and dynamics contribute to neuronal functioning

In Phase 2 tools will be optimized to manipulate protein levels and distribution in dissociated cultures. We expect to utilize these tools in Phase 3 to study 15 candidate proteins/pathways (see project proposal for selection criteria) to determine the effect on protein distribution using microscopy. This will require 4 animals per experiment, i.e., **60 mice** in total. In addition, for these experiments electrophysiological recordings will be performed to determine the physiological consequences. This requires 8 animals per experiment, i.e., **120 rats** in total.

Phase 5: Investigating the relevance of molecular pathways to the development of neurological disorders

In this phase we will investigate how specific molecular pathways are disrupted in models of neurological disorders. Specifically, two models of Alzheimer’s disease will be used:

- 1) To study the effect of pathogenic effects of oligomeric A β on synapse structure and function, we treat slices with synthetic oligomeric A β . We expect to perform 10 microscopy and 10 electrophysiology studies on rat slices treated with oligomeric A β , i.e., **120 rats** in total.
- 2) To validate findings in a genetic model of Alzheimer’s disease we use the APP knock-in mouse line that is well-validated to recapitulate the pathology observed in humans. Dependent on the outcome from the experiments with oligomeric A β , we expect to perform 5 microscopy and 5 electrophysiology experiments, i.e., **60 mice** in total.

In total, **240 rats and 170 mice** are required.

Different researchers perform different studies in parallel and the cultured brain slices from 1 animal can be used for 2 to 3 parallel studies. In some cases, if specific transgenic mice or rats are needed, the brain slices cannot be used by other researchers. Other brain slices are used to test new antibodies, drugs or other pilot experiments.

B. The animals

Specify the species, origin, life stages, estimated numbers, gender, genetic alterations and, if important for achieving the immediate goal, the strain.

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
1	Mus Musculus	Licensed breeder	P5-23	170	Male/female	WT and transgenic	C57/BL6
2	Rattus Norvegicus	Licensed breeder	P5-23	240	Male/female	WT	Wistar

Provide justifications for these choices

Species	Both mice and rats are used depending on the experiment as these are broadly used and validated model systems to study neurobiological processes. Rat preparations will be used preferentially as the number of slices that can be collected from individual animals is higher. Mice are used to compare wild-type with transgenic mouse models. The molecular pathways and cellular processes we study in these models are directly relevant for understanding the human brain.
Origin	The mice and rats are bred in-house (GDL) or come from qualified suppliers of laboratory animals or from other research institutes. There is no inconvenience in breeding transgenic mice, and the transgene expression has no effect on the well-being of the mice. On the work protocols we will state the specific age at which the animals are used.

Life stages	Depending on the research question, we will use wild-type or transgenic mice, or rats. We use animals that are 5-8 days old to make cultured brain slices and up to 23 days old for acute slices.
Number	240 rats and 170 mice are required as motivated in part A.
Gender	We use animals of both sexes for the cultured brain slices, because sex hormones have little influence in such young animals and are absent during the culture.
Genetic alterations	Cas9-expressing transgenic mice are used to facilitate efficient CRISPR-mediated genome editing. The APP knock-in mouse line is currently broadly held to be a well-validated model for Alzheimer's disease (AD). Because the pups are killed at a young age they will not suffer from AD-associated pathology.
Strain	C57BL6 mice are used to be able to directly compare wild-type mice with the transgenic mouse lines. We use Wistar rats to allow direct comparison with the dissociated cultures (see Appendix/ protocol 1).

C. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

Yes

No > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices

Click or tap here to enter text.

D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Gas anesthesia does not work in young pups and causes unnecessary discomfort. Therefore, rapid decapitation without anesthesia is the most humane method of killing and the standard procedure for pups

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

Click or tap here to enter text.

Describe which other adverse effects on the animals' welfare may be expected?

NA

Explain why these effects may emerge.

NA

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

NA

E. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question F

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Click or tap here to enter text.

Indicate the likely incidence.

Click or tap here to enter text.

F. Classification of severity of procedures

Provide information on the experimental factors contributing to the discomfort of the animals and indicate to which category these factors are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe'). In addition, provide for each species and treatment group information on the expected levels of cumulative discomfort (in percentages).
The animals may experience mild discomfort during the procedures described in A.

G. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement	The procedures described here are based on scientific literature and experience with animal experiments. These experiments are carried out in the same way all over the world, so that the results can be exchanged and extrapolated between research groups. We use computer models to make predictions about functional consequences of found molecular changes.
Reduction	Whenever possible, nests and brain slices are used for multiple studies in parallel in order to minimize surplus. For each research question, the experiments will be performed consecutively, while different researchers answer different research questions in parallel. In this way optimal use is made of the brain material. If possible, other material (e.g. from other organs) is shared with other researchers. The number of animals is kept to a minimum based on knowledge of the requirements for publication.
Refinement	The animals are checked daily for various parameters (general impression, size, growth, coat, behaviour, clinical signs) as described in the guidelines 2010/63/EU: corrigendum of 24 Jan. 2013.

Are adverse environmental effects expected? Explain what measures will be taken to minimise these effects.

No

Yes > Describe the environmental effects and explain what measures will be taken to minimise these effects.

[Click or tap here to enter text.](#)

H. Re-use

Will animals be used that have already been used in other animal procedures ?

No > Continue with question I.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

[Click or tap here to enter text.](#)

I. Repetition

Explain for legally required animal procedures what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, describe why duplication is required.

Not applicable

J. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question K.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

[Click or tap here to enter text.](#)

3. End of experiment

K. Destination of the animals

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

Click or tap here to enter text.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

For the collection of tissue necessary for preparing organotypic and acute slice cultures.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Click or tap here to enter text.

Yes > Will a method of killing be used for which specific requirements apply?

No > Describe the method of killing.

Click or tap here to enter text.

Yes > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Young pups (P5-8, mice and rats) are killed by decapitation using a sharp scissor. This procedure takes a few seconds. Fast handling is necessary to secure the quality of living brain tissue. The brains are then removed and prepared for the culture. Pups are killed without anesthesia because anesthetics are not efficient in pups younger than P8 and will cause more discomfort than decapitation. Fast decapitation is therefore the most humane method and the standard method in the field.

For acute slice preparation, animals (P21-23, mice and rats) are killed by decapitation. This procedure takes a few seconds and a quick procedure is necessary to ensure the quality of the living brain tissue. Brains are removed and prepared for experiments.

If animals are killed for non-scientific reasons, justify why it is not feasible to rehome the animals.

Click or tap here to enter text.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : AVD10800202216383
2. Titel van het project : Molecular and cellular processes controlling the development, maintenance and plasticity of neurons
3. Titel van de NTS : Het ontrafelen van de moleculaire en cellulaire mechanismen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling, functie en onderhoud van zenuwcellen

4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning
 wijziging van vergunning met nummer :

5. Contactgegevens DEC

Naam DEC : DEC Utrecht
Telefoonnummer contactpersoon : 088 – 75 59 247
Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):

- ontvangen door DEC: 05-09-2022
 aanvraag compleet:
 in vergadering besproken: 07-09-2022
 anderszins behandeld:
 termijnonderbreking(en) van / tot : 12-09-2022 / 15-09-2022
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
 aanpassing aanvraag:
 advies aan CCD: 11-10-2022

7. De aanvraag is afgestemd met de IvD en deze is hiermee akkoord.

8. Eventueel horen van aanvrager

- Datum: 07-09-2022
- Plaats: Utrecht
- Aantal aanwezige DEC-leden: 4
- Aanwezige (namens) aanvrager: verantwoordelijk onderzoeker
- Gestelde vragen en verstrekte antwoorden: De DEC heeft de onderzoekers o.a. gehoord over de resultaten uit eerder onderzoek, de verantwoording voor de selectie van de 500 stoffen, de navolgbaarheid van de aanvraag, de ontbrekende go/no-go momenten met bijbehorende criteria tussen de verschillende fases en de relevantie van fase 5. Hieruit zijn onderstaande vragen, zoals vermeld bij punt A9, voortgekomen, die schriftelijk aan de onderzoekers werden voorgelegd.

- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag.

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 12-09-2022
- Datum antwoord: 15-09-2022
- Strekking gestelde vragen en antwoorden:

Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: de DEC onderkent het belang en de kwaliteit van uw onderzoek, maar mist nog wel informatie waaruit dat zou moeten blijken. Wat is de stand van zaken in uw onderzoeksveld en wat is uw eigen positie in dit veld? Wat draagt u bij in dit veld (relatieve belang ervan in de context van wat er in dit veld gebeurt)? Wat heeft u de afgelopen jaren gedaan en bereikt en hoe bouwt u daarop voort? Niet alleen voor wat betreft de ontwikkelde methoden (de instrumenten die u voor uw onderzoek gebruikt), maar ook inhoudelijk. Kunt u dit illustreren door te verwijzen naar enkele sleutelpublicaties van uzelf en anderen in dit veld?

Ons onderzoeksveld richt zich primair op de vraag hoe eiwitten gevormd worden en getransporteerd worden om op de juiste plek in het neuron terecht te komen. Uitgangspunt hierbij is dat we willen begrijpen hoe deze processen bijdragen aan de ontwikkeling van neuronen, het onderhoud van neuronen en de plasticiteit van neuronen. In de afgelopen jaren hebben we bestudeerd hoe transport gereguleerd wordt via motoreiwitten die eiwit pakketjes over het cytoskelet kunnen transporteren (zie bijvoorbeeld [redacted])

[redacted] hoe specifieke organellen bijdragen aan het onderhoud van neuronen (zie bijvoorbeeld [redacted]), hoe synaptische eiwitten lokaliseren om transmissie en plasticiteit te reguleren [redacted]

[redacted] Dit zijn allemaal publicaties in toonaangevende tijdschriften die veel geciteerd worden en een belangrijke bijdrage leveren aan het veld. Deze celbiologische studies hebben veel nieuwe inzichten geleverd en vormen de basis voor de verdere selectie van kandidaat eiwitten. Het doel voor de komende vijf jaar is de bijdrage van deze kandidaat eiwitten aan deze processen beter te begrijpen en daarbij te focussen op hoe neuronale activiteit deze processen moduleert en hoe deze processen verkeerd lopen in ziektes. Dit is bijvoorbeeld belangrijk om processen zoals leren en geheugen beter te begrijpen waarbij specifieke verbindingen tussen neuronen, synapsen, versterkt of verzwakt worden. De huidige stand is dat we ruwweg weten welke kandidaat eiwitten we moeten bestuderen, maar dat we nog niet goed weten hoe deze processen veranderen als neuronen bijvoorbeeld geactiveerd worden of veranderen als gevolg van een ziekteproces. We hebben dit nu verder toegelicht in 3.1 Achtergrond.

- 3.1 Achtergrond: Wat is de reden dat u met 500 moleculen begint en hoe selecteert u deze? *De voorselectie van 500 eiwitten is gemaakt op basis van ons eigen werk, gepubliceerde literatuur en bestaande genexpressie databases. Daarnaast is de keuze gemaakt niet meer dan 500 te selecteren omdat daar simpelweg de capaciteit niet voor is. We werken met drie onderzoeksgroepen samen en kunnen op basis van onze ervaring een inschatting maken dat*

we met deze gezamenlijke capaciteit met 500 kandidaten kunnen starten. Zoals ook aangegeven in het proposal zullen deze kandidaten op basis van experimentele bevindingen verder worden geselecteerd. Belangrijke go/nogo momenten hiervoor zijn in eerste plaats empirisch: vinden we in fase 1 genoeg bewijs dat deze eiwitten betrokken zijn bij de processen die we bestuderen? Dit doen we door middel van functionele studies (knockdown/overexpressie). Een belangrijk argument hierbij kan ook zijn of de juiste experimentele tools (antichaam etc) beschikbaar zijn om het eiwit effectief te bestuderen. Onze groepen hebben naast individuele meetings met alle betrokkenen, wekelijks gezamenlijk overleg waarin de voortgang van projecten besproken wordt om deze beslismomenten te faciliteren. We hebben dit nu verder toegelicht in 3.1 Achtergrond.

- 3.1 Achtergrond: De DEC beschouwt uw aanvraag als bij uitstek fundamenteel onderzoek. De geclaimde relevantie voor het begrijpen van hersenaandoeningen ("Not surprisingly, dysregulation of these processes has been implicated in numerous nervous system disorders, including autism spectrum disorders (ASD), schizophrenia, and Alzheimer's disease (AD)", komt wat uit de lucht vallen en behoeft nadere toelichting. Natuurlijk is het allereerst van belang om te begrijpen hoe processen verlopen in een situatie waarin alles normaal/gezond verloopt, maar in hoeverre richt u zich in dit onderzoek op het bestuderen van de relatie tussen verstoring van die processen en het ontstaan en het progressieve verloop van "ziektes"?
Inderdaad is dit onderzoek bij uitstek fundamenteel. Echter, zijn er duidelijke aanwijzingen dat de processen die we bestuderen aangedaan zijn in aandoeningen als ASD en de ziekte van Alzheimer. In ons onderzoek maken we daarom gebruik van kennis over ziekten om biologische processen te begrijpen en andersom, om vanuit celbiologisch perspectief ziekteprocessen beter te begrijpen. Om een voorbeeld te geven. In een recent onderzoek [REDACTED] tonen we aan dat een specifiek sub-cellulair compartiment in neuronen betrokken is bij de opname en hergebruik van neurotransmitter receptoren. We vonden dat het eiwit Shank een belangrijke rol speelt in het verankeren van dit sub-cellulaire compartiment en dat depletie van Shank leidt tot verstoringen in de opname en het hergebruik van deze receptoren. Shank eiwitten zijn ook sterk geïmpliceerd in ASD, en we vonden dat specifieke mutaties in Shank die ook gevonden zijn in patiënten met ASD, verstoringen gaven in de opname van neurotransmitter receptoren. Deze inzichten zijn belangrijk voor het vinden van nieuwe targets om therapieën voor deze aandoening te vinden. Zie ook ons antwoord hieronder met betrekking tot fase 5. We lichten dit nu verder toe in 3.1 Achtergrond, en 3.4 Strategie.
- 3.2 Doel: 3.2.2: U noemt hier 'voortzetting van lopend werk', maar wat u gedaan heeft en hoe u daarop voortbouwt komt niet goed uit de verf (zie ook de eerste vraag hierboven over 3.1). Kunt u dit nog aanvullen?
In voorgaand en lopend werk hebben we bijgedragen aan het in kaart brengen van hoe het neuronale cytoskelet is opgebouwd, hoe transport in neuronen gereguleerd worden, hoe eiwitten de juiste plek in de cel vinden en hoe synapsen opgebouwd zijn en werken. In deze voortzetting willen we verder bestuderen hoe specifieke eiwitten bijdragen aan deze processen. Met name omdat neuronen zich ontwikkelen tot complexe, gepolariseerde cellen,

lang leven, constant veranderen door de activiteit in neuronale netwerken (plasticiteit) en dus gevoelig zijn voor ziekteprocessen, is nu de uitdaging om te bestuderen hoe deze eiwitten reageren op deze veranderingen en hoe ze bijdragen aan de ontwikkeling van neuronen, het onderhoud van neuronen en de plasticiteit van neuronen. We lichten dit nu meer toe in 3.1 Achtergrond.

- 3.4 Strategie: De plaats of rol van het onderzoek in fase 5 (A β en AD) binnen dit project wordt niet goed duidelijk. Wat is nu precies de rechtvaardiging om dit onder te brengen in dit project? Fase 5 lijkt zoals het nu gepresenteerd wordt eerder fase 1 van een volgend project waarin u bestudeert wat er misgaat in de celbiologische processen die u eerder in kaart gebracht hebt op het moment dat er sprake is van "disease".

Er zijn een aantal concrete aanwijzingen die ons motiveren om in dit stadium van het project ons te richten op de ziekte van Alzheimer. Een van de eerste effecten van de A β oligomeren die zich ophopen tijdens het ontwikkelen van de ziekte van Alzheimer is het verstoren van de structuur en functie van synapsen. Wij vinden dit ook in de gekweekte neuronen. Het blijft echter onduidelijk hoe dit komt. Wij willen daarom o.a. bestuderen hoe de precursor van A β , APP door de cel getransporteerd wordt, en op welke plek het terecht komt om beter te begrijpen hoe het vooral specifiek op synapsen lijkt te werken. Ook, hebben we aanwijzingen dat A β een effect heeft op de opname en het hergebruik van receptoren (zie ook boven). Dit willen we verder bestuderen door receptor opname en hergebruik live te volgen in de aanwezigheid van A β . Naast A β , is hyperfosforylatie van tau een eiwit wat bindt aan het cytoskelet een kenmerk van de ziekte van Alzheimer. Dit kan zorgen voor verstoringen in het transport van eiwitten door de cel. Met de kennis die we hebben opgebouwd over het neuronale cytoskelet, kunnen we nu gericht bestuderen welke transportprocessen zijn aangetast in cel modellen van de ziekte van Alzheimer. We lichten dit nu verder toe in 3.1 Achtergrond, en 3.4 Strategie.

Bijlage 1

- B. De dieren: Vanuit de IvD is een vraag gesteld over het uitleggen van uw opmerking "We aim to analyzeat 4 time points" terwijl u 3 stadia (developing, maturing and mature neurons) beschrijft. Kunt u missende informatie toevoegen?
Dit was inderdaad niet duidelijk beschreven. We doen onze metingen op vaste tijdstippen, die corresponderen met de 3 aangegeven stadia. Maturing is een relatief lang proces en dat bestuderen we op 2 tijdstippen: day in vitro (DIV) 7 en DIV14. We hebben deze informatie toegevoegd.

Bijlage 1 en 2

- K. Bestemming van de dieren bij einde experiment: Het is de DEC duidelijk waarom de dieren worden gedecapiteerd zonder anesthesie. Vraag K is echter in beide bijlagen niet goed beantwoord. Kunt u dit alsnog doen en met name ook hier onderbouwen waarom onverdoofd decapiteren noodzakelijk is?
We hebben dit gecorrigeerd in Bijlagen 1 en 2.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): n.v.t.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er zijn geen DEC-leden betrokken bij het betreffende project.

C. Beoordeling (inhoud):

1. De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang. In recent celbiologisch onderzoek zijn technieken ontwikkeld waarmee kennis is opgedaan met betrekking tot de vorming en distributie van specifieke eiwitten binnen neuronen. Dit project sluit daarbij aan en is gericht op het verkrijgen van meer inzicht in de mechanismen die ervoor zorgen dat de juiste eiwitten worden gevormd en worden vervoerd naar de juiste locatie in de zenuwcellen. Om de ontwikkeling en het functioneren van het zenuwstelsel goed te laten verlopen is het belangrijk dat de eiwitten die zenuwcelfuncties uitvoeren op de juiste plaats aanwezig zijn. De kennis over de moleculen die de vorming, het vervoer en de distributie van deze eiwitten regelen is incompleet. Het betreft processen die de ontwikkeling, het onderhoud en het functioneren van neuronen ondersteunen. Verstoringen van deze moleculaire mechanismen kunnen de ontwikkeling en werking van zenuwcellen negatief beïnvloeden, wat kan leiden tot neurologische aandoeningen, zoals de ziekte van Alzheimer of Autisme Spectrum Stoornissen (ASD) kunnen ontstaan.

Op basis van eerdere onderzoeken, literatuur en genexpressie databases is door de onderzoekers een voorselectie gemaakt van 500 eiwitten. De onderzoeksbenadering van de aanvrager bestaat uit vijf fases waarbij in de eerste fase wordt nagegaan of er voldoende bewijs gevonden wordt dat deze kandidaat-eiwitten betrokken zijn bij de te bestuderen processen. Daarna vindt in fase 2 en 3 op basis van heldere criteria verdere selectie van de eiwitten plaats. Fase 4 bestaat uit het maken van berekeningen en wordt doorlopend, parallel aan de eerdere fases uitgevoerd. In fase 5 zal de aanvrager als model voor wat er fout kan gaan in dit soort processen bij de ziekte van Alzheimer oligomeer Amyloid- β toevoegen aan neuronale kweken. Dit tast de functie van de synapsen aan en leidt tot degeneratie van het zenuwweefsel zoals die zich ook voordoet bij de ziekte van Alzheimer. Iets vergelijkbaars doet de aanvrager voor de hyperfosforylatie van het tau-eiwit bij de ziekte van Alzheimer. Het belang hiervan is op dit moment vooral fundamenteel, omdat hiermee een vergelijking gemaakt kan worden tussen het verloop van de te bestuderen processen in een gezonde situatie en in een situatie waarin er sprake is van pathologie. De hiervoor benodigde *ex vivo* experimenten worden uitgevoerd met vers geïsoleerd hersenweefsel, te weten gedissocieerde neuronale kweken (bijlage 1) en organotypische plakculturen (bijlage 2).

Er is sprake van een eenduidige doelstelling en van sterk vergelijkbare *ex vivo* experimenten, met dezelfde gevolgen voor de betrokken dieren voor wat betreft het ongerief waarmee dit gepaard gaat. Op grond daarvan concludeert de commissie dat er sprake is van een project dat toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. De opzet van het project is helder en valt ruimschoots binnen de criteria die worden genoemd bij zowel voorbeeld 1A als 3A uit de 'Handreiking invulling definitie project' (versie 2022). Het is navolgbaar aan welke experimentele procedures de dieren zullen worden onderworpen en welk ongerief daarmee gepaard gaat. De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en dat er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden.

2. Voor zover de DEC bekend, is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de dierexperimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie, te weten fundamenteel onderzoek, sluit aan bij de hoofddoelstelling(en).

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is om op moleculair niveau meer inzicht te verkrijgen in de wijze waarop in neuronen eiwitcomplexen gevormd, vervoerd en gedistribueerd worden naar en binnen subcellulaire locaties. De aanvrager richt zich op die concrete aandachtspunten met betrekking tot deze processen. Het betreft processen die de ontwikkeling, het onderhoud en het functioneren van neuronen ondersteunen. Daarmee worden fundamentele inzichten verkregen in deze mechanismen die, indien ze verstoord zijn, kunnen leiden tot ontwikkelingsstoornissen en neurodegeneratieve aandoeningen. In de toekomst kunnen deze inzichten bijdragen aan het ontwikkelen van nieuwe therapeutische interventies voor aandoeningen zoals de ziekte van Alzheimer en ASD. De DEC is van mening dat er een reële, maar wel indirecte relatie is tussen het directe en het uiteindelijke doel, en dat het doel gerechtvaardigd is in de context van het onderzoeksveld.
5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: de onderzoekers, de toekomstige neurologische patiëntengroepen en de proefdieren. De onderzoekers dragen bij aan de voortgang in het celbiologisch onderzoek. Voor de individuele onderzoeker kan het van belang zijn om aansprekende onderzoeksresultaten te boeken, maar in de uiteindelijke afweging kent de DEC daar weinig gewicht aan toe. De toekomstige patiënten met neurologische aandoeningen zoals de ziekte van Alzheimer en ASD hebben een groot belang bij de bevindingen uit deze studie, doordat meer kennis verkregen wordt van de onderliggende mechanismen en dit in samenwerking met derden kan bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe therapeutische interventies. De proefdieren (rattenembryo's, moederdieren en overige ratten en muizen) hebben er belang bij gevrijwaard te blijven van het ongerief en de toegebrachte dood.

6. De aanvrager verwacht geen negatieve effecten op het milieu. De DEC ziet, gezien de aard van dit onderzoek, geen aanleiding om dit in twijfel te trekken.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De gespecialiseerde kennis en kunde van de ervaren onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd en dragen eraan bij dat de doelstellingen behaald kunnen worden, dat aan de 3V-beginselen voldaan kan worden en dat voorkomen kan worden dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven.
8. Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC erkent dat inzicht in de rol van moleculaire en cellulaire mechanismen van belang is voor het begrijpen van neurologische aandoeningen en voor onderzoek naar rationele therapieën maar is ook van mening dat kennis van het mechanisme van het ontstaan of induceren van een defect niet per se leidt tot inzicht in hoe dit defect te herstellen. Tevens heeft de DEC gediscussieerd over de relevantie van fase 5 (A β) en de relatie tussen het onderzoek in fase 5 en de rest van het onderzoek dat zich richt op het in kaart brengen van de wijze waarop het transport van eiwitten in zenuwcellen plaatsvindt. De onderzoekers hebben voldoende toegelicht dat fase 5 gericht is op het in kaart brengen van dezelfde fundamentele processen, maar dan in een situatie waarin er sprake is van pathologie. Daarnaast is er bij de onderzoekers in het algemeen een interesse in het bestuderen van het verloop van deze processen in een situatie waarin er "dingen misgaan". Daaruit komen op de lange termijn mogelijk aanwijzingen voor gerichte behandeling van o.a. de ziekte van Alzheimer en ASD.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
 - Niet-menselijke primaten (10e)
 - Dieren in/uit het wild (10f)
 - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I EU richtlijn)
 - Zwerfdieren (10h)
 - Hergebruik (1e lid 2)
 - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
 - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
 - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV EU richtlijn (13c lid 3)
10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU richtlijn.

11. Het betreft *ex-vivo* experimenten. De dieren ondergaan geen experimenten voorafgaand aan de onvermijdelijke, licht ongerief veroorzakende decapitatie voor het verzamelen en analyseren van weefsel. Er is geen sprake van cumulatief ongerief.
12. De integriteit van de dieren wordt fysiek aangetast aangezien alle dieren worden gedood door middel van decapitatie. Daarnaast wordt de integriteit van de moederdieren aangetast door het doden door verstikking en het weghalen van de embryo's.

Voor deze studie worden wild-type ratten en muizen gebruikt. Voor de 170 benodigde muizenpups worden, naast de wild-type muizen, deels Cas9 transgene muizen gebruikt om CRISPR-gemedieerde genoombewerking voor het merken en visualiseren van eiwitten (in *ex-vivo* onderzoek met plakken van de hersenen van deze muizen) te vereenvoudigen. De onderzoeker geeft aan dat de APP knock-in muislijn momenteel als een goed gevalideerd model voor de ziekte van Alzheimer wordt beschouwd. Doordat de muizenpups op jonge leeftijd worden gedood, zullen de dieren niet lijden aan dementie gerelateerde verschijnselen. Behalve op het niveau van het genoom hebben de De Cas9 en APP-modificaties dus geen invloed op de integriteit van de dieren in deze experimenten.

13. Het is niet de verwachting dat humane eindpunten zullen optreden, omdat de dieren voorafgaand aan de doding geen andere experimenten of handelingen ondergaan en geen aangeboren (genetische) afwijkingen hebben die binnen de duur van deze experimenten tot ongerief kunnen leiden.

3V's

14. De aanvrager maakt in zijn onderzoek gebruik van tal van *in vitro* (gekweekte *immortalized cell lines*) en *in silico* alternatieven. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat de processen die in primaire neuronenculturen in deze aanvraag bestudeerd worden, niet onderzocht kunnen worden in dergelijke vervangingsalternatieven. Voor het *ex-vivo* onderzoek in de primaire kweken zijn steeds nieuwe dieren nodig. Daarover bestaat consensus in dit onderzoeksveld.
15. Het aantal te gebruiken dieren is zorgvuldig gespecificeerd (tot op het niveau van het benodigde aantal zenuwcellen). Er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk en door een ervaren team kunnen worden uitgevoerd. De dieren worden zonder voorafgaande handelingen gedood voor het verkrijgen van hersenweefsel voor *ex vivo* onderzoek.

17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Dieren van beide geslachten zullen in gelijke mate worden ingezet. Alle embryo's worden gebruikt, omdat voor de onderzochte processen en uitleesparameters geen geslachtsverschillen te verwachten zijn.
19. Alle dieren worden in het kader van het project gedood voor het verzamelen van weefsel dat nodig is voor primaire neuronculturen en organotypische en acute slices. De dieren, 5360 rattenembryo's (E18-E19), 536 moederratten, 240 ratten en 170 muizen, worden op een passende wijze, in overeenstemming met bijlage IV van de EU richtlijn gedood. Moederdieren worden in verband met de embryo's door CO₂/O₂ verstikking gedood. De embryo's worden na verwijdering uit de baarmoeder op ijswater gezet en zonder anesthesie gedecapiteerd. De ratten- en muizenpups (P5-8) worden eveneens zonder verdoving gedecapiteerd. Verdoving is niet efficiënt bij pups jonger dan P8 en veroorzaakt meer ongerief dan de decapitatie zelf. Een snelle decapitatie is hierdoor de meest humane en gangbare methode. De ratten en muizen (P21-23), benodigd voor de acute slice preparatie, worden eveneens onverdoofd gedecapiteerd omdat een snelle procedure noodzakelijk is om de kwaliteit van het levende hersenweefsel te behouden. De verwijderde hersenen worden gebruikt voor onderzoek. De DEC kan zich vinden in de gebruikte dodingsmethode voor deze studie met deze specifieke onderzoeksdoeleinden.
20. De vraag over hergebruik is niet van toepassing omdat alle dieren gedood worden in het kader van het experiment. Wel worden de gekweekte zenuwcellen van de proefdieren met meerdere onderzoeksgroepen binnen de afdeling gedeeld en het resterende weefsel wordt aan externe onderzoeksgroepen aangeboden.

NTS

21. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

1. De morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is of het belang van dit onderzoek, namelijk het verkrijgen van meer inzicht in de mechanismen die betrokken zijn bij het ontstaan, het vervoeren en het distribueren van eiwitten in zenuwcellen, de onvermijdelijke lichte aantasting van het welzijn en de aantasting van de integriteit van de gebruikte proefdieren kan rechtvaardigen.
2. Er vindt een aantasting van welzijn en een aantasting van de integriteit van de proefdieren plaats door de decapitatie. Dit leidt tot licht ongerief. Daar staat tegenover dat met dit project fundamentele inzichten worden verkregen in hersenmechanismen die, indien ze verstoord zijn,

kunnen leiden tot ontwikkelingsstoornissen en neurodegeneratieve aandoeningen. Op lange termijn (niet binnen dit onderzoek) kunnen deze inzichten bijdragen aan het ontwikkelen van nieuwe therapeutische interventies voor aandoeningen zoals de ziekte van Alzheimer en ASD. Het is zonder meer aannemelijk, gezien eerdere onderzoeksresultaten van de aanvrager, dat de fundamentele doelstelling behaald zal worden. Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk, maar de onderzoekers doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken.

- Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat meer begrip van processen op moleculair niveau binnen neuronen die zorgen voor de vorming, het transport en de distributie van eiwitten en zo het onderhoud en de plasticiteit van neuronen ondersteunen, een substantieel belang vertegenwoordigt en dat dit belang opweegt tegen de lichte aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. De relatie tussen het directe en het uiteindelijke doel is reëel en voldoende helder. Het is aannemelijk dat de directe doelstelling behaald zal worden. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat er geen sprake zal zijn van onbedoelde negatieve effecten voor mens, dier en milieu als gevolg van de dierproeven. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd.

E. Advies

- Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden.

Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.

Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist

Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...

De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...

De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

- Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus..

- Er zijn geen knelpunten/dilemma's naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies.



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Universiteit Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 93118

2509 AC Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0800 789 0789

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD10800202216383

Bijlagen

2

Datum 5 september 2022

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 5 september 2022. Het gaat om uw project "Molecular and cellular processes controlling the development, maintenance and plasticity of neurons". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD10800202216383. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

Als wij nog informatie van u nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn bijgeschreven op de rekening van de CCD. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als wij nog informatie van u nodig hebben, wordt deze termijn opgeschort. In geval van een complexe aanvraag kan deze termijn met maximaal vijftien werkdagen verlengd worden. U krijgt bericht als de beslisperiode van uw aanvraag vanwege complexiteit wordt verlengd. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Factuur

Bijgaand treft u de factuur aan voor de betaling van de leges. Wij verzoeken u de leges zo spoedig mogelijk te voldoen, zodat we uw aanvraag in behandeling kunnen nemen. Is uw betaling niet binnen dertig dagen ontvangen, dan kan uw aanvraag buiten behandeling worden gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.nl of neem telefonisch contact met ons op: 0800 789 0789.

Datum:

5 september 2022

Aanvraagnummer:

AVD10800202216383

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur



Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10800
Naam instelling of organisatie: Universiteit Utrecht
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]
Postbus: 12007
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: Universitair Docent
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: Universitair Docent
Afdeling: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u? Nieuwe aanvraag
 Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
 Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Over uw project

Geplande startdatum: 1 januari 2023
Geplande einddatum: 1 januari 2028
Titel project: Molecular and cellular processes controlling the development, maintenance and plasticity of neurons
Titel niet-technische samenvatting: Het ontrafelen van de moleculaire en cellulaire mechanismen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling, functie en het onderhoud van zenuwcellen
Naam DEC: DEC Utrecht
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen:

€ 1.757,-

De leges voldoet u:

na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

 Projectvoorstel Beschrijving Dierproeven Niet-technische samenvatting**Ondertekening**

Naam:

[REDACTED]

Functie:

[REDACTED]

Plaats:

Utrecht

Datum:

5 september 2022



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

UU -ASC
Postbus 80.011
3508 TA UTRECHT


**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0800 789 0789
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD10800202216383
Bijlagen
2

Datum 5 september 2022
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 5 september 2022
Vervaldatum: 5 oktober 2022
Factuurnummer: 2216383
Ordernummer: CB.841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD10800202216383	€ 1.757,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL29INGB 070.500.1512 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven te 's Gravenhage.

From: info@zbo-ccd.nl
To: [Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht; CvB postmap \(UBD BS\)](#)
Cc: dec-utrecht@umcutrecht.nl
Subject: Aanhouden AVD10800202216383
Date: vrijdag 21 oktober 2022 11:27:44

Geachte [REDACTED]

Op 05-09-2022 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Molecular and cellular processes controlling the development, maintenance and plasticity of neurons" met aanvraagnummer AVD10800202216383. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

Wij hebben de volgende informatie van u nodig om uw aanvraag verder te kunnen beoordelen:

Niet technische samenvatting

- Aan de hand van de NTS is niet op te maken waarom er gebruik wordt gemaakt van zowel muizen als ratten. Kunt u dit toelichten in het onderdeel "keuze diersoorten"?
- De doelcategorieën die zijn aangegeven in de NTS komen niet overeen met die van het projectvoorstel. Kunt u dit kloppend maken?

Onduidelijkheden

Projectvoorstel

- Onder 3.4.3 geeft u voor de verschillende type dierproeven een andere omschrijving als die gebruikt in de bijlagen dierproeven onder 1.3. Kunt u deze kloppend maken?

Bijlage dierproeven 2

- Onder A. bij de procedures geeft u aan dat de pups van een leeftijd van P21-23 zonder anesthesie worden gedecapiteerd en dat het noodzakelijk is dat de procedure snel is om de kwaliteit van het levende hersenweefsel te waarborgen. Het is niet duidelijk waarom verdoven van de dieren niet past binnen het experiment omdat het onder anesthesie brengen van de dieren nog gebeurt vóór de decapitatie. Kunt u wetenschappelijk onderbouwen waarom het toepassen van anesthesie voor deze groep dieren onverenigbaar is met het doel van de proef?
- Onder F. geeft u het verwachte ongerief voor volwassen dieren. In de bijlage lijken er uitsluitend dieren met een leeftijd P5-23 te worden gebruikt. Kunt u in dit onderdeel het verwachte ongerief van de pups in percentages geven?

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

Indien de antwoorden donderdag 27 oktober ontvangen zijn, kan uw aanvraag komende vergadering behandeld worden.

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven



www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

.....
T: 0800 789 0789
E: info@zbo-ccd.nl

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.
The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.



Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 93118
2509 AC 's-GRAVENHAGE

Afzender

Faculteit [REDACTED]

Bezoekadres

[REDACTED]

Uw kenmerk AVD10800202216383
Ons kenmerk
Telefoon [REDACTED]
Fax
E-mail [REDACTED]
Website www.uu.nl
Datum 26 oktober 2022
Onderwerp Antwoord op vragen AVD10800202216383
Bijlagen 4

Geachte [REDACTED]

Hieronder vindt u puntsgewijs de antwoorden op uw mail van 21 oktober 2022. De antwoorden zijn verwerkt in bijgaande stukken, nieuwe tekst is in blauw weergegeven.

Niet technische samenvatting

- Aan de hand van de NTS is niet op te maken waarom er gebruik wordt gemaakt van zowel muizen als ratten. Kunt u dit toelichten in het onderdeel "keuze diersoorten"?

Wij hebben dit toegelicht in de NTS onder "keuze diersoorten".

- De doelcategorieën die zijn aangegeven in de NTS komen niet overeen met die van het projectvoorstel. Kunt u dit kloppend maken?

Het gaat om fundamenteel onderzoek, we hebben dit kloppend gemaakt.

Onduidelijkheden

Projectvoorstel

- Onder 3.4.3 geeft u voor de verschillende type dierproeven een andere omschrijving als die gebruikt in de bijlagen dierproeven onder 1.3. Kunt u deze kloppend maken?

Wij hebben de omschrijvingen aangepast in 3.4.3 en kloppend gemaakt met de bijlagen.

Bijlage dierproeven 2

- Onder A. bij de procedures geeft u aan dat de pups van een leeftijd van P21-23 zonder anesthesie worden gedecapiteerd en dat het noodzakelijk is dat de procedure snel is om de kwaliteit van het levende hersenweefsel te waarborgen. Het is niet duidelijk waarom verdoven van de dieren niet past binnen het experiment omdat het onder anesthesie brengen van de dieren nog gebeurt vóór de decapitatie. Kunt u wetenschappelijk onderbouwen waarom het toepassen van anesthesie voor deze groep dieren onverenigbaar is met het doel van de proef?

Dit was helaas niet duidelijk aangegeven inderdaad, de dieren zullen verdoofd worden met isofluoraan voor decapitatie. Dit is nu aangepast in Appendix 2.



- Onder F. geeft u het verwachte ongerief voor volwassen dieren. In de bijlage lijken er uitsluitend dieren met een leeftijd P5-23 te worden gebruikt. Kunt u in dit onderdeel het verwachte ongerief van de pups in percentages geven?

Het ongerief is voor alle dieren mild, dit is aangepast.

Met vriendelijke groet,

[Redacted signature]

Onderzoeker en Universitair Docent



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag



Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0800 789 0789
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD10800202216383

Bijlagen

3

Datum 28 oktober 2022

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Op 5 september 2022 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Molecular and cellular processes controlling the development, maintenance and plasticity of neurons" met aanvraagnummer AVD10800202216383. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. Deze vergunning wordt afgegeven voor de periode van 1 januari 2023 tot en met 31 december 2027.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

Procedure

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie DEC Utrecht (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 11 oktober 2022. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Nadere vragen aanvrager

Op 21 oktober 2022 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op de onderbouwing voor de diersoort en de genoemde doelcategorieën in de NTS, de omschrijvingen van de verschillende typen dierproeven onder 3.4.3. van het projectvoorstel en het onder anesthesie doden van een deel van de dieren en het ongerief van de pups in bijlage 3.4.3.2. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Datum:

28 oktober 2022

Aanvraagnummer:

AVD10800202216383

Overwegingen

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

De vergunde termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat de maximale looptijd van een vergunning 5 jaar is.

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 93118, 2509 AC Den Haag.

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze nummers in de rechter kantlijn in deze brief.

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de vergunninghouder valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.nl of neem telefonisch contact met ons op: 0800 789 0789.

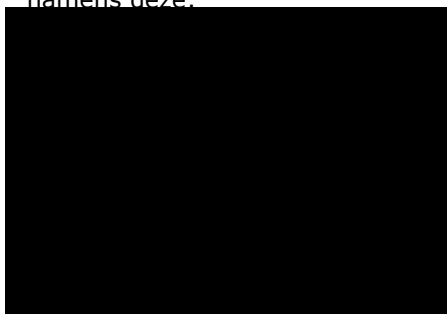
Datum:

28 oktober 2022

Aanvraagnummer:

AVD10800202216383

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

**Bijlagen:**

- Projectvergunning
- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Universiteit Utrecht

Adres: Postbus 12007

Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT

Deelnemersnummer: 10800

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 januari 2023 tot en met 31 december 2027, voor het project "Molecular and cellular processes controlling the development, maintenance and plasticity of neurons" met aanvraagnummer AVD10800202216383, na advies van dierexperimentencommissie DEC Utrecht. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Universitair Docent. Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 5 september 2022
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 26 oktober 2022;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.3.1 Sacrifice pregnant rodents to obtain embryos and prepare primary dissociated neuron cultures., zoals ontvangen op 26 oktober 2022;
 - 3.4.3.2 Killing of rodent pups to prepare organotypic slice cultures, zoals ontvangen op 26 oktober 2022;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 26 oktober 2022;
 - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 11 oktober 2022
 - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 26 oktober 2022.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
3.4.3.1 Sacrifice pregnant rodents to obtain embryos and prepare primary dissociated neuron cultures.			
	Ratten (Rattus norvegicus) / Wistar, embryo's / adult	5.896	100,0% Licht
3.4.3.2 Killing of rodent pups to prepare organotypic slice cultures			
	Ratten (Rattus norvegicus) / Wistar	240	100,0% Licht
	Muizen (Mus musculus) / C57/BL6, WT and transgenic	170	100,0% Licht

Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, eerste lid en/of artikel 10a3 van de wet.

Aanvraagnummer: AVD10800202216383

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



Aanvraagnummer:

AVD10800202216383

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven. Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

Verzorging

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 van de wet staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

Pijnbestrijding en verdoving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd

Aanvraagnummer:
AVD10800202216383

voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

Volgens artikel 13b van de wet moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

Uit artikel 13c van de wet volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

In artikel 13d van de wet is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.