

	<b>Dossier: AVD11500202216569</b>	
		<b>Aanwezig</b>
<b>1</b>	<b>NTS</b>	<b>X</b>
<b>2</b>	<b>Aanvraagformulier</b>	<b>X</b>
<b>3</b>	<b>Projectvoorstel</b>	<b>X</b>
<b>4</b>	<b>Bijlage beschrijving dierproeven</b>	<b>X</b>
<b>5</b>	<b>DEC-advies</b>	<b>X</b>
<b>6</b>	<b>Ontvangstbevestiging</b>	<b>X</b>
	<b>Evt. Vragen CCD aan aanvrager</b>	<b>X</b>
	<b>Evt. antwoorden aanvrager</b>	<b>X</b>
<b>7</b>	<b>Beschikking en vergunning</b>	<b>X</b>

## NIET-TECHNISCHE PROJECTSAMENVATTING

Naam van het project	Bestuderen hoe neuronen communiceren om functionele netwerken te vormen
NTS-identificatiecode	NTS-NL-698299 v.1, 02-10-2023
Land	Nederland
Taal	nl
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	brein ontwikkeling neuronale cel ziekte cortex
Doel(en) van het project	Fundamenteel onderzoek: Zenuwstelsel Fundamenteel onderzoek: Ontwikkelingsbiologie

### 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).	Hersenontwikkeling is een complex proces dat afhankelijk is van erfelijke en omgevingsfactoren. De afgelopen jaren hebben we ons verdiept in hoe het muizenbrein zich ontwikkelt. Er zijn veel overeenkomsten tussen het brein van de muis en het menselijk brein. Als we begrijpen hoe het muizenbrein groeit en zichzelf organiseert vanuit een paar cellen, kan dat ons inzicht geven in hoe het menselijk brein wordt gevormd. Hersencellen ontstaan op specifieke locaties en na rijping verplaatsen ze zich om verbindingen te vormen met hersencellen die in andere hersengebieden zijn ontstaan. Om hun partners te vinden, vertrouwen hersencellen op hun vermogen om te bewegen. In dit project gaan we onderzoeken hoe een type hersencel beweegt en hoe belangrijk deze is voor het reguleren van hersenactiviteit later in het leven. Deze cellen bewegen op specifieke momenten van de hersenontwikkeling en het is niet bekend of het veranderen van de manier waarop ze bewegen of de timing er voor zorgt dat de manier waarop ze omgaan met de cellen waarmee ze zich verbinden in de buitenlaag van de hersenen (hersenschors) verandert. Deze kennis is belangrijk omdat we vermoeden dat bij hersenontwikkelingsziekten zoals autisme, erfelijke of omgevingsveranderingen de manier waarop deze cellen op elkaar inwerken verandert en kan leiden tot blijvende veranderingen in de manier waarop de hersenen later in het leven functioneren.
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).	Hoewel dit project tot doel heeft te begrijpen hoe de hersenen zich ontwikkelen en functioneren, is deze kennis ook essentieel om ontwikkelingsstoornissen in de hersenen te begrijpen en te behandelen. De economische last die gepaard gaat met dit type ziektebeelden is aanzienlijk. Onderzoeksprogramma's worden opgezet voor het in kaart brengen van het erfelijke materiaal (DNA) van patiënten met erfelijke afwijkingen en het vinden van relatie tussen erfelijke informatie en ziekte. Dat bevindingen samenvallen betekent nog niet dat ze elkaar beïnvloeden. Tot nu toe is er geen effectieve behandeling voor hersenontwikkelingsziekten en dit is waarschijnlijk te wijten aan de weinige kennis die we hebben over de basis processen die de hersenontwikkeling sturen. Het kortetermijndoel van dit project (bereikbaar binnen vijf jaar) is het ophelderen van de relevantie van bewegingen van hersencellen voor de organisatie van de hersenschors, een structuur die betrokken is bij verschillende cognitieve (vermogen om kennis op te nemen en te verwerken) gedragingen. Deze muizenstudie is de eerste stap naar een beter begrip van de ontwikkeling van het (menselijk) brein bij gezondheid en ziekte. We zullen dan kunnen testen of het behouden van bewegingen van hersencellen de problemen die autistische patiënten ervaren in het omgaan met informatie uit hun omgeving kan verbeteren.

## VOORSPELDE SCHADE

In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.

Wij zullen voornamelijk dieren gebruiken waarvan erfelijke informatie is aangepast, om te onderzoeken hoe het veranderen van de beweging van hersencellen de ontwikkeling van de hersenschors en de hippocampus (hersengebieden van interesse) verandert bij deze aanpassingen. Dit ook om te onderzoeken of deze veranderingen vergelijkbaar zijn met die bij autistische patiënten. We zullen muizenembryo's, muizenpups en mannelijke of vrouwelijke volwassen muizen gebruiken. De volgende type handelingen maken deel uit van deze studie:

- 1- Veranderen van erfelijke informatie in hersencellen. Bij deze procedure ondergaan zwangere muizenvrouwtjes een keizersnede om embryo's bloot te leggen. Genetisch materiaal zal met een naald worden ingebracht in de hersenen van embryo's, en met behulp van een elektrische stroompjes zal dit erfelijk materiaal worden afgeleverd bij hersencellen van belang.
- 2- Inbrengen van virussen met erfelijk materiaal in specifieke cellen in de hersenen. Deze techniek vereist de injectie van speciaal ontworpen virusachtige deeltjes onder de schedel van de pup.
- 3- Inbrengen van erfelijk materiaal om de activering van erfelijke informatie in de hersenen in de perioden net na de geboorte te veranderen. Bij deze procedure wordt DNA afgeleverd onder de schedel, die na de geboorte erg zacht is en met behulp van elektrische pulsen wordt het genetisch materiaal in doelcellen ingebracht.

Naast deze experimenten zal hersenweefsel van embryo's, muizenpups en volwassen muizen worden verzameld voor veranderingen in de hersenstructuur en metingen in hersenplakjes (bv. real-time live beeldvorming en het ex vivo meten van de activiteit van de hersencellen). We zullen ook gedragstesten uitvoeren om te beoordelen of de dieren waarin deze aanpassingen werden uitgevoerd tijdens de ontwikkeling, op volwassen leeftijd kenmerken van autisme vertonen (stereotiep en repetitief gedrag, leerstoornis, gebreken in sociaal gedrag en verminderde of verhoogde gevoeligheid voor externe stimulatie).

De term in vivo verwijst naar manipulaties die worden uitgevoerd in een levend dier, zoals de injectie van genetisch of viraal materiaal in de hersenen van muizenembryo's en volwassen muizen. Ex-vivo-experimenten worden uitgevoerd op embryo's en dieren die eerder zijn gedood en worden gebruikt om evaluaties op korte termijn uit te voeren om te beslissen of er al dan niet in-vivo-experimenten moeten worden uitgevoerd.

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?

De hierboven beschreven procedures zijn van invloed op het welzijn van de dieren. De zwangere moeders, want die gaan onder narcose en hebben de gevolgen van een operatie. De behandelde embryo's omdat er afwijkingen in gedrag worden verwacht. Ook zullen volwassen muizen van wie de hersenontwikkeling tijdens de zwangerschap na de geboorte verstoord was, worden onderworpen aan gedragstesten om het effect van deze manipulaties te beoordelen op hun vermogen om met andere dieren en met hun omgeving om te gaan. Deze tests zullen worden uitgevoerd in kunstmatige apparaten die verschillen van hun thuishok. De geteste dieren kunnen minder stress ervaren terwijl ze worden blootgesteld aan deze kunstmatige omgevingen. We zullen methoden introduceren om het lijden te minimaliseren. De volwassen mannetjes en vrouwtjes worden in kleine groepjes gehouden omdat muizen als sociaal dier graag bij elkaar zitten. Mannetjes en vrouwtjes worden in verschillende kamers gehuisvest en er is een specifieke kamer om te paren. Deze strategie minimaliseert agressief gedrag tussen mannetjes.

Volgens de literatuur en onze eerdere ervaring wordt verwacht dat het genetische materiaal dat samen de beweging van schakelende zenuwcellen regelt, de hersenontwikkeling verandert zonder een grote verandering te veroorzaken in fysieke variabelen zoals gewichtstoename en voedselinname. Voor experimenten waarbij we een chirurgische ingreep zullen uitvoeren, gebruiken we anesthesie tijdens de procedure en monitoren we dagelijks de postoperatieve toestand van de dieren. Als we tekenen van welzijnsbeperking waarnemen, zoals het onvermogen om water te drinken, voedsel te eten, niet te kunnen bewegen of geen interesse hebben in het verkennen van de kooi, zullen we deze dieren doden om het lijden te minimaliseren. De dieren die een gedragsonderzoek ondergaan, worden getraind in de testapparatuur en de gedragsruimte. Hierdoor zullen de dieren wennen aan de onderzoeker, aan de omgang en aan deze kunstmatige omgevingen. Deze strategie zal angst verminderen.

Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de

Soort:	Totaal aantal	Geraamde aantallen naar ernstgraad			
		Terminaal	Licht	Matig	Ernstig

aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?	Muizen (Mus musculus)	3744	0	2484	1260	0
Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?	Soort:	<i>Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</i>				
		<i>Hergebruikt</i>	<i>Teruggeplaatst</i>	<i>Geadopteerd</i>		
Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.	<p>Vrouwelijke dieren worden gedood voor het gebruik van embryo's.</p> <p>Pups en volwassen mannetjes en muizen zullen worden gedood om de hersenen uit te nemen om het weefsel te bestuderen door cellen aan te kleuren of door in levende cellen live beeldvorming of hersencel activiteit te meten.</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.

Hersenontwikkeling omvat een complexe opeenvolging van gebeurtenissen die onder meer afhangt van de interactie tussen verschillende celtypen. Als we de ontwikkeling van muizenhersenen bestuderen om conclusies te trekken over de ontwikkeling van het menselijk brein, kunnen we muizen tot nu toe niet volledig vervangen door van mensen afkomstige stamcelmodellen. Op de afdeling Translationele Neurowetenschappen hebben we een laboratorium om stamcellen van menselijke oorsprong te kweken, maar deze systemen zijn alleen geschikt voor het bestuderen van celbiologische vragen. Onze wetenschappelijke vragen zijn breder en hebben tot doel het verband tussen celbeweging te bestuderen en de vorming van hersenverbindingen. Hiervoor zijn dieren nodig.

### 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.

Om het aantal dieren dat in deze studie wordt gebruikt te verminderen, zullen we twee benaderingen volgen:

1- We zullen een eerste screening van embryo's uitvoeren vóór het midden van de dracht voordat we veranderingen in het erfelijke materiaal in vivo testen. We zullen controle- en testversies van erfelijke informatie of virusdeeltjes die dit kunnen inbouwen in hersencellen in beide hersenhelften injecteren. Dit zal het aantal dieren in de studie verminderen.

2- We hebben een wiskundige formule gebruikt om het minimum aantal dieren te berekenen dat nodig is om statistische vergelijkingen met biologische betekenis uit te voeren.

Bovendien zullen we, als de voorbereidende experimenten geen uitsluitsel geven of onze experimentele hypothese ongeldig maken, het onderzoek vroegtijdig beëindigen.

### 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.

Bij de meeste experimenten zullen de dieren worden gedood met behulp van de meest geschikte methode om het lijden tot een minimum te beperken. Volwassen dieren zullen bijvoorbeeld worden gedood door nekbreuk, terwijl muizenpups worden onthoofd. Dit is een vertrouwde methode omdat het dier snel en zonder lijden wordt gedood. Dieren die tijdens hun ontwikkeling erfelijke aanpassingen hebben ondergaan en tot volwassenheid worden gehouden, zullen dagelijks worden gecontroleerd. Als de dieren stoppen met eten of drinken, een slechte vachtconditie vertonen of onbeweeglijk blijven zonder interactie, beëindigen we de experimenten. Volwassen vrouwelijke en mannelijke muizen worden in kooien gehouden met nestgenoten van hetzelfde geslacht, zodat ze sociaal gedrag kunnen vertonen, wat essentieel is voor hun welzijn. Ze zullen worden blootgesteld aan voorwerpen om mee te spelen en papier om nesten te vormen. Ook worden mannetjes- en vrouwtjesmuizen in aparte kamers gehouden om agressief gedrag tussen mannetjes onderling te voorkomen. Proefdieren worden slechts de noodzakelijke tijd in het muizenverblijf gehouden.

Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe

Het muismodel wordt veel gebruikt om hersenontwikkelingsprocessen te bestuderen. De werking van hersencellen en moleculen zijn goed in kaart gebracht en de meeste biologische processen zijn tijdens de evolutie behouden gebleven. Onze biologische vraag bestaat uit het onderzoeken hoe hersencellen bewegen en de timing waarop het plaatsvindt belangrijk is voor de vorming en ontwikkeling van de hersenschors. Hersencel beweging wordt uitgebreid bestudeerd in de muis, een diersoort waarin de hersengebieden van interesse zeer veel overeenkomsten vertonen met het menselijk brein. De combinatie van voorkennis van hersenontwikkeling en het vermogen om de vertaalslag naar de mens te trekken maakt de muis een geschikt model. Daarnaast is er de mogelijkheid om veranderingen te realiseren en heeft de muis een korte levenscyclus. Dit maakt de

muis het ideale model voor ons onderzoek.

Terwijl we biologische processen bestuderen die betrokken zijn bij de ontwikkeling van de hersenen, zullen we experimentele veranderingen uitvoeren in vroege ontwikkelingsperioden (embryo's en muizenjongen). We zullen een analyse uitvoeren van het gedrag en de hersenfunctie in de volwassen stadia.

**VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT**

Project geselecteerd voor BA?	nee
Termijn voor BA	
<a href="#">Reden voor de beoordeling achteraf</a>	
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](http://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 in 11500  
 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	UMC Utrecht			
Titel, voorletters en achternaam van de portefeuillehouder	Titel	Voorletters	Achternaam	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw
	██████	████	██████	

E-mailadres contactpersoon	info@ivd-utrecht.nl			
----------------------------	---------------------	--	--	--

Titel, voorletters en achternaam van de diens gemachtigde (indien van toepassing)	Titel	Voorletters	Achternaam	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> 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	3584CJ	UTRECHT	
--------------------	--------	---------	--

Postbus, postcode en plaats	80125	3508TC	UTRECHT
-----------------------------	-------	--------	---------

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	████████████████████	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
-----------------------------	----------------------	---

Functie	Assistant Professor		
---------	---------------------	--	--

Afdeling	Brain division - Translational Neuroscience		
----------	---	--	--

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	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	
		Afdeling	
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	
		(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 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 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 - 5 - 2023
		Einddatum (t/m)	30 - 4 - 2028
3.2	Wat is de titel van het project?	Understanding the role of interneuron migration in the formation of cortical and hippocampal networks	
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Moleculaire mechanismen van hersenontwikkeling	
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

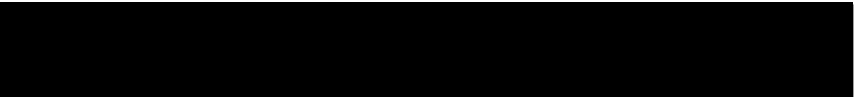

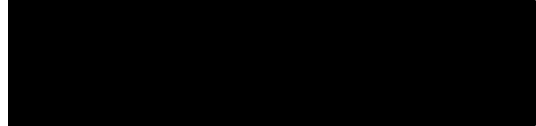
## 4 Factuurgegevens

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:	
4.2 (optioneel) Vul hier het ordernummer van de instelling in.	Postcode:	Plaats:	
	Postbus: 80.011	Postcode: 3508TA	Plaats: UTRECHT
	E-mail: asc.factuur@uu.nl		
	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 1 <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:
	<ul style="list-style-type: none"> <li>dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.</li> <li>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.</li> <li>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.</li> <li>dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.</li> <li>dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.</li> </ul>
	Naam  Functie  Plaats      Utrecht Datum      10 - 11 - 2022 Handtekening 



H402

## 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](http://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'.	11500
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht
1.3	Provide the title of the project.	Role of Interneuron Migration in the Development of the Cerebral Cortex

### 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.

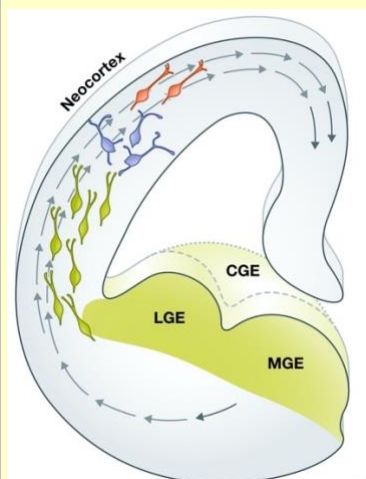
Brain development is a complex process involving several cellular and molecular steps, notably, **neuronal generation, neuronal migration to the final destination**, establishment of **synapses between neurons** and **formation of neuronal networks underlying cognitive processes** and

**behaviors.** Defects in these fundamental processes may lead to disorders such as autism spectrum disorders (ASD) (Garcia-Forn et al., 2020). **ASD is characterized by: 1)** impairments in communication and sociability; **2)** hyper or hypo sensitivity to external stimulation (e.g. sensitivity to noise, physical touch and visual stimuli); **3)** stereotypic and repetitive behaviors. Although ASD has an early onset, during brain development, the impairments continue in the adulthood, which may lead to limited social integration and poor employment prospects for the patients. There is thus a large economic burden associated with special education for children with ASD and with the integration of ASD patients in the working system in adulthood (Lavelle et al., 2014). This creates a societal pressure on the scientific community to discover the treatment for these complex developmental diseases.

**To cure ASD it is necessary to understand the developmental roots of the disease.** Despite associations with genetic causes (e.g. mutations and chromosomal abnormalities) and despite we currently know that some environmental factors seem to be related to the disease, the complexity of the interaction between genes and environment leads to a conundrum of possibilities that might initiate or contribute to the disease. (Karimi et al., 2017; Garcia-Forn et al., 2020). Hence, **how brain developmental processes such as neurogenesis, migration and neuronal circuit formation are impaired and how its disfunction contributes to the core symptoms of the disease is unknown.** A priority in fundamental and translational research is to define key biological processes altered, defining the timing of intervention, cell populations and molecular pathways to target by therapeutic strategies. **Animal models of ASD have been of great importance to assess how gene loss of function, mutations, chromosome duplications and deletions generate alteration in brain circuitry. A drawback of these models is that these alterations affect several populations of cells and have an impact in several developmental processes.** This makes difficult the task of isolating cell populations and biological processes for intervention because the molecular alterations affect several cell populations. Humanized *in vitro* models of ASD, such as brain organoids, have emerged as important tools to study the early steps of the **human brain development**, but these models still **lack the complexity of the *in vivo* systems** and this is an important limitation for the understanding of how alterations in neurons have repercussions in neuronal networks and circuits, resulting in cognitive impairments and alterations in behaviors. Fundamental research in developmental neuroscience, using different approaches including animal models, is thus essential to pursue on: **1)** understanding the developmental roots of the disease and **2)** finding a cure or therapeutic strategies that would improve the quality of life of the patients.

I am a developmental neuroscientist and I spent the last years studying the development of the cerebral cortex and hippocampus using murine models. I am now aiming at applying my expertise to better understand ASD. The development and function of the cerebral cortex and hippocampus are severely impaired in ASD. Both in mouse models and human tissue from ASD patients, **the balance between excitation and inhibition** was found altered in these two structures and hence, an imbalance between excitation and inhibition has been proposed as a cause for ASD. This balance depends on the number and function of excitatory and inhibitory neurons in the brain. The appropriate final numbers of excitatory and inhibitory neurons are defined during brain development. While projection neurons are born locally, **interneurons migrate from faraway locations** (subcortical regions) to later establish synapses with excitatory projection neurons (see **Figure 1**). **My work from the last years revealed that interneuron migration is a limiting step in the formation of the cerebral cortex and hippocampus. I demonstrated that intrinsic and extrinsic properties of interneuron migration modulate the arrival of the appropriate number of interneurons and control their position in the cerebral cortex.** In two seminal projects I showed that: **a)** the way interneurons move (speed of migration and pausing time) influences the development of the cerebral cortex; **b)** only a small fraction of interneurons migrate to the cerebral cortex at specific time points depending on interactions that they establish with another cell type named oligodendrocyte precursor cells (Lepiemme et al., 2022).

**Figure 1**



**Figure 1** – Representation of half of a brain slice at mid-embryogenesis. Interneurons are generated in proliferative regions named ganglionic eminences (highlighted in green). The medial ganglionic eminence (MGE) generates the majority of the cortical interneurons. Migrating interneurons (green) move from these regions towards the neocortex where they will establish synaptic contacts (see the directions of the arrows).

**My experimental hypothesis is that an abnormal interneuron migration might be a pathomechanism implicated in ASD by impairing the excitation/inhibition balance.** However, since interneuron migration takes place after neurogenesis and before neuronal circuit formation, it is difficult to establish a causal link between interneuron migration dysfunction and ASD while using ASD mouse models since mutations, chromosomal alterations or environmental factors affect virtually all stages of development, independently or sequentially. It is thus essential to take advantage of transgenic mouse models enabling altering or modulating interneuron migration, in a cell-type and time-dependent manner to probe for the contribution of interneuron migration defects in the excitation and inhibition imbalance in ASD. These transgenic mouse models can also be combined with mouse lines for the visualization of interneurons and/or glial cell populations allowing to establish causal relationships between the experimental manipulations and intercellular dynamics.

To test this hypothesis and study whether alterations in interneuron migration induce circuit alterations leading to ASD-like behaviors, my team will perform the following experiments: **1) change the intrinsic migration properties (speed of migration, pause duration) of interneurons and 2) interfere with OPC-interneuron interaction during developmental stages and then evaluate the functional consequences in cognition and behaviors later in life.** For example, we will then investigate how interneurons integrate into neuronal circuits during postnatal periods and how they function during the execution of behaviors. The manipulations to interfere with interneuron migration will be performed at specific embryonic periods. All the modifications occurring after this initial step result from an abnormal interneuron migration and if later in life the animals display ASD-like behaviors and abnormal cognitive traits, **we will be able to establish causality between migration defects and cognitive behavior abnormalities also described in ASD mouse models and human patients.** In the last step of the project we will use ASD animal models displaying interneuron migration defects to then test rescue strategies to correct these defects and test whether rescuing specifically interneuron migration during brain development would be sufficient to mitigate neuronal circuit dysfunction and behavioral alterations. If so, we will be able to claim that: **1) interneurons migration defects is a pathomechanism implicated in ASD and 2) correcting interneuron migration defects is a promising therapeutic strategy to mitigate ASD-like cognitive and behavioral defects.**

**Moreover, this project has also the potential of shedding light on novel regulatory mechanisms involved in brain development.**

My research group is established in the Translational Neuroscience (TN) Department. The TN hosts a mouse facility disposing all multiple rooms for breeding, surgery and preparation of brain tissue for histological and functional analysis. Furthermore, I am in close interaction with the laboratories of Dr. Jeroen Pasterkamp and Frank Meye, experts in brain development and neuronal circuit function. My interaction with their laboratories and technical staff can facilitate the progression of my research plans. Furthermore, the embedding of our institute in a hospital facilitates the dialogue with pediatricians and psychiatrists working with patients diagnosed with ASD. This can promote future collaborations to use human stem cells to study brain development aspects of the disease.

#### **References:**

- Broix L et al. (2018) Ciliogenesis and cell cycle alterations contribute to KIF2A-related malformations of cortical development. *Hum Mol Genet* 27:224–238.
- Canas PM, Porciúncula LO, Cunha GMA, Silva CG, Machado NJ, Oliveira JMA, Oliveira CR, Cunha RA (2009) Adenosine A2A receptor blockade prevents synaptotoxicity and memory dysfunction caused by beta-amyloid peptides via p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurosci* 29:14741–14751.
- CG S, LO P, RJ R, RA C (2006) Blockade of P2Y1 (ATP) receptors prevents glutamate-induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons. 37th Annual Meeting of Society of Pharmacology.
- Courchesne E (2004) Brain development in autism: Early overgrowth followed by premature arrest of growth. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 10:106–111.
- Ergaz Z, Weinstein-Fudim L, Ornoy A (2016) Genetic and non-genetic animal models for autism spectrum disorders (ASD). *Reproductive Toxicology* 64:116–140.
- Garcia-Forn M, Boitnott A, Akpınar Z, De Rubeis S (2020) Linking Autism Risk Genes to Disruption of Cortical Development. *Cells* 9:2500.
- Hashemi E, Ariza J, Rogers H, Noctor SC, Martínez-Cerdeño V (2016) The Number of Parvalbumin-Expressing Interneurons Is Decreased in the Medial Prefrontal Cortex in Autism. *Cereb Cortex*:bhw021.
- Holiga Š et al. (2019) Patients with autism spectrum disorders display reproducible functional connectivity alterations. *Sci Transl Med* 11:eaat9223.
- Karimi P, Kamali E, Mousavi S, Karahmadi M (2017) Environmental factors influencing the risk of autism. *J Res Med Sci* 22:27.
- Lavelle TA, Weinstein MC, Newhouse JP, Munir K, Kuhlthau KA, Prosser LA (2014) Economic Burden of Childhood Autism Spectrum Disorders. *Pediatrics* 133:e520–e529.
- Lepiemme F, Stoufflet J, Javier-Torrent M, Mazzucchelli G, Silva CG, Nguyen L (2022) Oligodendrocyte precursors guide interneuron migration by unidirectional contact repulsion. *Science* 376:eabn6204.
- Minshew NJ, Williams DL (2007) The New Neurobiology of Autism: Cortex, Connectivity, and Neuronal Organization. *Arch Neurol* 64:945.

Peyre E, Silva CG, Nguyen L (2015) Crosstalk between intracellular and extracellular signals regulating interneuron production, migration and integration into the cortex. *Front Cell Neurosci* 9:129.

Silva CG, Métin C, Fazeli W, Machado NJ, Darmopil S, Launay P-S, Ghestem A, Nesa M-P, Bassot E, Szabó E, Baqi Y, Müller CE, Tomé AR, Ivanov A, Isbrandt D, Zilberter Y, Cunha RA, Esclapez M, Bernard C (2013) Adenosine receptor antagonists including caffeine alter fetal brain development in mice. *Sci Transl Med* 5:197ra104.

Silva CG, Peyre E, Adhikari MH, Tielens S, Tanco S, Damme PV, Magno L, Krusy N, Agirman G, Magiera MM, Kessar N, Malgrange B, Andrieux A, Janke C, Nguyen L (2018) Cell-Intrinsic Control of Interneuron Migration Drives Cortical Morphogenesis. *Cell* 172:1063-1078.e19.

Silva CG, Peyre E, Nguyen L (2019) Cell migration promotes dynamic cellular interactions to control cerebral cortex morphogenesis. *Nat Rev Neurosci* 20:318–329.

Silva CG, Porciúncula LO, Canas PM, Oliveira CR, Cunha RA (2007) Blockade of adenosine A(2A) receptors prevents staurosporine-induced apoptosis of rat hippocampal neurons. *Neurobiol Dis* 27:182–189.

Simões AP, Silva CG, Marques JM, Pochmann D, Porciúncula LO, Ferreira S, Oses JP, Beleza RO, Real JI, Köfalvi A, Bahr BA, Lerma J, Cunha RA, Rodrigues RJ (2018) Glutamate-induced and NMDA receptor-mediated neurodegeneration entails P2Y1 receptor activation. *Cell Death Dis* 9:297.

### 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

This project proposal has the duration of five years. **Within this period of time my team will validate and implement strategies to specifically disrupt interneuron migration to ultimately investigate how this process affects the establishment and/or development of neuronal networks in the cerebral cortex and hippocampus. These are the immediate goals of the project. The subsequent goals are: 1) evaluate morphological and functional alterations of interneurons following interneuron migration disruption; 2) investigate the behavioral and cognitive alterations resulting from an impaired interneuron migration. This refined analysis will allow establishing a causal link between interneuron migration defects and cognitive and behavioral defects. We will finally test whether rescuing interneuron migration in ASD mouse models restores circuit formation and normal cognitive behaviors. This will be the ultimate goal of the project.**

3.2.2 Provide a justification for the project's feasibility.

I have a vast experience in developmental neuroscience. I have been using mouse models in my research for at least 15 years. In the last 10 years I have been exploring the molecular regulation of interneuron migration and thus I have technical and theoretical competence to lead this research project. My work has been recognized by peers in the field (*e.g.* my scientific papers gained visibility in high impact factor journals, that are usually highly publicized and disseminated within the scientific community and general public. My pioneer work on understanding of how interneuron migration contributes to the formation of neuronal networks in health and disease make me an emerging leader in the field. Moreover, all the infrastructure and technical as well as scientific support of the

Translational Neuroscience Department will facilitate the completion of this project proposal making my immediate and ultimate goals feasible. For example, I will interact with the Meye team to perform electrophysiology and behavior and with the Pasterkamp lab to design strategies to impair interneuron migration in murine models, during development. The scientific landscape of Utrecht is also important. The proximity and interaction with the Department of Cell Biology of the UU will be essential to analyze cellular alterations by real-time video microscopy. Furthermore, I recently received a research grant from the NWO to carry this research. I will thus be able to hire a PhD student to work in close interaction with postdocs and principal investigators from the department.

**Scientific articles stating my expertise:**

(CG et al., 2006; Silva et al., 2007, 2013, 2018, 2019; Canas et al., 2009; Peyre et al., 2015; Broix et al., 2018; Simões et al., 2018; Lepiemme et al., 2022)

Peyre E, Silva CG, Nguyen L (2015) Crosstalk between intracellular and extracellular signals regulating interneuron production, migration and integration into the cortex. *Front Cell Neurosci* 9:129.

Silva CG, Métin C, Fazeli W, Machado NJ, Darmopil S, Launay P-S, Ghestem A, Nesa M-P, Bassot E, Szabó E, Baqi Y, Müller CE, Tomé AR, Ivanov A, Isbrandt D, Zilberter Y, Cunha RA, Esclapez M, Bernard C (2013) Adenosine receptor antagonists including caffeine alter fetal brain development in mice. *Sci Transl Med* 5:197ra104.

Silva CG, Peyre E, Adhikari MH, Tielens S, Tanco S, Damme PV, Magno L, Krusy N, Agirman G, Magiera MM, Kessar N, Malgrange B, Andrieux A, Janke C, Nguyen L (2018) Cell-Intrinsic Control of Interneuron Migration Drives Cortical Morphogenesis. *Cell* 172:1063-1078.e19.

Silva CG, Peyre E, Nguyen L (2019) Cell migration promotes dynamic cellular interactions to control cerebral cortex morphogenesis. *Nat Rev Neurosci* 20:318–329.

Silva CG, Porciúncula LO, Canas PM, Oliveira CR, Cunha RA (2007) Blockade of adenosine A(2A) receptors prevents staurosporine-induced apoptosis of rat hippocampal neurons. *Neurobiol Dis* 27:182–189.

Simões AP, Silva CG, Marques JM, Pochmann D, Porciúncula LO, Ferreira S, Oses JP, Beleza RO, Real JI, Köfalvi A, Bahr BA, Lerma J, Cunha RA, Rodrigues RJ (2018) Glutamate-induced and NMDA receptor-mediated neurodegeneration entails P2Y1 receptor activation. *Cell Death Dis* 9:297.

Canas PM, Porciúncula LO, Cunha GMA, Silva CG, Machado NJ, Oliveira JMA, Oliveira CR, Cunha RA (2009) Adenosine A2A receptor blockade prevents synaptotoxicity and memory dysfunction caused by beta-amyloid peptides via p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurosci* 29:14741–14751.

Broix L et al. (2018) Ciliogenesis and cell cycle alterations contribute to KIF2A-related malformations of cortical development. *Hum Mol Genet* 27:224–238.

Lepiemme F, Stoufflet J, Javier-Torrent M, Mazzucchelli G, Silva CG, Nguyen L (2022) Oligodendrocyte precursors guide interneuron migration by unidirectional contact repulsion. *Science* 376:eabn6204.

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?

Although this project aims at understanding fundamental processes that control brain development, this knowledge is essential to understand and treat developmental brain disorders in the near future. The economic burden associated with developmental brain diseases such as ASD is significant. Research programs are invested in sequencing the genome of patients with mutations and/or chromosomal abnormalities. **These studies despite being important, are only sufficient to establish correlations between genetics and disease.** There is thus a lack of causal link between genetic abnormalities and ASD pathology and this is **essential to identify cell populations and steps of brain development possible of being targeted by therapeutic strategies.**

The short-term goals of this project (achievable within 5 years) are to elucidate the relevance of interneuron migration in the establishment of cortical and hippocampal circuits and test whether correcting interneurons migration in ASD models can mitigate the core traits of ASD by restoring the excitation/inhibition balance.

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

The project stakeholders are: **1)** the animals used in the study; **2)** the Translational Neuroscience Department at the UMC Utrecht; **3)** the Medical Community of the UMC Utrecht; **4)** the patients and families of the patients suffering from developmental brain diseases; **5)** the scientific community in general.

1) The animals (rodents) are the stakeholders most directly related to the study by the application of the 3Rs. **Animals have moral status and the researchers have the obligation to take their interests into account since they affect and are affected by the objectives of the study in which they are involved. For example, they might also benefit from the research being performed. Furthermore, this research might also lead to refinement and improvement of work protocols and animal wellbeing.**

2) The Translational Neuroscience Department is interested in studying fundamental processes involved in brain development. This research project will generate scientific knowledge that will then be shared with the worldwide scientific community in the form of scientific communications and scientific publications.

3) The Medical Community dealing with patients suffering from developmental brain diseases such as ASD have interest in our fundamental research. Their ultimate interest is to improve the life quality of patients and ultimately treat the disease. This required the identification of time points, cell populations and biological mechanisms to target by therapeutic strategies. This information will be provided by our research.

4) The patients and their families that ultimately will benefit from this research (at long-term).

5) The scientific community will benefit from the knowledge on the fundamental processes governing the development of the cerebral cortex and from the perspectives of using this knowledge to better understand developmental brain diseases and design more and more sophisticated therapeutic strategies for these.

### 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.

This project proposal consists in performing fine molecular manipulations to specifically disrupt interneuron migration without directly compromising the function of other cell populations. The best strategy(es) will then be tested *in vivo*. These experimental plans are the **OBJECTIVE 1**. We will then evaluate how the disrupted interneuron migration alters the development of the cortex and hippocampus. This will be achieved by performing a histological and functional analysis by electrophysiology on these brain regions during several developmental stages. This will allow us to identify periods of time where the balance between excitation and inhibition might be altered. This is our **OBJECTIVE 2**. We then want to test if cellular alterations, such as variations in the number of excitatory and inhibitory neurons induces behavioral alterations. This is the **OBJECTIVE 3**. If we establish a causal link between a perturbed interneuron migration and the onset of ASD-like behaviors (e.g. stereotypies, learning disabilities, low interest in exploration), we will study ASD mouse models in which interneuron migration is compromised. We will then test strategies to rescue interneuron migration to investigate whether correcting interneuron migration is sufficient to restore the balance between excitation and inhibition and mitigate or prevent the manifestation of abnormal behaviors.

Please see below the detailed description of the OBJECTIVE I-IV, milestones, selection points and decision criteria.

**OBJECTIVE 1** - In a first stage, my team will optimize strategies to impair interneuron migration by **I) targeting the intrinsic machinery of the cellular movement; II) impairing interneuron-OPC interaction** (extrinsic mechanism regulating interneuron migration), **III) altering cortical development and changing the properties of the migratory path**. This implies performing some *in vitro* manipulations and controls and then, at a later stage perform validations *in vivo*. (See the description of procedures section for detail).

#### Milestones

We will use three strategies to interfere with interneuron movement and displacement towards the cerebral cortex:

#### Strategy I

The machinery of interneuron movement is complex and depends on the activity of several molecular regulators that ultimately converge on the cytoskeleton of the cell (e.g. microtubules and actin) to control the displacement of the cell. It was discovered that there are two major signalling pathways acting upstream the cytoskeleton: **Ca<sup>2+</sup> and cAMP signalling pathways**. We will thus use DREADDS, a molecular approach to perturb Ca<sup>2+</sup> and cAMP gradients in migrating interneurons. DREADDS are modified muscarinic receptors that are activated by the exogenous application of a drug named CNO. DREADD expression in migrating interneurons might be induced by *ex vivo* or *in utero* electroporation. In a first stage we will test the utility of DREADDS in modulating interneuron migration *in vitro*. We will use DREADDs to increase Ca<sup>2+</sup> levels in the cells and this should increase interneuron motility. We will also use DREADDs that decrease the cellular levels of cAMP and this is expected to slow down interneuron migration. If we successfully modulate interneuron migration by the use of DREADDs *in vitro*, we will purchase transgenic mouse lines to express and activate DREADDs specifically in interneurons in a time-regulated manner.

#### Strategy II

As previously mentioned, interneurons establish physical interactions with OPCs migrating on blood vessels. Perturbing these interactions revealed to impair interneuron displacement towards the cortex. In my previous publication, we did not investigate the postnatal consequences of impairing interneuron migration in the establishment of neuronal networks. One of the reasons why we could not do so is

because we used a strategy to eliminate the OPC population. This manipulation results in side-effects (e.g. craniofacial abnormalities) that compromise the survival of the embryos. We will now use different approaches that I expect to be more physiological, to disrupt OPC-interneuron communication. **I will perturb these physical interactions by targeting proteins in cellular processes of OPCs that are necessary for the contact with interneurons**, notably, the chemokine receptor **CXCR4**, involved in the adhesion and migration of OPCs to blood vessels (OPCs only repel interneurons while moving on blood vessels) and **Semaphorin 6a/b**, necessary for the physical interaction between interneurons and OPCs.

### **Strategy III**

I previously described that interneuron migration is optimized to cortical development and I described a crosstalk between interneurons and projection neurons in the cortex during embryonic development. I will use strategies to artificially delay cortical proliferation and/or induce cortical expansion. **I expect that these manipulations will delay or speed up interneuron migration, respectively.**

We expect to accomplish this task in one year.

### **Selection Points and Decision Criteria**

Only the strategy(ies) that successfully impair interneuron migration *in vitro*, will be tested in mouse embryos, during developmental stages where interneurons perform extensive migration towards the cortex and hippocampus.

**OBJECTIVE 2- I expect that the manipulations performed in the OBJECTIVE 1 will result in an impairment of cerebral cortex development and will ultimately affect behaviors and cognitive tasks and adults will display ASD-like traits.** My team will then perform a series of morphological and functional measurements to evaluate how altering the pattern of interneuron migration affects the establishment of cortical and hippocampal neuronal networks. We will, for example, measure the number and distribution of interneuron subtypes in the developing brain (from embryonic until adult stages) and perform electrophysiological recordings to assess how the defects in interneuron migration alter their activity later in life. ([See the description of procedures section for detail](#)).

### **Milestones**

After impairing interneuron migration via the Strategies I-III, we will investigate whether the final localization of interneuron subtypes, number and electrophysiological properties are altered. Furthermore, some interneurons, such as somatostatin interneurons couple the stage of migration with axonal projection. We will also investigate this aspect. Finally, since OPCs also establish synapses with interneurons during postnatal periods, we will disrupt the establishment of these synapses specifically after birth.

Altogether, the information obtained while developing the OBJECTIVE 2 will allow us to answer to the following scientific questions:

- Is the timing of migration essential for the generation of early patterns of electrical activity?
- Can interneurons reach their final layers/brain regions once migration restarts after being blocked during development?
- Can interneurons project axons to communicate with other cell populations into appropriate places even when their migration was disrupted?

We expect to accomplish this task in one year and half.

### **Selection Points and Decision Criteria**

We will proceed to the OBJECTIVE III only if we observe alterations in interneuron migration during embryogenesis and after confirming that these manipulations do not induce physical alterations compromising the survival and proper development of the embryos until the adult stage (e.g. ability to

move and obtain food).

**OBJECTIVE 3** – We will evaluate how the histological and functional modifications in individual interneurons will affect the behaviour of the animals. **My team will then test the animals in cognitive tasks and behaviours that depend on the integrity of the cortex and hippocampus.** We will also assess if the behavioural modifications reported are equivalent or comparable to the ones found in mouse models of ASD. (See the description of procedures section for detail).

#### **Milestones**

We will perform a battery of behavioural tests, including the Morris Water Maze to assess memory (encoded in the hippocampus) to evaluate global modifications induced by altered patterns of interneuron migration. We will thus use adult males and females in which interneuron migration was disrupted during the developmental period, to test **their interest in exploring, processing sensory information, social and spatial memory and learning abilities.**

The objective three will allow answering to the following question:

- Does a transient delay in interneuron migration timing lead to permanent changes in cognitive processes and behaviours later in life?
- Does a modification in interneuron migration properties induce changes in behavioural phenotypes compatible to ASD?

We expect to accomplish this task in one year.

#### **Selection Points and Decision Criteria**

We will stop the project if we do not observe alterations in cognition and behaviours that would be similar to ASD traits.

**OBJECTIVE 4** – If we find alterations in the behavior of animals in which interneuron migration has been modified, and similar to alterations already reported in ASD, we will perform rescue experiments in ASD mouse models aiming at correcting interneuron migration. This implies characterizing interneuron migration and confirming that interneuron migration is abnormal. (See the description of procedures for detail).

#### **Milestones**

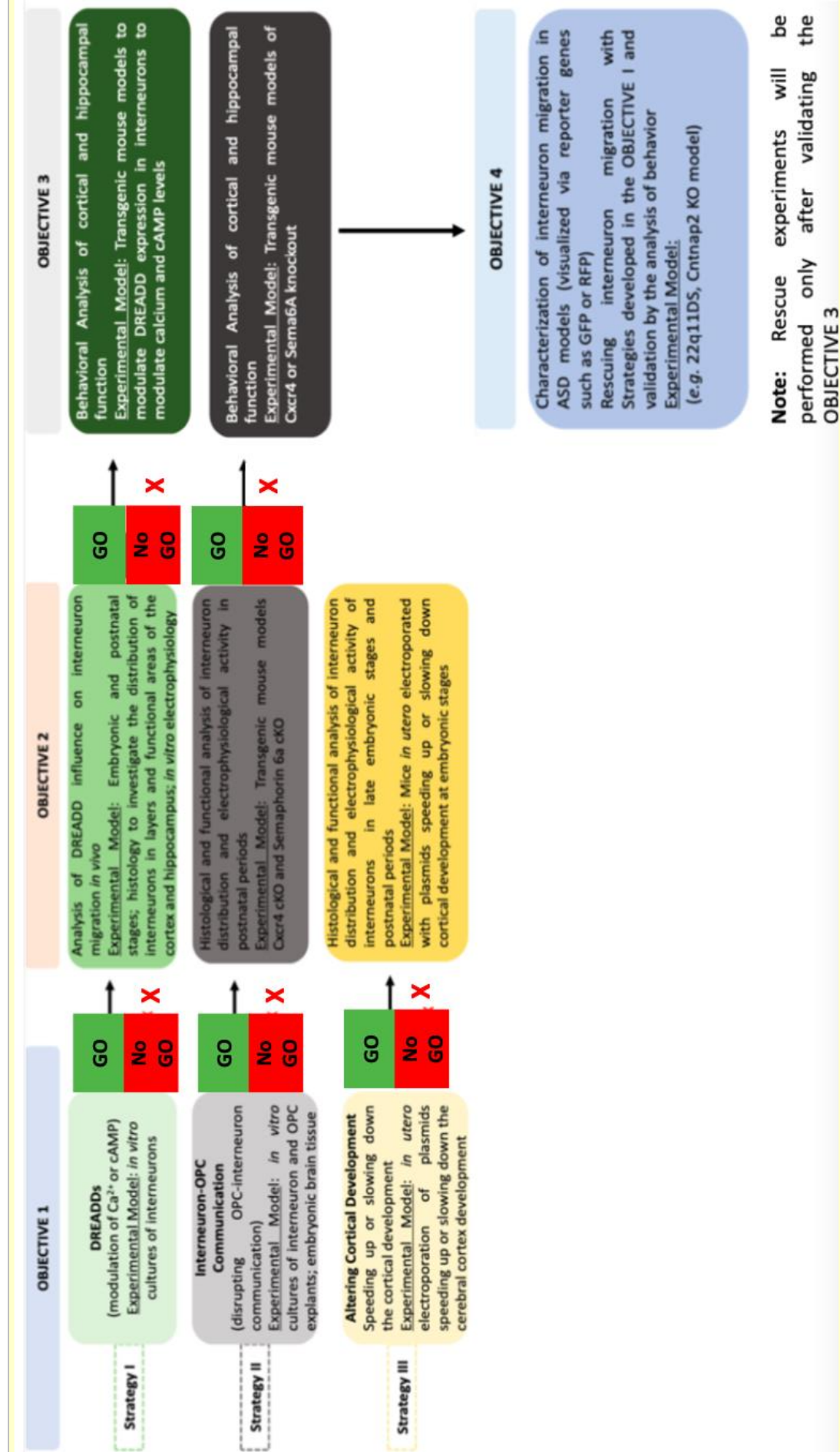
We will characterize interneuron migration in well establish mouse models of ASD such as the mouse model of 22q11deletion syndrome, Cntnap2 mouse model or equivalent (Ergaz et al., 2016). For this purpose, we will cross these mice with mice carrying a reporter gene (fluorescent protein) in interneuron subtypes. This will allow the visualization and quantification of the migration parameters of interneurons. We will then characterize how interneurons integrate distinct cortical and hippocampal circuits and based on these parameters, we will design strategies to correct interneuron migration (by speeding up or slowing down the migration or correcting intercellular interactions) and evaluate whether we can mitigate cognitive and behavioral defects.

We expect to accomplish this task in one year and half.

#### **Selection Points and Decision Criteria**

We will first screen different mouse models of ASD where we can observe overt interneuron migration defects and we will only perform rescuing experiments on these mouse models and after the validation.

See the flow chart in the following page describing the OBJECTIVES, Strategies, Milestones and Decision Criteria (GO/ NO GO points).



3.4.2 Provide a justification for the strategy described above.

The strategy described above is important to make decisions on the utilization of animals and resources. Research studies should have a defined aim and the knowledge generated might significantly improve our understanding on fundamental mechanisms involved in brain development or ultimately serve to improve human health. The outcome of this study for science and human health should justify the use of animals and public funds. The organization of the project in the aforementioned OBJECTIVES and Strategies will allow to terminate the project as soon as the benefits (scientific or translational knowledge) are not significant enough to justify the use of more animals and resources. Thus, each OBJECTIVE is followed by a decision-making process aiming at accessing whether the project will be terminated or continued.

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	Understanding the role of interneuron migration in the development of the cerebral cortex
2	
3	
4	
5	
6	
7	
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](http://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’.	11500	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht	
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	Role of interneuron migration in the development of the cerebral cortex

#### 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.

Brain development follows a sequence of different steps: **neuronal and glial generation, cell migration, formation of synaptic contacts** and **establishment of neuronal networks with balanced electrical activity**. In the last years I have been studying interneuron migration towards the cerebral cortex. Interneurons are the inhibitory cells of the brain and they are essential to control the excitability generated by excitatory projection neurons. Moreover, interneurons generate brain rhythms that are essential to perform cognitive tasks and behaviors.

Interneurons are born in embryonic regions called ganglionic eminences, localized under the cortex, and they perform extensive tangential migration towards this structure. Interneurons move by a performing biomechanical displacements involving the actomyosin and microtubule cytoskeleton (Silva et al., 2018). I recently discovered that interactions occurring between interneurons and early-born oligodendrocyte

precursor cells (OPCs) are also essential for interneuron migration towards the cortex (Lepiemme et al., 2022). **Interneuron recruitment to cortical regions is thus controlled by cell-intrinsic and -extrinsic mechanisms.** Perturbations in interneuron generation and migration might **alter how the cerebral cortex and other structures like the hippocampus, involved in cognitive functions and memory, develop and function later in life.** In this project proposal I will test the hypothesis that interneuron migration defects might be a pathomechanism in ASD. **I will use transgenic mouse models to perturb and visualize interneuron migration and assess whether these alterations generate histological and behavioral alterations as observed in animal models of ASD. We will finally test whether rescuing interneuron migration mitigates these brain alterations. I hypothesize that transiently perturbing interneuron migration will result in an abnormal distribution on these cells in the brain, in adulthood, leading to alterations in the formation of synaptic contacts and alterations in the electrophysiological activity of the same. Since interneurons control brain activity and are responsible for the generation of rhythms in the brain. I expect that altering interneuron migration will then ultimately lead to changes in cognition and behaviors.**

This involves the following **strategy** to obtain specific outcomes:

1- Optimizing and validating molecular methods to perturb interneuron migration and testing their validity in mouse embryos. This refers to the **Objective 1**.

The **expected outcome** is finding a suitable approach to disrupt specifically the process of interneuron migration to then test late functional consequences.

2- My team will then study the long-term consequences of disrupting interneuron migration to the development of the cerebral cortex and hippocampus. We will perform measurements of interneuron number and function in the developing cortex and hippocampus, by histology and electrophysiology, respectively. This corresponds to the **Objective 2**. The **expected outcome** is to find that perturbing interneuron migration only during embryonic development results in a permanent alteration of the postnatal development. **We hypothesize that delaying interneuron migration might alter the final position of interneurons in the cortex and hippocampus and/or the pattern of synaptic connections that they establish.**

3- We will then test the behavior of animals in which we introduced molecular modifications to perturb interneuron migration and function and that result in alterations in interneuron distribution and function to test the behavioral outcomes. This is the **Objective 3**.

The behavioral test that will be performed have been previously described in the literature and are suitable to detect alterations in cognition, repetitive and obsessive behaviors, defects in sensory information processing and learning and lower interest in exploring social and non-social social stimuli:

**Open field:** The animals must explore a squared arena for a few minutes and the time spent exploring the center vs. the corners of the arena will be scored. The time spent in the center vs. the corners will give an indication of the level of anxiety and the total time of exploration will give an indication of the willingness to explore.

**The ladder rung walking task:** Animals are required to walk along a horizontal ladder on which the spacing of the rungs is variable and is periodically changed. Changes in rung spacing prevent animals from learning the absolute and relative location of the rungs and so minimize the ability of the animals to compensate for impairments through learning. Walking along this ladder involves the use of vibrissa and the activation of the somatosensory cortex.

**Y-maze test:** This test aims at measuring the willingness of rodents to explore new environments and detect cognitive deficits. After being introduced in the center of the maze (in the shape of Y), the rodent is allowed to freely explore the three arms. Over the course of multiple arm entries, the mouse should show a tendency

to choose less visited arms. We can then calculate a percentage of alternation.

**Novel object recognition test:** This test is now among the most commonly used behavioral tests for mice. A mouse is presented with two similar objects during the first session, and then one of the two objects is replaced by a new object during a second session. The amount of time taken to explore the new object provides an index of recognition memory.

**Elevated Plus Maze:** The test uses an elevated, plus-shaped (+) apparatus with two open and two enclosed arms. The behavioral model is based on the general aversion of rodents to open spaces. This aversion leads to a preference for remaining in enclosed spaces or close to the edges of a bounded space. Anxiety reduction is indicated in the plus-maze by an increase in the proportion of time spent in the open arms (time in open arms/total time in open or closed arms) and an increase in the proportion of entries into the open arms (entries into open arms/total entries into open or closed arms). The total number of arm entries and number of closed-arm entries are sometimes used as measures of general activity.

**Marble Burying Test:** When rodents are put in a cage with marbles they will bury the marbles. This behavior is seen as anxiety related or obsessive-compulsive behavior. Animals with lower levels of anxiety or OCD bury a lower number of marbles. Obsessive and repetitive behavior is commonly found in ASD mouse models and ASD children.

**Three Chamber Test:** The three-chamber test is one of the most commonly used methods for evaluating social behavior in mouse models of ASD. It is used for assessing an animal's preference for a social environment over a non-social environment (termed social preference or sociability) and its preference for a novel over a familiar conspecific (termed social novelty preference). In this task, the subject mouse is first placed in the medial chamber of a three-chambered apparatus for habituation. A novel same-sex conspecific placed under a wire cup serves as a "social stimulus" in one lateral chamber, while an empty wire cup located in the other lateral chamber serves as a "non-social stimulus." Upon habituation, the walls separating the chambers are raised, allowing the subject to move freely between chambers. "Sociability" in the context of the three-chamber test is defined as the propensity of the subject to spend more time in the "social" chamber containing the conspecific, as compared to the other chamber containing the empty cup. To assess social novelty preference, a second test is carried out immediately following the first, with one chamber containing the same conspecific from the previous test, now serving as a "familiar stimulus", and the other chamber containing a novel conspecific serving as an "unfamiliar stimulus." "Social novelty preference", in this context, is defined as the propensity to spend more time in the chamber containing the novel conspecific than in that chamber with the familiar conspecific.

**Habituation/des-habituation to social and non-social stimuli:** This test consists of sequential presentations of different odors. A commonly used sequence is water, two non-social odors, and two social odors. Each odor (or water) is presented in three consecutive trials for a duration of 2 min. The inter-trial interval is 1 min, which is about the amount of time needed to change the odor stimulus. Habituation is defined by a progressive decrease in olfactory investigation (sniffing) towards a repeated presentation of the same odor stimulus. Dishabituation is defined by a reinstatement of sniffing when a novel odor is presented. This test assesses whether an animal can smell and if it is able to distinguish same and different odors. The method described here involves minimal inter-trial manipulations.

**Barnes Maze:** The Barnes maze is a tool used in psychological laboratory experiments to measure spatial learning and memory. The basic function of Barnes maze is to measure the ability of a mouse to learn and remember the location of a target zone using a configuration of distal visual cues located around the testing area. This noninvasive task is useful for evaluating cognitive deficits in transgenic strains of rodents that model for disease such as ASD. This task is dependent on the intrinsic inclination of the subjects to escape from an aversive environment and on hippocampal-dependent spatial reference memory.

The **expected outcome** is that the anatomical alterations generated by altering the position and activity of interneurons in the brain induces *per se* modifications in the behavior of animals similar to the ones reported in ASD mouse models. Interneurons generate rhythms in the brain and control the activity of projection neurons and other interneurons. They have a function of coordination. I hypothesize that if we find alterations in the distribution, synaptic connections and electrophysiological activity of individual interneurons we will find cognitive and behavioral alterations in tasks that require the functional integrity of the cerebral cortex and hippocampus.

4- We will now use validated ASD mouse models exhibiting alterations in cognition similar to the ones found in our animal models interneuron migration disruption to investigate whether interneuron migration was disrupted in a similar way. This is the **Objective 4**.

The **expected outcome** is that these ASD mouse models display defects in interneuron migration and we will test whether correcting these defects can rescue the abnormal behavioral traits. This will give us the indication that targeting interneurons and targeting the process of migration might be a suitable therapeutic strategy.

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

## **PROCEDURES**

### **To be used in the Objective 1**

- ***In vitro* electroporation**

To disrupt interneuron migration, we will electroporate DNA constructs aiming at reducing or accelerating interneuron migration in *ex vivo* preparations (e.g. organotypic brain slices or tissue explants).

#### **Description:**

Females will be killed by cervical dislocation and embryos will be decapitated in ice-cold saline solution for *in vitro* electroporation. Interneurons will be labeled with fluorescent proteins (e.g. GFP and RFP) and DNA constructs to accelerate/slow down the speed of migration (designer receptors activated by designer drugs: DREADDs). The cells will be monitored by time-lapse video microscopy.

- ***Tamoxifen administration***

I will use transgenic mouse lines for the induction of DREADD expression or for the knockdown of genes that mediate the interaction between interneurons and OPCs, such as *Cxcr4* or *Sema6a-b* (see project proposal).

#### **Description:**

Females will be injected with **tamoxifen** at gestational periods (intraperitoneal (i.p.) injection: 20mg/mouse/day. The Tamoxifen dosage and timing were selected taking into consideration our previous work (Lepiemme et al., 2022). In my previous study we used Swiss females and we did not observe embryo toxicity after i.p injection, however, we were unsuccessful in obtaining pups. This may be due to delivery problems resulting from stress resulting from handling and injection. For assessing the postnatal consequences resulting from impairing specifically interneuron migration during embryogenesis, we will use other methods for tamoxifen delivery to embryos. We will test the following approaches: **1)** We will sacrifice females at term, previously injected with tamoxifen, and we will give the offspring to a surrogate mother (wildtype) that had pups at around the same day or **2)** we will try to minimize the stress that the female injected with tamoxifen undergoes by housing them with another female that will help making the nest, warming nursing the pups; **3)** we will test mixing tamoxifen with appetitive food to avoid injecting or performing gavage on pregnant females.

- ***CNO Administration***

The activation of DREADDs (to accelerate or slow-down interneuron migration) is clozapine N-oxide (CNO)-dependent. CNO is a biologically inert drug at lower dosages. A chronic DREADD activation on embryos requires CNO administration via the mother.

### **Description:**

According to a recent publication, CNO can be administered in a non-invasive way in the drinking water (Zhan et al., 2019). This method will be more suitable to implement in conjunction with tamoxifen administration during pregnancy. After tamoxifen and CNO administration, the pregnant females will be sacrificed between the embryonic stages E13.5 and E18.5. We will further allow pups to be born and we will investigate the distribution of interneurons in the brain between embryonic periods and adulthood.

- ***In utero electroporation***

We will perform *in utero* electroporation to manipulate the development of the cerebral cortex and then investigate how it modifies interneuron migration dynamics. We will use DNA constructs that will speed up or slow down cortical development and we will monitor the migratory behavior of interneurons. In this set of experiments, we will electroporate the developing cortex by *in utero* electroporation both unilaterally or bilaterally. We will target three regions of the developing cortex (**close** to the birth place of interneurons, **faraway** from this region and at a **middle distance**). We will perform these manipulations during early and late embryogenesis to target different populations of cortical projection neurons. We will perform these manipulations in mouse models allowing the visualization of **early-born interneurons** (e.g. Nkx2.1Cre; TdTomato) as well as **late-born interneurons** (e.g. VIP-IRES Cre; YFP).

### **Description:**

The procedure involves performing a **surgery** in anesthetized pregnant females (under isoflurane anesthesia: 4% for induction and 2%-1.5% for maintenance, in a chamber with a flow of 0.8 L/min of oxygen). The entirety of the procedure should not take more than 45 min. The females will be injected with a preoperative dose of analgesic, for example, Buprenorphine) and the surgery will be performed under controlled temperature. The embryos will be constantly hydrated with warm sterile saline solution. The females undergoing surgery will not be left unattended until regaining consciousness. Furthermore, they will be inspected daily for 48h post-surgery. We will perform a pain assessment using as reference the following scientific article: “Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse” (Langford et al., 2010). If we detect pain expressions, we will provide anesthetic for pain relieve. **We will take pro-active measures to minimize/avoid postoperative pain.** The surgeries will be performed by staff trained in the procedure such as senior postdoctoral researchers or technicians. In the absence of the trained staff, the surgeries will be performed by PhD students or postdocs previously trained by qualified personnel. The embryos/pups born from electroporated females will be decapitated and used for the preparation of organotypic brain slices for live imaging and immunohistochemistry to label projection neuron proliferation/differentiation as well as measurements of interneuron migration and integration into cortical circuits.

### **To be used in the Objective 2**

- ***Postnatal electroporation***

Some interneurons migrate in very superficial layers of the cerebral cortex and this pattern of migration is important for the axonal projection in layer I, a region highly populated by OPCs during development. To label these interneurons and follow intracortical migration followed by axonal projection, we will perform postnatal (P) electroporation in P0 pups to label interneurons and the growing axon.

### **Description:**

We will use a published protocol of postnatal electroporation of pups (Lim et al., 2018). Pups (between P0 and P6) will be anesthetized with isoflurane (4.5%; oxygen: 1L/min) and the head fixed on a stereotaxic

stage on top of a heating pad. The pup will be maintained under anesthesia during all the procedure (around 15-20min per pup). We will inject Meloxicam subcutaneously 5mg/kg, on the neck and we will clear the skin over the skull with Chlorhexidine Soap Solution and apply analgesic cream generously. We will then open a small window (1.5mm x 1.5mm, cutting only 3 sides of the window) on the skin covering the crane. We will deliver plasmid DNA into the brain by using a previously prepared sharpened glass micropipette. After applying a drop of neurogel on both the positive and negative poles of the electrodes, we will apply trains of electrical current. We will seal the skin with a small drop of tissue glue and place the pups in a warm recovery cage before being given back to the mothers for nursing. Pup growth and feeding behavior will be monitored daily for at least 48h. If pups stop gaining weight, they will be killed. The experiments will be performed at different time points, implying that the experimental animals will be killed at different stages. The animals will be used to perform organotypic brain slices or for time lapse video microscopy or to obtain tissue to perform immunohistochemistry. This will allow visualizing axonal projection in experimental conditions where interneuron migration was delayed or in mouse models where early born glial cells that potentially interact with interneurons were eliminated (by the expression of diphteria toxin or impaired to migrate to the target destination).

- ***Stereotaxic injection of viral particles at postnatal periods***

Glial cells such as OPCs and microglia were shown to influence interneurons during migration towards cortical regions but OPCs are also able to form synapses with some interneuron subtypes specifically during the early postnatal period. To establish synapses with these interneurons, OPCs need to localize at a certain proximity. I hypothesize that OPC migration during development might also be key for the localization of OPCs close to interneurons for the establishment of synapses. We currently ignore the function of these synapses but a possibility is that they might influence the maturation of interneurons and their function later in life. To address this question, we will use viral vectors to perturb the formation and/or function of these synapses.

**Description:**

We will deliver AAVs in the cerebral cortex of postnatal day 7 (P7) pups. to deliver AAVs in the cerebral cortex. The first steps of this procedure are similar to the protocol used for postnatal electroporation. Pups will be anesthetized with isoflurane (around 4.5%; oxygen: 1L/min) and head fixed on a stereotaxic stage on top of a heating pad. The pup will be maintained under anesthesia during all the procedure (around 15-20min per pup). We will inject anesthetic subcutaneously (e.g. Meloxicam). Viral particles will be delivered with the help of a stereotaxic needle at the anatomical locations preselected (e.g. somatosensory cortex). After sealing the skin with tissue glue, the pups will be delivered to the mother for nursing. Pups will be killed at least 5 days after viral delivery. These viral particles will encode: **1)** a construct the will eliminate the OPCs or **2)** prevent the formation of synapses between OPCs and interneurons. We will then kill the pups and adults to perform electrophysiological recordings during development (from P12 until P60).

**To be used in the Objective 3**

To **assess alterations in cortical function later in life**, resulting from **modifications in intrinsic and extrinsic alterations in interneuron migration during development**, we will perform a battery of behavioral tests to assess cortical and hippocampal function. Since the core behavioral alterations in ASD are: **stereotypic behaviors, learning deficits, defects in social interaction and hypo- or hypersensitivity to sensory stimulation**, we will perform a battery of behavioral tests allowing to detect these defects.

**Description:**

The animals will be trained in an **open field** apparatus and handled (tube handling to remove them from the cage) by the experimenter at least 2 weeks before the onset of the tests. This will **habituate the animals to the room**, to be handled and to walk on the mazes. This will reduce their anxiety.

We will sequentially perform Open Field and Marble Burying test to assess locomotion and stereotypies, Y-maze and Object Recognition test to assess cognition, The Three Chamber's test and Habituation/Dishabituation to social odors tests to assess social behaviors and the Barnes maze and the Ladder Rung Walking test to assess somatosensory cortical function and learning and memory, respectively. Mouse models of ASD have defects in exploration, present stereotypic behaviors (e.g. excessive grooming), impairments and uninterest in social interaction and lower ability and interest to learn new tasks. These tests are non-invasive, do not induce pain neither compromise the physical integrity of the animals. They will be performed in a sequential order from the less stressful to the most stressful. This in one end prevent using a large number of different animals for each group of tests and will allow assessing different behaviors in the same animals and the sequential realization of the different tests will prevent negatively influencing the animals for the subsequent test. If the animals are tested in the most stressful behaviors first, this could compromise their performance in other tests.

The animals will be tested in their most active phase (night). To not disturb their circadian cycle, we will use a UV light invisible to the mice. The animals will also be tested every day at the same time to create a routine.

At the end of the experiments, the animals will be killed by cervical dislocation or CO<sub>2</sub> asfixia and used for immunohistochemistry for the analysis of the brain structure and morphology.

#### **To be used in the Objective 4**

We will complete this study by performing an analysis of interneuron migration from the birthplace until reaching the final destination in mouse models of ASD (e.g. 22q11DS, Cntnap2). The behavior of these mouse models had been performed before (and described in the literature) and they display several traits of ASD. We will now investigate whether alterations in interneuron migration and positioning in the cerebral cortex are also present in these mice and correlate with behavioral defects. We will label interneuron cohorts or interneuron subtypes with fluorophores by crossing mouse models of ASD with transgenic mouse models for the expression of GFP of Td tomato). The induction of these fluorophores might be tamoxifen-dependent (Procedure already described above). We will then use embryos, mouse pups and adult mice to perform time-lapse video recordings to investigate interneuron migration and perform immunohistochemistry to investigate the position of interneurons in the brain. This will involve kill animals at different developmental stages for further processing (organotypic brain slices for live imaging or immunohistochemistry after perfusion).

#### **Welfare assessment and other considerations:**

We will check the animals daily on several parameters (overall appearance, size, body posture and growth, fur condition, behavior, clinical signs, relative size and numbers) as has been described in the Directive 2010/63/EU: corrigendum of 24 Jan. 2013. We will further monitor the time of isolation for animals if this is the case (12 weeks maximum).

**Male and female pups will be used in the study.** Confirming that phenotypes are present both in males and in females is important to **translate our research to the human population in general.**

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

Statistical power is the **probability of a hypothesis test of finding an effect if there is an effect to be found**. A power analysis can be used to **estimate the minimum sample size required for an experiment, given a desired significance level, effect size, and statistical power**. The calculations presented in the tables above were performed according to parameters that are often used and accepted in biological studies. For example, we accept a power of 0.8 (**80% chance of concluding there is a real effect**) and an effect size of 0.5 (medium effect size) and an alpha of 0.05 (threshold to judge whether a test is statistically significant).

We will perform *in vitro* studies in order to test the initial experimental strategies in embryos, that are not considered laboratory animals themselves, to select the ones that will be testes *in vivo*. This strategy will minimize unnecessarily subjecting animals to genetic manipulations that: **1) would not work *in vivo* due to lack of experimental validation *in vitro*; 2) select the strategies that seem more promising to be tested *in vivo* and hence would reduce the total amount of adult animals in study.**

These experiments consist of:

- 1 - Perform experiments in embryos and in culture preparations *in vitro* before starting *in vivo* experiments consisting in DREADD activation and impairment of interneuron-glia communication.
- 2 – Using the same embryo or pup for DNA construct or viral particle delivery, by targeting the two hemispheres.
- 3 – Performing behavioral tests in a sequential order, from the less stressful to the most stressful, allowing to use the same cohort during the entirety of the study.

The overview of the different experiments and the calculations of the total number of animals can be found in the following tables. The tables also indicate the ages of the experimental animals.

**Table I**

Procedure	Age (Intervention)	Age (Analysis)	Animals Required	Number of Animals
<p>Electroporation of DREADDs to raise Ca<sup>2+</sup> levels or reduce cAMP levels</p> <p><b>MILD DISCOMFORT</b> (for the mothers and embryos)</p>	E13.5	E14.5 – E16.5	<p>Pregnant Females C57BL/6</p> <p>Embryos E13.5 C57BL/6</p>	<p>6 females per DREADD (Total =12)</p> <p>34 embryos per DREADD construct per age (Total = 136)</p> <p>NOTE: Control DNA constructs will be electroporated in the contralateral ganglionic eminences. This strategy will minimize the number of animals in study.</p>
<p><i>In vivo</i> expression of DREADDs to raise Ca<sup>2+</sup> levels or reduce cAMP levels (transgenic mouse lines for the expression of DREADDs in a cell-type-and time-specific manner)</p> <p><b>MILD DISCOMFORT</b> (for the mothers, embryos, pups and adult mice)</p>	E12.5 – E16.5	E13.5, E14.5, E16.5, P0, P7, P15, P60	<p>Transgenic mouse models for DREADD expression</p> <p>Pregnant Females</p> <p>Embryos E13.5</p> <p>Embryos E14.5</p> <p>Embryos E16.5</p> <p>Pups P0</p> <p>Pups P7</p> <p>Pups P15</p> <p>Adults P60</p>	<p>6 females per DREADD construct per age (CNO induction) (Total =36)</p> <p>6 females per DREADD construct/age (without CNO induction) (Total =36)</p> <p>34 embryos per age per DREADD (CNO induction) (Total = 204 embryos)</p> <p>34 embryos per age per DREADD (without CNO induction) (Total = 204 embryos)</p> <p>34 pups per age per DREADD (CNO induction) (Total =204)</p> <p>34 pups per age per DREADD (without CNO induction) (Total = 204)</p> <p>34 adults per DREADD (CNO induction) (Total = 68)</p> <p>34 adults per DREADD (without CNO induction) (Total = 68)</p>

E – Embryonic

P- Postnatal

**Table II**

Procedure	Age (Intervention)	Age (Analysis)	Animals Required	Number of Animals
<p><i>In utero</i> electroporation of the following DNA constructs:</p> <p>PTEN shRNA</p> <p>Mutated form of cyclin Y and cyclin Y-like 1</p> <p><b>MODERATE DISCOMFORT (for the mothers and embryos)</b></p>	<p>E12.5 (deep layer neurons)</p> <p>E15.5 (upper-layer neurons)</p>	<p>E14.5</p> <p>E17.5</p> <p>P7</p> <p>P15</p> <p>P60</p>	<p>Pregnant Females C57BL/6</p> <p>Embryos E13.5 and E15.5 C57BL/6</p> <p>Pups C57BL6</p> <p>Adults C57BL6</p>	<p>6 females per DNA Construct per age (Total = 36)</p> <p>34 embryos per DNA construct per age (Total = 204)</p> <p>34 pups per DNA construct per age (Total = 204)</p> <p>34 adults per DNA construct per age (Total = 204)</p> <p>NOTE: Control DNA constructs will be electroporated in the contralateral ganglionic eminences. This strategy will minimize the number of animals in study.</p>

**Table III**

Procedure	Age (Intervention)	Age (Analysis)	Animals Required	Number of Animals
<p>Tamoxifen Administration</p> <p><b>MILD DISCOMFORT (for the mothers, embryos, pups and adults)</b></p>	<p>E11.5 - E16.5</p>	<p>E13.5, E16.5, P7, P15, P60</p>	<p>Transgenic mouse lines to visualize glial cells and impair interneuron – glia interaction</p>	<p>6 females per transgenic mouse line per age (Total = 60)</p> <p>34 embryos per transgenic mouse line per age (Total = 136)</p> <p>34 pups per transgenic mouse line per age (Total = 136)</p> <p>34 adults per transgenic mouse line per age (Total = 68)</p>

**Table IV**

Procedure	Age (Intervention)	Age (Analysis)	Animals Required	Number of Animals
Postnatal electroporation  <b>MODERATE DISCOMFORT (for the pups)</b>	P0 – P2	P3, P7, P15, P60	Transgenic mouse lines to visualize glial cells and impair interneuron – glia interaction	34 pups per construct per age of analysis (Total = 204)  34 adults per construct per age (Total = 68)

**Table V**

Procedure	Age (Intervention)	Age (Analysis)	Animals Required	Number of Animals
Stereotaxic injection at early postnatal periods  <b>MODERATE DISCOMFORT (for the pups)</b>	P5-P7	P12, P15, P60	Transgenic mouse lines to visualize glial cells and or interneurons and impair interneuron – glia interaction during postnatal periods	34 pups per age per model (Total = 136)  34 adults per age per model (Total 68)

**Table VI**

Procedure	Age (Intervention)	Age (Analysis)	Animals Required	Number of Animals
Behavioral Tests: Open field test; The ladder rung walking test; Y-Maze; Novel object recognition test; Elevated plus maze; Marble burying test; Three Chamber Test; Habituation/Dehabituation to social and non-social stimuli; Barnes Maze  <b>MILD DISCOMFORT (for the adults)</b>	E11.5 – E16.5	P60 (Behavior)	Animals models for in vivo expression of DREADDs or to impair interneuron – glia interaction	34 adults per age per DREADD (with CNO activation) (Total = 136)  34 adults per age per DREADD (without CNO activation) (Total = 136)
Behavioral Tests Open field test; The ladder rung walking test; Y-Maze; Novel object recognition test; Elevated plus maze; Marble burying test; Three Chamber Test; Habituation/Dehabituation to social and non-social stimuli; Barnes Maze	P5-P7	P60	Transgenic mice undergoing stereotaxic injection of AAVs to disrupt interneuron-glia interaction during postnatal periods	34 adults per age per viral construct (Total = 136)

**MODERATE DISCOMFORT**  
(for the pups then used in the behavior)

**Table VII**

Procedure	Age (Intervention)	Age (Analysis)	Animals Required	Number of Animals
Tamoxifen administration	E11.5 – E16.5	E13.5-E16.5 P0, P7, P15, P60	Animal Models of ASD (e.g. Cntnap2 or 22q11DS)	6 pregnant females per age per model (Total =96)  34 embryos per age per ASD model (Total = 272)  34 pups per age per ASD model (Total = 204)  34 adults per age per ASD model (Total = 68)
<b>MILD DISCOMFORT</b> (for the mothers)				

### Summary of the Total Number of Animals in Study (From Table I until Table VII)

Animal	Females (mothers)	Embryos	Pups	Adults
Number	276	1156	1292	1020

**FINAL TOTAL: 3744**

### 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	Mice	1) Own breeding facility; 2) Registered breeders	E12.5 to P70 and adult mothers (see Tables I-VI for more detail)	3744	Males and Females (embryonic and postnatal) Adult Pregnant Females	Yes	C57Bl/6j

Provide justifications for these choices

Species	All my previous work was performed in the mouse. I have extensively characterized interneuron migration in the mouse brain and in this research model and there are publications suggesting that interneuron migration in the mouse had similarities with interneuron migration in humans (Broix et al., 2018; Nganou et al., 2018; Silva et al., 2018, 2019; Lepiemme et al., 2022). Studying mouse brain development can thus allow us to make inferences to human brain development. Furthermore, to generate genetic manipulations, I will use transgenic strategies that are well established in the mouse model (e.g. Cre recombinase). This will allow getting access to details of specific developmental processes upon genetic modifications that would be difficult to perform in mouse models of ASD.														
Origin	We will use already existing genetically modified mice from companies that maintain these animals in strict hygiene conditions and have performed a battery of behavioral tests to assess whether the transgenes are deleterious.														
Life stages	Since I am studying the influence of interneuron migration on the establishment of brain circuits, we will need to use embryos as well pups and adults. Interneuron migration occurs at embryonic stages but neuronal networks start being established at early postnatal stages and mature until adulthood.														
Number	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Animal</th> <th>Females (mothers)</th> <th>Embryos</th> <th>Pups</th> <th>A</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Number</td> <td>276</td> <td>1156</td> <td>1292</td> <td>1020</td> </tr> </tbody> </table>					Animal	Females (mothers)	Embryos	Pups	A	Number	276	1156	1292	1020
Animal	Females (mothers)	Embryos	Pups	A											
Number	276	1156	1292	1020											
	<b>FINAL TOTAL: 3744</b>														

Gender	Sex does not seem to affect early brain development. We will use males and females during embryonic and early postnatal periods (until weaning). We will also use males and females during adulthood since it is important to report, in biological studies, whether a biological effect is sex-dependent.
Genetic alterations	We need to use genetically modified mice to perform molecular manipulations and to visualize neuronal and glial cell populations. Based on the literature and my previous experience, the transgenes to visualize neural populations and to invalidate genes that prevent neural cell migration are not associated to alterations that induce discomfort due to non-lethal phenotypes such as motor problems, stereotypies and changes in feeding behavior. If any unexpected harmful change occurs, compromising the life quality of mouse breeders or offspring, we will monitor closely if the phenotypical aspects do not affect the primary functions (feeding, grooming). In case this happens, we will sacrifice the animals.
Strain	In general, we will use C57Bl/6J mice obtained from companies selling the transgenic mouse models

### 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.

We will perform several procedures that might generate pain. We will however use **anaesthesia** and **analgesic treatment** to minimize discomfort.

#### **Stereotaxic Injection**

We will perform stereotaxic injections for viral delivery. This procedure involves discomfort and need to be realized under anaesthesia. We will thus use, for example, a mixture of ketamine and dexmedetomidinehydrochloride or equivalent. For pups, we will use a classical protocol of isoflurane anaesthesia. The pup will be maintained under anaesthesia during all the procedure (around 15-20min per pup). We will inject an analgesic like Meloxicam subcutaneously, on the neck and we will clear the skin

over the skull with Chlorhexidine Soap Solution and apply analgesic cream generously. After sealing the skin with tissue glue, the pups will be delivered to the mother for nursing.

We will take pro-active measures to minimize/avoid postoperative pain. The surgeries will be performed by staff trained in the procedure. In the absence of the trained staff, the surgeries will be performed by PhD students or postdocs previously trained. The entirety of the procedure should not take more than 45 min.

### **In Utero Electroporation**

This involves performing surgeries in anesthetized pregnant females (under isoflurane anesthesia: 4% for induction and 2%-1.5% for maintenance during the surgery, in a chamber with a flow of 0.8 L/min of oxygen). The females will be injected with a preoperative dose of analgesic with controlled temperature. Furthermore, they will be inspected twice a day for 48h. We will perform a pain assessment and use recordings as following - based in the publication “Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse” (Langford et al., 2010). In case of observation of expressions of pain, we will administer analgesic every 12h for 48h maximum. If the expressions of pain are persistent, we will euthanize the animals to minimize suffering (see HEP).

We will take pro-active measures to minimize/avoid postoperative pain. The surgeries will be performed by staff trained in the procedure. In the absence of the trained staff, the surgeries will be performed by PhD students or postdocs previously trained. The entirety of the procedure should not take more than 45 min.

### **Postnatal electroporation**

Pups will be anesthetized with isoflurane (4.5%; oxygen: 1L/min) and head fixed on a stereotaxic stage on top of a heating pad. The pup will be maintained under anesthesia during all the procedure (around 15-20min per pup). We will inject, for example, Meloxicam analgesic, on the neck and we will clear the skin over the skull with Chlorhexidine Soap Solution and apply analgesic cream generously. We will then open a small window (1.5mm x 1.5mm, cutting only 3 sides of the window) on the skin covering the crane. We will deliver plasmid DNA into the brain by using a previously prepared sharpened glass micropipette. The skull is very soft, in particular at the coronal suture. After applying a drop of neurogel on both the positive and negative poles of the electrodes, we will apply two trains of ten 50ms long 99V pulses with a 950ms duration (3 sec interval between the two trains). We will seal the skin with a small drop of tissue glue and place the pups in a warm recovery cage before being given back to the mothers for nursing. Pup growth and feeding behavior will be monitored daily. If pups stop gaining weight, they will be sacrificed.

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

The transgenes present in the mice might slightly alter brain function and cognitive behaviors. Since they are passible of altering brain development, this might alter the cognitive behavior of pups/adults mimicking what would happen with an autistic individual. There might be alteration in the exploratory behavior and social interaction without causing significant harm to the animal, neither compromise food and water intake.

Explain why these effects may emerge.

The manipulations we are introducing in the mice alter brain development and might change the way brain is formed and the way circuits are established. Putative alterations in cognitive and behavioral processes might result from an altered developmental program.

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

We will closely monitor the animals carrying the transgenes to ensure that discomfort is limited as much as possible. When discomfort as a result of a certain genotype occurs, we will immediately rethink our experimental strategy for this specific breeding (e.g. limit our study to earlier stages only, or limit the number of animals used by choosing between experimental procedures). For example, if the AAV viruses used to eliminate OPCs cause severe damage in the brain (by inducing massive cell death and/or inflammation), we will use instead viruses to inhibit synapse formation between OPCs and interneurons.

As described above, we will use analgesia and anesthesia for all procedures possible of inducing pain. Animals undergoing surgery will be monitored for the detection of facial expressions of pain, weight gain and feeding/drinking behavior.

### **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.

In all *in vivo* experiments, an evaluation of body weight gain, feeding behavior, hydration level, general condition of the animal, behavior within the cage (e.g. nesting behavior), self-care (e.g. grooming), facial expressions of pain, nurturing behavior will be monitored daily. This assessment will be performed daily.

Precisions of these assessments:

- We will monitor the weight gain of pregnant females injected with tamoxifen or CNO via IP, food administration or water intake. The pregnant females will be weighed daily before, during and after administration of these drugs. They will be sacrificed if a loss superior to 20% is detected. This threshold also applies to pups born from females exposed to these drugs and pups undergoing in utero electroporation or stereotaxic injection during early postnatal life.
- Females exposed to the above-mentioned drugs having delivered pups, will be monitored in their nurturing behavior. For example, the researchers involved in the study will assess whether they built a nest for the pups and whether they feed and spend significant amount of time warming and interacting with the pups. Usually, a female will leave the nest to eat and drink. The majority of the time is spent feeding or interacting with the pups. If we observe that the females do not manifest a typical nurturing behavior or if we detect a drop in 20% of the body weight, we will sacrifice the female and attempt an adoption for the pups, using a control female that had delivered at an approximate time.
- We will also assess whether pups or adult animals subjected to in-vivo manipulations display a behavior of self-care (grooming) or display traits of neglect and/or self-injury (wounds, loss of hair, rough hair).
- Pregnant females of pups undergoing in-utero electroporation or stereotaxic injection of viruses will be monitored for facial expressions of pain and general posture and feeding behavior, respectively. Five muscular activities are involved in the manifestation of pain in rodents: orbital tightening, nose and cheek bridge bulging, alteration on the position of the whiskers, rotation of the ears in/out. If any of these signs is visible, animals will be administered additional pain killer post-surgery. If the facial expressions of pain persist for more than 24h under analgesia, the animals will be sacrificed. This evaluation cannot be performed in newborn pups. We will then observe the feeding behavior, weight gain and hydration level (lifting gently the skin under the back) and overall posture and aspect (color

of the body, curling and straight position). Pups found pale, immobile and with rigid body postures, isolated from the litter and not gaining weight will be sacrificed if these signs are visible for more than 24h.

Click or tap here to enter text.

Indicate the likely incidence.

Less than 10%.

#### **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).

Animals may experience discomfort during all of the procedures involving **intracerebral injection of adeno-associated viruses (AAVs)**, *in utero* and **postnatal electroporation**. All the three procedures generate **moderate discomfort**. IP injections in pregnant females and some behavioral tests might cause mild discomfort.

Females and pups undergoing *in utero* and postnatal electroporation or stereotaxic injection will undergo moderate discomfort.

**Moderate discomfort:** 33,66% (see tables).

Females undergoing tamoxifen administration will have **mild discomfort** (i.p. injection and tamoxifen exposure on embryos and pups).

**Mild discomfort:** 66,34% (see tables)

Pups and embryos will be killed for tissue extraction. Females will be killed to obtain the embryos. The molecular manipulations to target the embryo's brain development will be done via the mother. The females are thus experimental animals. Some adults born from these mothers will be kept until adulthood to undergo behavioral experiments and will be killed at the end of the study.

Some procedures will involve **cumulative discomfort** since the animals will be exposed to certain procedures more than once. These procedures are:

**Tamoxifen administration (See Table III and Table VII):** The females will be injected twice and the embryos will be exposed to tamoxifen twice. **Cumulative discomfort: 15,06%.**

**Behavioral tests (See Table VI):** The adult animals will be exposed to less stressful to more stressful behavioral tests over time. Moreover, one group of the animals will be subjected to behavior after IP injection. **Cumulative discomfort: 10,90%**

**Total of cumulative discomfort: 25.96%**

**These percentages of cumulative discomfort do not change the overall percentage of severity. The level of discomfort added by cumulative experiments is not high enough to increase the level of severity after the first experimental manipulation.**

All the animals will be killed at the end of each individual experiment in order to perform the observations allowing to test our experimental hypothesis.

## **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	Preliminary experiments will be first performed <i>in vitro</i> to identify the conditions that will then be extended to <i>in vivo</i> studies. The complexity of the mechanisms involved in brain development cannot be achieved <i>in vitro</i> . Therefore, for in-depth analysis of neuronal network development we need to use animals.
Reduction	Experiments will be executed in succession and our exploratory studies performed <i>in vitro</i> are key to guide us on our <i>in vivo</i> studies. In these <i>in vivo</i> studies, I will deliver DNA or viral constructs in the two hemispheres (Control in one hemisphere and construct inducing modification in the other) to reduce the number of animals in study. To reduce inter- and intra-assay variability we will only use well-established reagents and protocols during the <i>in vitro</i> procedures or anatomical analyses.

Refinement	<p>For experiments involving surgeries on pregnant females, to guarantee the maximum survival rate and health of the animal undergoing surgery, we will ensure sterile conditions by wearing masks, gloves and working in a sterile field. Also, the females undergoing surgery will not be left unattended until regaining consciousness.</p> <p>In experiments involving the utilization of pups, at least one pup will be left with the mother to reduce stress. Current transgenic mouse lines will be monitored on general parameters (overall appearance, size, confirmation and growth, hair coat condition, behavior, clinical signs, relative size and numbers as has been described in the Directive 2010/63/EU: corrigendum of 24 Jan. 2013).</p> <p>When discomfort related to experimental procedures is inevitable, we will ensure that this discomfort is kept to a minimum. We will monitor the extend of unexpected discomfort in</p>
------------	--

pups, regarding essential body functions like feeding behavior, and limit the number of animals needed to the most essential stages and experiments.

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

No

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

The proposed procedures are fundamental research and does not consist of legally required research.

#### **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.

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

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 and analysis of tissue necessary for experiments.

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.

A. In the case of embryos: pregnant mothers will be killed by cervical dislocation. Embryos are quickly taken from the uterus, quickly placed in ice-cold medium and then decapitated\*, or injected with an overdose of barbiturates (IP) and transcardially perfused, when necessary. Brains will be isolated and kept on ice and tissue will be harvested for tissue culture or other purposes.

B. In the case of pups: Although pups cannot be directly decapitated without anesthesia, according with the US Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) hypothermia/ cryoanesthesia in neonatal rodents appears to be an appropriate alternative to gas or injection anesthesia **but** it can only be used for pups less than 7 days old. We will thus sacrifice the pups between 9 and 11 days old with an overdose of barbiturate. This method is usually used when transcardiac perfusion will be performed. Brains will be isolated and kept cool and tissue will be harvested for tissue culture or other purposes.

C. In the case of adult mice: animals will be killed by an overdose of barbiturates\*\* (IP) followed by transcardiac perfusion, or by cervical dislocation, or by CO2/O2 suffocation and tissues will be harvested for tissue culture or other purposes.

\*For these ages, cervical dislocation is not possible because the rodents are very small. Therefore, the efficiency of this method becomes low and the possibility of suffering becomes high. Also, since the skull is still thin there is a high risk of damaging the hindbrain and cerebellum when performing cervical dislocation in such young animals. Exposure to carbon dioxide does not lead to a quick death in young rodents and a percussive stroke isn't desired because we want to analyze the brains of these rodents. Injecting volumes of anesthetics or euthanasia in such small animals gives more discomfort compared to quick decapitation.

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

Click or tap here to enter text.

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 : AVD11500202216569
2. Titel van het project : Role of interneuron migration in the development of the cerebral cortex
3. Titel van de NTS : De rol van interneuronen migratie bij de ontwikkeling van de hersenschors

## 4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning  
 wijziging van vergunning met nummer :

## 5. Contactgegevens DEC

Naam DEC : DEC Utrecht  
Telefoonnummer contactpersoon : 06-31118069  
Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl

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

- ontvangen door DEC: 11-11-2022  
 aanvraag compleet:  
 in vergadering besproken: 02-11-2022, 14-11-2022 en 14-06-2023  
 anderszins behandeld:  
 termijnonderbreking(en) van / tot :  
07-11-2022/14-11-2022, 18-11-2022/09-06-2023 en 19-06-2023/03-07-2023  
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:  
 aanpassing aanvraag:  
 advies aan CCD: 11-07-2023

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

## 8. Eventueel horen van aanvrager

- Datum: 02-11-2022 en 14-11-2022
- Plaats: Utrecht en online via Teams
- Aantal aanwezige DEC-leden: 5 en 6
- Aanwezige (namens) aanvrager: verantwoordelijk onderzoeker
- Gestelde vragen en verstrekte antwoorden: De DEC heeft de onderzoeker op 2 november gehoord over o.a. het doel van het onderzoek en het fenotype. De DEC heeft de onderzoeker op 14 november verder gehoord over o.a. de achtergrond van het project, de doelstelling, de betrokken onderzoeksgroep, de strategie en de drie stappen en de gedragsexperimenten. Hieruit zijn onderstaande vragen, zoals vermeld bij punt A9a, voortgekomen, die schriftelijk aan de onderzoekers werden voorgelegd
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag.
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

## 9a. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 07-11-2022 en 18-11-2022
- Datum antwoord: 09-06-2023
- Strekking gestelde vragen en antwoorden:
- *Projectaanvraag*

Op het Project Aanvraagformulier is onder 2 niet ingevuld uit welke geldstroom het project gefinancierd wordt.

*I now indicated the money flow on the Project Application Form.*

- *Algemeen*

Het is met name van belang dat u in deze aanvraag de informatie verstrekt die de DEC nodig heeft om een ethische afweging te kunnen maken (dit is geen subsidieaanvraag). Om te kunnen afwegen of het belang van dit project opweegt tegen het ongerief dat de dieren zullen ondergaan, dient duidelijk te zijn wat uw doelstellingen en concrete werkhypotheses zijn, welke strategie u volgt om uw onderzoeksvragen te beantwoorden (opeenvolgende stappen en criteria voor de keuzemomenten tussen die stappen) en hoe de voorgestelde dierproeven passen binnen die strategie. De dierproeven dienen zo beschreven te worden dat duidelijk is wat de dieren ondergaan (navolgbaar tot op het niveau van individuele dieren of groepen dieren) en ook zo dat de DEC kan begrijpen waarom u ze doet, zoals u ze doet (hoe ze gaan leiden tot een antwoord op uw vragen). Onderstaande vragen zijn erop gericht u te helpen bij het geven van die informatie.

*I took into consideration these concerns and restructured the project proposal and Annex 1 to: **1)** better state the scientific and societal relevance of the project; **2)** the experimental hypothesis; **3)** the distress the animals undergo; **4)** the research steps and how experiments fit in the strategy. These modifications are highlighted in the text in blue. I also made modifications in the tables of calculation of the animal numbers where I indicated the different experiments, severity and developmental stage of the animals to be used, in a traceable manner.*

- *Projectvoorstel*

3.1 Achtergrond: De aanvraag is in de (ongebruikelijke) ik-vorm geschreven, maar mogelijk is dit omdat u als enige aan dit project zult werken. De DEC vermoedt echter dat uw onderzoek is ingebed in een vakgroep in Utrecht en dat u daarnaast een bepaalde positie heeft in het internationale onderzoeksveld. Die inbedding in Utrecht en uw bijdragen aan het internationale onderzoeksveld vormen voor de DEC informatie waaruit de haalbaarheid van het onderzoek kan worden afgeleid (zie ook vraag 3.2.2). Kunt u kort enige informatie geven over de lokale inbedding van uw onderzoek, de stand van zaken in het internationale onderzoeksveld en uw bijdrage/positie in dat veld?

*I corrected the written form and I now refer to my research team. I also highlight the support of the TN Department, resources, personnel and funding to support my research. Furthermore, I allude to my past research experience and in my scientific position at the international level as an emerging leader in the field. Altogether, this information states the feasibility of my research proposal. The corresponding sections of the text are highlighted in blue.*

3.2 Doel

De relatie tussen de doelstellingen van het project en de zes experimenten die u beschrijft in de bijlage is moeilijk te doorgronden (hoe gaan de experimenten antwoord geven op uw onderzoeksvragen?). Dit is vooral het gevolg van het ontbreken van concrete werkhypothesen en uitkomstparameters in uw antwoorden bij vraag A van de bijlage waarin u de dierproeven beschrijft. Kunt u dit verduidelijken? Dit kunt u bijvoorbeeld doen door bij de subdoelstellingen en stappen in de strategie (3.4) te verwijzen naar de nummers van de experimenten in de bijlage die daarbij horen (en andersom).

*As mentioned above, the experimental hypothesis is now clearly stated in the project proposal section. The link between the different experiments, objectives and sub-objectives is now made clear. In this new version of the Appendix 1 there is a reference to the several objectives of the project.*

De vragen die bij de drie stappen (in antwoord op vraag 3.4) worden genoemd als subvragen zijn volgens de DEC heldere en haalbare subdoelen. Kunt u deze subdoelen per hoofddoel (1,2,3) opnemen in de tekst van de doelstelling?

*This is now done in the section 3.4.*

Als het onderzoek naar DiGeorge niet meer dan een voorbeeld is van het belang van de migratie van interneuronen en er geen proefdieren worden aangevraagd voor onderzoek naar deze aandoening, wilt u dan overwegen deze aandoening een minder prominente plaats te geven in de aanvraag en de NTS?

*Yes, the reference to de DiGeorge syndrome was an example and I removed it from the text.*

3.3 Belang: Kunt u aangeven met welke (inter)nationale onderzoeksgroepen u samenwerkt of van welke neurologiegroep uw onderzoek onderdeel is? De DEC vindt dit belangrijk in verband met de haalbaarheid. Daarnaast vragen de experimenten, zoals de injectie in het embryobrein, de nodige expertise en zijn de proeven niet uitvoerbaar door studenten en postdocs.

*This information is now included in the project proposal and highlighted in blue.*

### 3.4 Strategie

3.4.1 Kunt u de figuren met de stappen verder toelichten? En met name stap 3 verduidelijken? U beschrijft drie stappen (ook heeft u het over fases) en geeft aan dat de stappen sequentieel zijn, maar dit vindt de DEC verwarrend. Vermoedelijk bedoelt u dat de te nemen stappen binnen 1 'onderdeel' sequentieel zijn: inderdaad doet u eerst *ex vivo* experimenten en uiteindelijk meet u gedrag in de dieren. Wat is de volgorde van de beschreven drie figuren? Zult of kunt u de experimenten in de drie beschreven figuren wel tegelijk opstarten?

*I now added a new scheme summarizing the different Objectives (I-IV) and the experimental strategies. Under each objective there is a general explanation of what will be investigated and the methodology used. I now indicate in the scheme the GO/NO GO moments. These correspond to evaluation steps to continue the project further. The project is organized from *in vitro* manipulations to modulate interneuron migration (Objective I) that will be selected to be tested *in vivo* (Objective II). The animals where we will induce interneuron migration defects *in vivo* will be analyzed at a later developmental stage to investigate the anatomical and functional consequences resulting from an altered interneuron migration during development*

*(Objective III). This means that if the in vitro strategies do not work, we will immediately stop this research project or if the selected strategies to invalidate interneuron migration do not function in vivo, we won't proceed to the Objective III. The Objective IV is independent on the Objectives I-III but in the scheme is appears after the Objective III. This was done to give an estimation on the time where it will be performed. For example, the Objective I is the priority and the Objective IV will be performed in last. However, if the Objectives I-III fail, the Objective IV will only consist in exploring whether interneuron migration is altered in ASD models. We will only attempt to rescue interneuron migration in these models if the Objective I-III are successful.*

In de figuren staan een aantal uitleesparameters beschreven. Kunt u deze uitleesparameters opnemen bij de uitleesparameters van de verschillende experimenten in de bijlage? Het zou ook helpen als u in de bijlage dan even verwijst naar de figuren, zodat duidelijk is bij welke onderzoeksvraag en welke fase van het onderzoek het betreffende experiment hoort. De strategie van het project en de plaats van de dierexperimenten in die strategie dient zo helder mogelijk te worden gepresenteerd, zodat de DEC begrijpt waarom ze nodig zijn. Kunt u in de aanvraag één zin opnemen ten aanzien van het toekomstperspectief ter verduidelijking?

*This was now done and there is a stated link in the **Procedure Section** (Annex 1) referring to the Objectives indicated in the project proposal. I also added milestones, selection points and decision criteria. It is now clearer how the decision to continue (GO) or not (NO GO) the project is made and which considerations are made to take these decisions.*

U weet de criteria voor het uitvoeren van de verschillende gedragstesten maar heeft de go/no go momenten nog onvoldoende in de aanvraag vermeld. Kunt u die criteria vermelden? De DEC begrijpt dat u gaat kijken naar integratie van interneuronen in de cortex en de hippocampus en met elektrofysiologie veranderingen wil waarnemen, maar wat zijn daarbij uw criteria om te besluiten verder te gaan met de gedragstesten?

*As explained ahead, it is now clear in the Project Proposal Section and in the Annex I that the Objective III, corresponding to the behavioral assessment of the animals that underwent interneuron migration disruption will only be performed if the Objectives I and II work. Behavioral experiments will only be performed if we observe a significant alteration in the numbers and anatomical localization of interneurons in the brain and/or whether the electrophysiological activity recorded in interneurons or in excitatory projection neurons (receiving synapses from interneurons) is significantly altered.*

- *Bijlage 1*

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

De DEC vraagt zich af wat, behalve de structuren in de hersenen en de elektrofysiologische data, de fenotypische verschijnselen zijn die u gaat onderzoeken? Heeft u op dat punt een hypothese? Kunt u iets zeggen over het verwachte fenotype in de bijlage? De DEC mist een uitleesparameter met betrekking tot de te verwachten fenotypische verschijnselen. Kunt u dit aanvullen?

*Interneuron migration defects can cause transient or permanent alterations in brain function. This can be caused by an altered distribution or function of interneurons later in life. I*

*hypothesize that the strategies used to disrupt interneuron migration will lead to an alteration in connectivity. For example, interneurons will connect to wrong targets by establishing wrong synapses or by distributing abnormally within the tissue.*

*I added the expected phenotype in blue in the section A of the Annex 1.*

Het is de bedoeling dat u in de bijlage(n) alleen het type dierproef beschrijft: design, handelingen aan de dieren, uitleesparameters, te verwachten ongerief etc. Het is zeker van belang dat u bij elk experiment kort aangeeft waar het experiment past in de strategie en op welke vragen het experiment antwoord zou moeten geven. Maar het is niet de bedoeling dat u hier nieuwe onderzoeksvragen en experimenten toevoegt.

*The section A was restructured in order to just describe the procedure and the actions on the animals and discomfort. There is now a clear link between each procedure and the objectives described in the project proposal.*

U heeft het (vlak boven en onder Table VII) over de effect size en de standaarddeviatie. In de bespreking heeft u 20% genoemd als een effect size die u biologisch nog relevant acht. De DEC begrijpt dat u de effect size nog niet weet, maar door een berekening te maken gebaseerd op een effect size die u nog relevant acht, is het wel mogelijk om tot een groeps grootte te komen die nodig is om bij die effect size significantie te bereiken. Kunt u dit toevoegen?

*As suggested by the DEC, I now used in my calculations theoretical parameters accepted in biological studies. For example, we accept a power of 0.8 (**80% chance of concluding there is a real effect**) and an effect size of 0.5 (medium effect size) and an alpha of 0.05 (threshold to decide whether a test is statistically significant).*

Kunt u in de tabellen het ongerief specificeren per diersoort en leeftijd?

*This was now done. The tables refer to the age of the animals used in each procedure and the type of distress.*

De DEC vindt het heel moeilijk, zo niet onmogelijk, om te achterhalen hoe het aantal proefdieren opgevoerd in Table I tot en met Table VI heeft geleid tot de totale aantallen voor de verschilden categorieën in Table VII. Hier enkele voorbeelden: het totale aantal vrouwelijke dieren is:  $6+75+96+96+72+72+(6 \times 20 \text{ females in Tabal VI}) = 537$  females. Het totaal in Table VII is 561?

Het aantal Pups:  $36 + 36 + 36 + 36 + 120 + 120 + 118 + 118 + 72 + 72 + 118 + 118 = 1.000$ . In Table VII staat 920 Pups. It is also not clear if there is overlap between the total number of Females and Adults in Table VII. Kunt u dit alles duidelijker omschrijven, controleren en eventueel aanpassen?

*The tables were the total number of animals to be used in each procedure and at different developmental stages is now clearly indicated in the tables. There is now a better segregation of the animals (e.g. embryos, pups, females, adults).*

Kunt u in de aanvraag uitleggen waarom (en hoe) u gebruik maakt van de genoemde genetisch gemodificeerde muizen in plaats van 'normale' muizen en bestaande "ziektomodellen" voor autisme en schizofrenie? U gebruikt (bijvoorbeeld) Cre-ERT muizen met een weefsel-specifieke promotor, zodat u op elk gewenst moment een genetische modificatie kunt induceren in bepaalde zenuwcellen, maar niet in de rest van de cellen van

het dier. Dit is een belangrijk element in uw onderzoekstrategie. Dit is ook de reden dat u geen bestaande modellen voor autisme en schizofrenie kunt gebruiken, want in die modellen staat de modificatie altijd aan in alle cellen.

*This is now clearly stated and explained in the introduction of the project proposal. The text corresponding to the DEC comment concerning the need of using transgenic mouse models instead of models of developmental disorders is highlighted in dark grey.*

U wilt een scala aan gedragsexperimenten (met name leer- en geheugentesten) uitvoeren. Waarom heeft u t.a.v. aandoeningen zoals schizofrenie en autisme voor deze testen gekozen? De DEC vraagt zich af of in plaats van een cognitieve test een sociale interactie test niet meer voor de hand zou liggen? Heeft u overwogen PPI of interactie testen toe te voegen ten aanzien van schizofrenie? Kunt u de go/no go momenten bij de testen opnemen en toevoegen wanneer u stopt met het onderzoek? En tevens de parameters opnemen?

*The project proposal was modified to center the research on autism spectrum disorders. PPI test, classical to assess schizophrenia will no longer be performed. The DEC is right, a test assessing social recognition/interaction is more appropriate for studies on autism spectrum disorders. We will sequentially perform Open Field and Marble Burying test to assess locomotion and stereotypies, Y-maze and Object Recognition test to assess cognition, The Three Chamber's test and Habituation/Dishabituation to social odors tests to assess social behaviors and the Barnes maze and the Ladder Rung Walking test to assess somatosensory cortical function and learning and memory, respectively. These tests will be performed in all the animals by the indicated order (from the less stressful to the most stressful). This will allow reducing the number of animals in study and allowing studying distinct cognitive and behavioral features in the same animal. This description is now added to the Annex 1 and it is highlighted in magenta. There are thus GO/NO GO moments.*

De tekst bij A. Procedures "In Utero Electroporatie" is volgens de DEC wat te gedetailleerd, terwijl het antwoord op de vraag (design, outcome parameters) ontbreekt. De procedure kunt u hier in meer algemene termen beschrijven en dan vooral aangeven waarom u dit doet en wat de uitleesparameters zijn. De handelingen aan de dieren kunt u beschrijven in het tweede deel van vraag A (Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment). Ook dat hoeft echter niet zo uitgebreid als u hier doet.

*The Procedures were modified and there is a less extensive description now. Also, there is now indication of the readout parameters.*

- *Niet Technische Samenvatting*

U gebruikt termen die door de CCD worden opgevat als verhullend taalgebruik (o.a. euthanasie in plaats van gedood en ongemak in plaats van ongerief) en voor leken moeilijke woorden (o.a. histologie). Wilt u de NTS hierop (laten) toetsen en waar nodig aanpassen?

*I have now made the necessary modifications.*

U noemt de dieren mannetjes/vrouwtjes. Wilt u dit veranderen in mannelijke of vrouwelijke dieren?

*I have now changed males/females to male or female animals.*

In de laatste zin bij 'Predicted harms' staat vermeld Bij deze procedure wordt DNA afgeleverd

onder de kraan,...'. U bedoelt vermoedelijk intracraniaal, voor leken te vertalen als "onder of in de schedel". Kunt u dit aanpassen?

*It is now done.*

In de NTS ligt de nadruk op de aandoening DiGeorge, terwijl uw onderzoek daar niet specifiek op gericht is. De NTS dient representatief te zijn voor uw onderzoek.

*It is now done.*

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

#### 9b. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 19-06-2023
- Datum antwoord: 03-07-2023
- Gestelde vragen en antwoorden: De DEC heeft uw projectaanvraag op 14 juni 2023 beoordeeld en heeft nog de volgende vragen/opmerkingen.

- *Projectvoorstel*

Bij 3.3.2. (p.7) ontbreekt het proefdier als stakeholder. Wilt u dit specificeren?

*The DEC is right. I forgot to mention the animals as an important group of stakeholders. I now included a paragraph on animals as stakeholders with a respective justification. This can be found in the section 3.3.2 and is highlighted in blue turquoise.*

- *Bijlage 1*

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Is het onderzoek op embryo's (p. 7) geen onderdeel van deze aanvraag en misschien al eerder uitgevoerd? Wilt u in dat geval duidelijk vermelden in de aanvraag dat voor dit onderdeel geen proefdieren meer nodig zijn, of anders vermelden hoeveel moederdieren daarvoor nodig zijn en welk ongerief die zullen ondergaan.

*The embryos are part of this application and the experiments involving the use of embryos, as stated in the Attachment 1 have not been performed yet. For this reason, they are still included in the Table I. I had forgotten to include the level of discomfort that they will undergo. This is now added.*

U geeft op p. 7 aan het aantal proefdieren te willen verminderen door het gebruik van embryo's ("We will minimize the use of animals by: 1. - Perform experiments in embryos ..."). Volgens de DEC is dit geen "vermindering van proefdieren". U bedoelt wellicht dat *in vitro* onderzoek op primaire cultures of organoïden bijdraagt aan een vermindering van het aantal proefdieren dat nodig is in het vervolg van het project. Ook voor het verkrijgen van embryo's, die zelf nog niet als proefdier beschouwd worden, zijn in elk geval moederdieren nodig. Wilt u dit met de IvD afstemmen?

*The DEC is right. The sentence used led to a wrong interpretation. The sense I wanted to give to this sentence is that using embryos to select the most promising strategies to test later in vivo will lead to a reduction in the number of animals. This was now modified and is highlighted in the text in orange.*

De DEC ziet onnauwkeurigheden in de aantallen proefdieren. Wilt u de aantallen dieren controleren in de tabellen en de tekst en corrigeren waar nodig?

*Done.*

In Table I zijn de moederdieren + embryo's per DREAD vermeld. Geldt het moderate ongerief voor de moederdieren **én** de embryo's? Graag bij Procedure vermelden.

*Done.*

In Table IV staan 272 pups vermeld. Dat moet waarschijnlijk (2\*3\*34) 204 pups zijn. Wilt u dit nagaan en aanpassen?

*Yes. This was a mistake. It is now corrected.*

Het totaal aantal benodigde dieren (Final total: 3818, p.12) is niet gelijk aan de optelsom van de afzonderlijke aantallen dieren (276+1156+1360+1020= 3812). Wilt u dit corrigeren waar nodig?

*Done.*

In de Tabel onder B. (The animals, p.12) staat dat er 2489 muizen nodig zijn. Dit aantal is ook opgenomen in de NTS en komt niet overeen met het eerder vermelde totaal aantal dieren van 3818. Wilt u de juiste aantallen vermelden?

*It is now corrected.*

F. Classificatie van ongerief

Voor de ethische afweging is het nodig dat de DEC inzicht heeft in de mate van cumulatief ongerief. Dit dient voor alle (groepen) dieren navolgbaar te worden beschreven. Onder F. (p.16) wordt de mate van ongerief van de afzonderlijke procedures vermeld, maar het wordt niet duidelijk aan welke procedures de verschillende groepen dieren (cumulatief) worden onderworpen en wat het cumulatief ongerief daarvan zal zijn. Wilt u per experimentele groep muis (embryo's, pups, volwassenen, moedermuizen) het cumulatieve ongerief vermelden? Als u de aantallen hierbij vermeldt wordt het ook duidelijk hoe de percentages tot stand gekomen zijn (zie ook hierna).

*Yes, the DEC is right. I had forgotten to include the cumulative distress. This is now indicated as well as the groups of experiments where embryos, pups, mothers or adults will be exposed to cumulative distress.*

U geeft nu nog aan dat 18% van de dieren moderate ongerief ervaart. Gezien het grote aantal dieren met intracerebrale injectie en elektroporatie lijkt dit percentage veel te laag. Wilt u dit controleren?

*Yes. It is now checked and corrected.*

U vermeldt bij terminaal ongerief 100%. De dieren worden gedood t.b.v. het onderzoek maar dat wordt niet bedoeld met 'terminaal ongerief'. Wilt u dit aanpassen en met de IvD afstemmen?

*This is now adjusted and corrected.*

K. Bestemming van de dieren bij einde experiment: Het direct decapiteren van dieren zonder voorafgaande anesthesie (A. en B.) is geen methode die vermeld is in Annex IV of Directive 2010/63/EU en de keuze daarvoor moet met argumenten worden onderbouwd. Wilt u dit afstemmen met de IvD? N.B. De CCD heeft eerder in een vergelijkbaar geval het volgende opgemerkt: *De CCD wilt u verwijzen naar de publicatie van het [Amerikaanse Institutional Animal Care and Use Committee \(IACUC\), hypothermia/cryoanesthesia in neonatal rodents](#). Volgens de IACUC blijkt cryoanesthesie een passend alternatief te zijn voor gas of injectieanesthesie voor pups jonger dan 7 dagen. De aanvrager wilt de pups doden op P9 en P11. Voor dieren ouder dan 7 dagen is cryoanesthesie echter niet geschikt.*

*This is now included and corrected. The text is highlighted in purple.*

- *Niet Technische Samenvatting*

De NTS moet in taalkundig opzicht aanzienlijk worden verbeterd. De zinsvorming is op een aantal plaatsen niet correct. U schrijft de tekst in de niet-gewenste ik-vorm. De DEC suggereert u een "native dutch speaker" in te schakelen om de tekst aan te passen? De DEC suggereert eveneens om bij de kwalificatie van ongerief zo veel mogelijk aan te sluiten bij de aanvraag en bij de daarin gebruikte standaard terminologie.

*As suggested by IvD, the NTS was revised by a communication manager and by a Dutch speaking colleague. I believe that this new version of the NTS is now a true layman's summary of the proposal.*

- 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. De onderzoeker heeft eerder onderzoek gedaan naar de migratie van interneuronen in de hersenen van muizen en met dit vervolgpriject gaat men gedetailleerd kijken naar de migratie van interneuronen, vroeg en later in de ontwikkeling (aangezien dit verschillende processen zijn) en naar de integratie van interneuronen in de cerebrale cortex. De migratie van interneuronen wordt beïnvloed door contacten met oligodendrocyt precursor cellen (OPC), die op verschillende plaatsen en tijdstippen ontwikkelen en op verschillende tijdstippen gaan migreren. De interneuronen hebben zelf motoreiwitten waarmee ze kunnen contraheren om te migreren. Beide vormen targets waarmee de migratie experimenteel zal worden beïnvloed. Pauzes in de migratie en de contacten met de oligodendrocyt precursor cellen, die langs bloedvaten migreren, bepalen of er meer of minder neuronen in de cortex aankomen. Nadat interneuronen in de cortex zijn aangekomen maken ze (synaptische) contacten met de daar aanwezige projectieuronen en ook nog met de oligodendrocyt precursor cellen. Dit complexe proces, dat gestuurd lijkt te worden door (vroeg en late) migratiegolven van de interneuronen zelf, maar ook door contacten tussen de migrerende interneuronen en andere typen cellen, leidt tot corticale expansie.

De migratie wordt op moleculair niveau gemoduleerd. De beweging van interneuronen wordt (tijdelijk) geblokkeerd, zodat ze niet of later in het doelgebied in de cortex aankomen. Daarnaast wordt de interactie tussen de interneuronen en oligodendrocyt precursor cellen verhinderd door de expressie van membraaneiwwitten te onderdrukken of door de ontwikkeling van de oligodendrocyt precursor cellen te onderdrukken. Uit deze experimenten met (genetisch

gemodificeerde) muizen in verschillende levensstadia (embryo, pup en volwassen) moet duidelijk worden welke processen op welke tijdstippen van kritisch belang zijn voor de ontwikkeling van specifieke gebieden in de cortex.

Er zijn goede redenen om aan te nemen dat verstoorde migratie van interneuronen en/of verstoorde innervatie van de cerebrale cortex door interneuronen leiden tot gedragsveranderingen die lijken op autisme (ASS). Naast de moleculaire benadering wordt daarom een heel scala aan gedragstesten voorgesteld om vast te stellen welke gedragsveranderingen door moleculaire manipulaties en de daardoor veroorzaakte veranderingen in architectuur en functie van de cerebrale cortex worden veroorzaakt. Tenslotte zullen de veranderingen in een bestaand muismodel van 'autisme' worden gekarakteriseerd en zal met behulp van de ontwikkelde moleculaire 'tools' geprobeerd worden om het ontstaan van 'autisme' in dit model tegen te gaan.

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 onderzoek naar migratie van interneuronen tijdens de vroege ontwikkeling van de hersenen, naar de daarbij betrokken cellulaire processen en de beïnvloeding daarvan, en naar de uiteindelijke effecten op de morfologie en functionaliteit van de neuronale cortex en gedrag. De onderzoeker wil het fenotype autisme onderzoeken. Het uiteindelijke doel van het project is om te testen of ingrijpen in dezelfde moleculaire processen uiteindelijk ook 'autisme' in een ASD muismodel kan tegengaan. De DEC is van mening dat er een duidelijke relatie is tussen het directe en het uiteindelijke doel, en dat het doel gerechtvaardigd is in de context van het neurowetenschappelijk onderzoeksveld en de behoeften vanuit de gezondheidszorg om meer begrip te krijgen over hersenaandoeningen en meer specifiek over mogelijk causale oorzaken van autistisch spectrum stoornissen (ASS).
5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: proefdieren, onderzoekers, gezondheidszorg en uiteindelijk patiënten met hersenaandoeningen. De muizen hebben er belang bij om niet als proefdier ingezet te worden voor de experimenten en vroegtijdig te worden gedood ten behoeve van het onderzoek. De onderzoekers hebben juist een groot belang bij (positieve) resultaten van dit vervolgonderzoek. Zij zetten zich al jarenlang in voor fundamenteel onderzoek naar hersenontwikkeling en publiceren hierover zodat kennis wordt gedeeld binnen het wetenschappelijke onderzoeksveld. Met de opgedane kennis ontstaat meer begrip over causale oorzaken van ASS en dit kan mogelijk leiden tot het ontwikkelen van

therapieën waar de gezondheidszorg en de grote groep patiënten met deze ernstige aandoeningen groot belang bij kunnen hebben.

6. De aanvrager geeft niet aan nadelige effecten op het milieu te verwachten. De DEC ziet geen aanleiding om aan te nemen dat zich toch nadelige effecten zullen voordoen.

#### *Proefopzet en haalbaarheid*

7. De kennis en kunde van de onderzoeker en de uitgebreide ervaring van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd. De onderzoeker heeft jarenlange ervaring met de muismodellen en eerder aan uitstekende publicaties meegewerkt. Dit draagt 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 milestones en de go/no go's zijn duidelijk. De DEC is het eens met de opzet waarbij objective 4 (ASD muismodel) pas uitgevoerd wordt na het behalen van positieve resultaten in objective 3. In een ASD model van de muis zal de onderzoeker eerst nagaan wat er verstoord is aan de interneuronmigratie en -lokalisatie om vervolgens, met de diverse operationele tools om deze processen te beïnvloeden, na te gaan of er een rescue kan plaatsvinden van het fenotype (uiteindelijke doel). De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

#### *Welzijn dieren*

9. Er is 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)

Het direct decapiteren van dieren (embryo's en pups) zonder voorafgaande anesthesie is geen methode die vermeld is in Annex IV of Directive 2010/63/EU. De keuze hiervoor is echter voldoende onderbouwd en de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de dierproeven, voor de desbetreffende categorie, genoemde beperkende voorwaarden.

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 cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is met 'matig' realistisch ingeschat en geclassificeerd. Alhoewel de onderzoeker bij het cumulatieve ongerief percentages van dieren die meer dan één handeling ondergaan weergeeft en niet aangeeft wat de cumulatieve gradatie van het ongerief wordt, zijn zowel de DEC als de IvD van mening dat het cumulatieve ongerief de grens van matig ongerief niet overschrijdt. In totaal worden 3744 (deels genetisch gemodificeerde) muizen gebruikt waarvan twee derde licht en één derde van de dieren matig ongerief zullen ervaren. Het ongerief is met name in verband met de elektroporatie, intracerebrale injecties en meerdere gedragstesten, waaronder leer-, geheugen- en sociale interactie testen. Door middel van anesthesie en pijnstilling wordt pijn voorkomen of verminderd. Voor dit onderzoek zijn zowel moedermuizen, embryo's, pups en volwassen muizen nodig omdat interneuronmigratie plaats vindt in embryonale stadia, maar de ontwikkeling van neuronale netwerken in de vroege postnatale stadia en (vroege) volwassenheid start. Van het totale aantal muizen zijn er 276 moedermuizen, 1156 embryo's (vanaf E13), 1292 pups en 1020 volwassen muizen. Een embryo wordt een proefdier vanaf het 3<sup>e</sup> trimester van de dracht (vanaf E13 bij de muis). In de aanvraag worden alleen embryo's gebruikt die op een gegeven moment deze termijn overschrijden waardoor alle hier opgevoerde embryo's als proefdier worden aangemerkt.
12. De integriteit van de dieren (de moedermuizen, de embryo's, de pups en de volwassen dieren) wordt zowel fysiek, mentaal als gedragsmatig aangetast door met name de transgenen waardoor de hersenfunctie en het cognitieve gedrag van de muis wijzigt (vergelijkbaar met autisme bij mensen), de benodigde operatie (onder anesthesie ) voor de *in utero* en postnatale elektroporatie, de toediening van verschillende middelen, de gedragstesten en de vroegtijdige dood. De DEC ziet de noodzaak van het gebruik van genetisch gemodificeerde muizen in plaats van wild-type muizen. Zo wordt gebruik gemaakt van (bijvoorbeeld) Cre-ERT muizen met een weefsel-specifieke promotor, waardoor men op elk gewenst moment een genetische modificatie kan induceren in bepaalde zenuwcellen, maar niet in de rest van de cellen van het dier. In bestaande modellen voor autisme zijn alle lichaamscellen gemuteerd en dat maakt dat deze modellen niet geschikt zijn voor dit type onderzoek.
13. De humane eindpunten zijn in de bijlage dierproeven vermeld en het aantal dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt (minder dan 10%) is goed ingeschat. Door middel van zorgvuldige monitoring van o.a. ontwikkeling, pijn en gewicht van de dieren wordt nagegaan of de HEP bereikt wordt. De onderzoeker verwacht op basis van literatuur en eerdere ervaring geen HEP als gevolg van de transgenen, al wordt dit eveneens gemonitord.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn voor het koppelen van de celmigratie aan de vorming van hersencircuits waardoor dierproeven noodzakelijk blijven.
15. Het aantal te gebruiken dieren is met 3744 muizen groot maar realistisch ingeschat en 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 kunnen worden uitgevoerd. Zo blijft tijdens experimenten minimaal één pup bij de moedermuizen tijdens de experimenten om stress te verminderen.
17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

*Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef*

18. Voor de embryo's zijn moedermuizen nodig. Verder zullen dieren van beide geslachten in gelijke mate worden ingezet.
19. De dieren worden in het kader van het project gedood voor elektrofysiologisch en histologisch onderzoek van de hersenen en in verband met de toegepaste genetische modificatie. De dieren worden op een passende wijze, in overeenstemming met bijlage IV van de EU richtlijn, gedood (zie C9 ter aanvulling).
20. De vraag over hergebruik is niet van toepassing omdat de dieren gedood worden in het kader van het experiment.

*NTS*

21. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd. De DEC merkt wel op dat het ongerief in de NTS niet geheel correct wordt weergegeven (onterechte dubbeltelling van terminaal ongerief voor de (alle) dieren die aan het eind van het experiment worden gedood).

#### **D. Ethische afweging**

1. De morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is of het belang van dit onderzoek, namelijk het begrijpen van de migratie van interneuronen naar de cerebrale cortex en de hippocampus in muizen en van de functionele gevolgen hiervan, de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de gebruikte proefdieren kan rechtvaardigen.

2. Er vindt een aanzienlijke aantasting van welzijn en integriteit van (genetisch gemodificeerde) proefdieren in verschillende levensstadia plaats. Het gaat om 3744 muizen waarvan twee derde licht en één derde matig ongerief ervaart.

Indien de hierboven genoemde doelstellingen behaald worden, dan zal dit project er toe bijdragen dat bekend is of afwijkende interneuronmigratie 'autisme' in een ASD muismodel veroorzaakt en of de hiermee geassocieerde gedragsveranderingen door middel van manipulatie van migratie kunnen worden tegengegaan. Hierdoor wordt meer kennis verkregen over mogelijke aangrijpingspunten voor het voorkomen of behandelen van humane hersenaandoeningen (ASS). Het is aannemelijk dat de fundamentele doelstelling behaald zal worden. Daarvoor is de inzet van een groot aantal proefdieren noodzakelijk, maar de onderzoekers doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken. 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.

3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat meer begrip over de rol van interneuronmigratie bij de ontwikkeling van de cerebrale cortex een essentieel belang vertegenwoordigt en dat dit belang opweegt tegen de aanzienlijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. De relatie tussen het directe en het uiteindelijk doel is 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**

1. 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:...

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. 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

UMC Utrecht

[Redacted]

Postbus 12007

3508 GA UTRECHT



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD11500202216569

**Bijlagen**

2

Datum 11 november 2022

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [Redacted]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 10 november 2022. Het gaat om uw project "Understanding the role of interneuron migration in the formation of cortical and hippocampal networks". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD11500202216569. 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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl), stuur een e-mail naar [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) of neem telefonisch contact met ons op: 0800 789 0789.

**Datum:**

11 november 2022

**Aanvraagnummer:**

AVD11500202216569

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: 11500  
Naam instelling of organisatie: UMC Utrecht  
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]  
Postbus: 12007  
Postcode en plaats: 3508 GA UTRECHT

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]  
Functie: Assistant Professor  
Afdeling: Brain division - Translational Neuroscience  
Telefoonnummer: [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 mei 2023  
Geplande einddatum: 30 april 2028  
Titel project: Understanding the role of interneuron migration in the formation of cortical and hippocampal networks  
Titel niet-technische samenvatting: Moleculaire mechanismen van hersenontwikkeling  
Naam DEC: DEC-Utrecht  
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht  
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

### Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.467,-  
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:

10 november 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  
AVD11500202216569  
**Bijlagen**  
2

Datum 11 november 2022  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**  
Factuurdatum: 11 november 2022  
Vervaldatum: 11 december 2022  
Factuurnummer: 2216569  
Ordernummer: CB.841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD11500202216569	€ 1.467,00

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](mailto:info@zbo-ccd.nl)  
**To:** [Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht](#)  
**Cc:** [REDACTED] [dec-utrecht@umcutrecht.nl](mailto:dec-utrecht@umcutrecht.nl)  
**Subject:** Aanhouden AVD11500202216569  
**Date:** vrijdag 4 augustus 2023 13:15:33

---

**CAUTION:** This email originated from outside of Utrecht University. Do not click links or open attachments unless you recognize the sender and know the content is safe.

Geachte [REDACTED]

Op 10-11-2022 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Understanding the role of interneuron migration in the formation of cortical and hippocampal networks" met aanvraagnummer AVD11500202216569. 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**

- Het woord "interneuronenmigratie" in de titel zal voor een algemeen publiek niet duidelijk zijn. Kunt u een eenvoudigere titel meegeven aan het document?
- U gebruikt in de tekst de termen "ex vivo/in vivo". Kunt u deze toelichten?
- Onder "expected impacts/adverse effects" benoemt u niet de gedragstesten. Kunt u vermelden wat het effect hiervan is op de dieren? Ook wordt het in deze tekst niet duidelijk waarom sommige dieren.
- In de tabel "expected harms" is vermoedelijk het ongerief niet goed ingevuld. Kan het kloppen dat er geen dieren zijn met cumulatief terminaal ongerief maar dat de 3744 dieren het totaal aantal dieren betreft?

### **Onduidelijkheden**

- Kunt u in de bijlage onder A een korte beschrijving geven van elke gedragstest voor objective 3? Kunt u deze testen ook aanvullen in tabel VI bij A?
- U geeft onder B van de bijlage aan 3744 dieren te gebruiken. De aantallen onder tabel I t/m VII lijken echter niet op te tellen tot dit aantal. Kunt u de berekeningen nagaan en waar nodig corrigeren?
- De door u benoemde humane eindpunten, beschreven onder E, zijn onvoldoende concreet of meetbaar. Kunt u duidelijk aangeven op welke criteria u toets om te voorkomen dat het ongerief niet meer wordt dan matig?
- Onder F is het cumulatief ongerief niet duidelijk. Zo heeft u het over percentages cumulatief ongerief zonder de classificatie van dit ongerief te benoemen. Kunt u duidelijk maken of dit cumulatieve ongerief iets verandert aan de daarboven genoemde percentages van 66,3% licht ongerief en 33,7% matig ongerief?

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.

**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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

.....  
T: 0800 789 0789  
E: [info@zbo-ccd.nl](mailto: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

**Date: 16<sup>th</sup> of August 2023**

**Subject: Response to the CCD: correspondence from the 4<sup>th</sup> of August 2023**

(Aanvraag UMC, AVD11500202216569, Understanding the role of interneuron migration in the formation of cortical and hippocampal networks)

UMC Brain Center

Assistant Professor

Department of  
Translational Neuroscience

Dear members of the CCD,

Please find below the answer to all the questions/comments raised after your evaluation of my project proposal and Annex 1. For a matter of simplicity, I will transcribe each question/comment that I translated in English. You will find my answers below each question.

**COMMENT 1:**

Non-technical summary

- The word "interneuron migration" in the title will not be clear to a general audience. Can you provide a simpler title for the document?

**Answer:** Yes. I changed the title to "Studying how neurons communicate to form functional networks". The title in Dutch will be: "Bestuderen hoe neuronen communiceren om functionele netwerken te vormen". The NTS title was changed accordingly.

**COMMENT 2:**

You use the terms "ex vivo/in vivo" in the text. Can you explain these?

**Answer:** The term *ex vivo* refers to manipulations performed in tissue explants or brain slices prepared after the sacrifice of the embryos/pups. The term *in vivo* refers to manipulations performed in a living animal, such as *in utero* electroporation, stereotaxic injection. Usually, *ex vivo* experiments are used to perform short-term evaluations and *in vivo* experiments are used to assess the long-term consequences of a given experimental manipulation. I provided an explanation for these terms and this modification is now highlighted in the text with the pink color (NTS section).

Visiting address:

Universiteitsweg 100  
3584 CG Utrecht  
The Netherlands

Postal address:

P.O. Box 85060  
3508 AB Utrecht  
The Netherlands

[www.translationalneuroscience.nl](http://www.translationalneuroscience.nl)

**COMMENT 3:**

You do not mention the behavioral tests under "expected impacts/adverse effects". Can you state what the effect of this is on the animals? It is also not clear in this text why some animals.

**Answer:** I now mention the behavioral that the behavioral tests might also be a source of impact/adverse effect. I also explain that the tests to be performed do not induce high levels of adverse effects (e.g. pain) but they might induce low levels of anxiety/stress since the animals will be introduced in test apparatuses that are different from the housing cage and will be often handled by the experimenter. However, the levels of stress and anxiety during the behavioral tasks will be mitigated by previously training the animals to the behavioral room and to the test apparatuses and to the experimenter. The added text can be found in sky blue color (in the NTS section).

**COMMENT 4:**

In the table "expected harms" the discomfort has probably not been entered correctly. Can it be true that there are no animals with cumulative terminal distress, but that the 3744 animals are the total number of animals?

**Answer:** Yes. I made a mistake. 3744 refers to the total number of animals. The table is now corrected.

**COMMENT 5:**

Uncertainties

- Can you give a short description of each behavioral test for objective 3 in the appendix under A? Can you also supplement these tests in table VI at A?

**Answer:** Done. The text added in A as well as the inclusion of the tests to be performed in Table VI are highlighted in orange.

**COMMENT 6:**

You indicate under B of the appendix that you use 3744 animals. However, the numbers in tables I to VII do not seem to add up to this number. Can you check the calculations and correct them where necessary?

**Answer:** I recalculated the total number of animals and I confirm the total number of 3744, as indicated. I do not understand how you do not find this number.

**COMMENT 7:**

The humane endpoints you mentioned, described under E, are insufficiently concrete or measurable. Can you clearly indicate what criteria you are testing against to prevent the discomfort becoming no more than moderate?

**Answer:** Yes. I now provided more concrete and measurable details in the section E. The modified text is highlighted in sky blue.

**COMMENT 8:** I now elaborated of the measurable details concerning the humane endpoints. These modifications are now highlighted in sky blue under the section E.

Under F, the cumulative distress is not clear. For example, you talk about percentages of cumulative distress without specifying the classification of this distress. Can you clarify whether this cumulative distress changes the above percentages of 66.3% mild distress and 33.7% moderate distress?

**Answer:** No. The cumulative distress does not change the percentages of 66.3% and 33.7%. The explanation and a clear statement can now be found under section F, highlighted in purple.

I hope I satisfactory answered to all the questions raised by the CCD.  
Looking forward to hearing from you on your decision.

Kind regards,

A solid black rectangular box used to redact the sender's name and signature.



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007

3508 GA UTRECHT



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD11500202216569

**Bijlagen**

3

Datum 30 augustus 2023

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 10 november 2022 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Understanding the role of interneuron migration in the formation of cortical and hippocampal networks" met aanvraagnummer AVD11500202216569. 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 30 augustus 2023 tot en met 30 april 2028.

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 juli 2023. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

### *Nadere vragen aanvrager*

Op 4 augustus 2023 en 28 augustus 2023 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op de beschrijving van de gedragstesten, de aantallen proefdieren, de humane eindpunten, het ongerief en enkele teksten in de niet-technische samenvatting. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

**Datum:**

30 augustus 2023

**Aanvraagnummer:**

AVD11500202216569

### **Overwegingen**

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

### **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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl), stuur een e-mail naar [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) of neem telefonisch contact met ons op: 0800 789 0789.

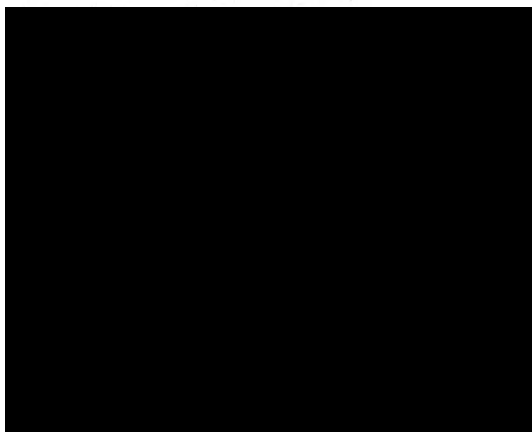
**Datum:**

30 augustus 2023

**Aanvraagnummer:**

AVD11500202216569

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: UMC Utrecht  
Adres: Postbus 12007  
Postcode en plaats: 3508 GA UTRECHT  
Deelnemersnummer: 11500

deze projectvergunning voor het tijdvak 30 augustus 2023 tot en met 30 april 2028, voor het project "Understanding the role of interneuron migration in the formation of cortical and hippocampal networks" met aanvraagnummer AVD11500202216569, na advies van dierexperimentencommissie DEC-Utrecht. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Assistant Professor. Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 10 november 2022
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 11 juli 2023;
  - b Bijlagen dierproeven
    - 3.4.3.1. Understanding the role of interneuron migration in the development of the cerebral cortex, zoals ontvangen op 17 augustus 2023;
  - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 28 augustus 2023;
  - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 11 juli 2023
  - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 17 augustus 2023, 28 augustus 2023.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
<b>3.4.3.1. Understanding the role of interneuron migration in the development of the cerebral cortex</b>			
	Muizen (Mus musculus)	3.744	33,7% Matig 66,3% 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.

- 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:**

AVD11500202216569

## 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:**  
AVD11500202216569

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.