

	Inventaris Wob-verzoek W16-01								
		wordt verstrekt			weigeringsgronden				
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2015301								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Niet-technische samenvatting	x							
3	Projectvoorstel				x		x	x	
4	Bijlagen beschrijving dierproeven 1,2,3				x		x	x	
5	DEC-advies				x		x	x	
6	Factuurinformatie				x		x	x	
7	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
8	Advies CCD		x						x
9	Beschikking en vergunning				x		x	x	



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.zbo-ccd.nl of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	☒ Ja > Vul uw deelnemernummer in 10300 / 301 ☐ Nee > U kunt geen aanvraag doen															
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="0"> <tr> <td>Naam instelling of organisatie</td> <td>Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen</td> </tr> <tr> <td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td> <td>[Redacted]</td> </tr> <tr> <td>KvK-nummer</td> <td>4 1 0 5 5 6 2 9</td> </tr> </table>	Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]	KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9									
Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]																
KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9																
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table border="0"> <tr> <td>Straat en huisnummer</td> <td>Geert Groteplein 10</td> </tr> <tr> <td>Postbus</td> <td>9101, t.a.v. [Redacted]</td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td>6500HB Nijmegen</td> </tr> <tr> <td>IBAN</td> <td>NL90ABNA0231209983</td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td>UMC St Radboud</td> </tr> </table>	Straat en huisnummer	Geert Groteplein 10	Postbus	9101, t.a.v. [Redacted]	Postcode en plaats	6500HB Nijmegen	IBAN	NL90ABNA0231209983	Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud					
Straat en huisnummer	Geert Groteplein 10																
Postbus	9101, t.a.v. [Redacted]																
Postcode en plaats	6500HB Nijmegen																
IBAN	NL90ABNA0231209983																
Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="0"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[Redacted]</td> <td>☒ Dhr. ☐ Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td>Professor</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td>[Redacted]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td>[Redacted]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td>[Redacted]</td> <td></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	☒ Dhr. ☐ Mw.	Functie	Professor		Afdeling	[Redacted]		Telefoonnummer	[Redacted]		E-mailadres	[Redacted]	
(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	☒ Dhr. ☐ Mw.															
Functie	Professor																
Afdeling	[Redacted]																
Telefoonnummer	[Redacted]																
E-mailadres	[Redacted]																
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="0"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[Redacted]</td> <td>☐ Dhr. ☒ Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td>Postdoc</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td>[Redacted]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td>[Redacted]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td>[Redacted]</td> <td></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	☐ Dhr. ☒ Mw.	Functie	Postdoc		Afdeling	[Redacted]		Telefoonnummer	[Redacted]		E-mailadres	[Redacted]	
(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	☐ Dhr. ☒ Mw.															
Functie	Postdoc																
Afdeling	[Redacted]																
Telefoonnummer	[Redacted]																
E-mailadres	[Redacted]																

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- (Titel) Naam en voorletters ☐ Dhr. ☐ Mw.
- Functie
- Afdeling
- Telefoonnummer
- E-mailadres
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- ☒ Ja > Stuur dan het ingevulde formulier *Melding Machtiging* mee met deze aanvraag
- ☐ Nee

2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?
- ☒ Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3
- ☐ Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2
- ☐ Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3
- 2.2 Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?
- ☐ Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier
- ☐ Nee > Ga verder met vraag 3
- 2.3 Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?
- ☐ Nee > Ga verder met vraag 3
- ☐ Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 0 1 _ 1 2 _ 2 0 1 5
- Einddatum 3 1 _ 1 1 _ 2 0 2 0
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Towards treatment for pheochromocytoma
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Op naar een behandeling voor bijniertkanker
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC RU DEC
- Postadres Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen
- E-mailadres

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- ☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,00 Lege
- ☐ Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- ☐ Via een eenmalige incasso
- ☒ Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- ☐ Projectvoorstel
- ☒ Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- ☐ Melding Machtiging
- ☒ DEC-advies, factuurinformatie

6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:

- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
- dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam 

Functie 

Plaats Nijmegen

Datum 02 - 11 - 2015

Handtekening 

05 7 2 7

Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal of 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 our website(www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
1.3	Provide the title of the project.	Towards understanding and treatment for pheochromocytoma

2 Categories

2.1	Please tick each of the following boxes that applies to your project.	☒ Basic Research ☐ Translational or applied research ☐ Regulatory use or routine production ☐ Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare dier ☐ Research aimed at preserving the species subjected to procedures ☐ Higher education or training
-----	---	--

☐ Forensic enquiries

☐ 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.

- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
- For routine production, describe what will be produced and for which uses.
- For higher education or training, explain why this project is part of the educational program and describe the learning targets.

Patients with pheochromocytoma have tumours that originated from chromaffin cells in the adrenal gland. Chromaffin cells are a neuro-endocrine cell type and produce adrenaline or noradrenaline, also called epinephrine and norepinephrine, respectively. Every year, between 100 and 150 new pheochromocytoma cases are reported in The Netherlands. About 60 percent of these cases can be explained by a mutation in one of 12 identified genes, which can cause pheochromocytoma formation when mutated. The vast majority of the mutations are hereditary, meaning that the patient has a heterozygous mutation in one of these 12 genes and the wild type allele is hit by a somatic mutation later in life. This group of genes can be divided into two clusters. Cluster 1 includes genes involved in hypoxia response, while the more heterogeneous Cluster 2 encompasses genes causing increased kinase signaling when mutated.

Currently, there is no effective treatment for patients with pheochromocytoma other than removal of a tumour when operable. Insight in the mechanisms causing pheochromocytoma is urgently needed to develop therapeutics to cure this disease. Gaining this insight is difficult to achieve, because there are no proper cell and animal models for pheochromocytoma. Zebrafish have proven to be an excellent model for studying cancer. Zebrafish develop cancer spontaneously, after mutagen exposure and through transgenesis. The tumours resemble human cancers at the histological, gene expression and genomic levels. The ability to carry out in vivo imaging, chemical and genetic screens, and high-throughput transgenesis offers a unique opportunity to functionally characterize the cancer genome. Zebrafish transgenic tumor models represent an alternative

vehicle for drug development. Progress achieved to date in genetic engineering will establish the zebrafish as one of the most versatile animal models for cancer research [10, 11].

We want to establish animal models that enable us to investigate the underlying molecular pathways causing pheochromocytoma, to study the progression of the disease, and to develop therapeutics against this disease. We plan to generate zebrafish mutant strains for [REDACTED].

[REDACTED]. In the remainder of this application we will refer to this group of genes as pheochromocytoma-related genes.

Considering the time span of our project and the workload of the described experiments, we plan to generate zebrafish mutant strains for maximally 4 genes. We will base the selection of the genes on the occurrence of the mutated form in patients, the degree of conservation in zebrafish, and the number of patients with a malignant form of pheochromocytoma. In addition to using the zebrafish mutant strains to study the molecular pathways underlying this disease, we also want to use our generated mutant strains to test potential therapeutics. This will be done with larvae of 5 days post fertilization (dpf) or younger. Since no CCD approval is needed for these developmental stages, we do not discuss the testing of therapeutics here in detail. We will generate three different mutations per pheochromocytoma-related gene, all with the newest CRISPR/Cas9 approaches. To study the **fundamental** disease-causing molecular pathways we will generate two whole-animal mutations, one knock out mutation and one patient-mimicking mutation. **These mutant strains will give us valuable insights in the basic processes that are involved in the establishment of pheochromocytoma. The straightforward procedure we use for the generation of these mutant strains has been used by multiple research groups and we therefore do not foresee any difficulties during that procedure.** We elaborate on the generation of these mutant strains and the experiments we will perform on them in animal procedure 1. To date for only one pheochromocytoma-related gene, Von Hippel Lindau (VHL), zebrafish whole-animal mutants have been described [14]. These mutants display several aspects of the VHL disease, but die at 8 to 11 days old. We hypothesize that for the investigation of tumour development it is necessary to obtain zebrafish with a homozygous mutation in the chromaffin cells only, like in the patient. We therefore also plan to generate chromaffin cell-specific mutations for the selected pheochromocytoma-related genes. **For this purpose, we need to search for a promoter that expresses specifically in the chromaffin cells and we will use a procedure that was recently published and is not (yet) widely used. These two aspects result in a higher risk profile for the generation of the chromaffin cell-specific mutant strains.** The generation of these mutants and the experiments to examine these strains are described in animal procedure 2.

Finally, we want to set up a cell model for pheochromocytoma. We will do this by mutating [REDACTED] in a mouse adrenal cell line, [REDACTED], and by culturing patient-derived fibroblast with two mutated alleles of SDHB. If we are able to successfully develop one or both of these two cell models, we would like to transplant these cells lines with graft in mice to enable measurement of tumour growth and metastasis within a mammalian animal model (animal procedure 3). We will use a published procedure for these experiments [15]. Currently, there is no graft mice model for this type of cancer.

This research project is funded by the [REDACTED]. Prior to granting this research project, the project proposal was positively assessed by an external board of prominent scientists in the cancer field.

- [REDACTED]
- [REDACTED]
3. Schmidt, M., et al., *Clinical value of somatostatin receptor imaging in patients with suspected head and neck paragangliomas*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2002. 29(12): p. 1571-80.
4. Amar, L., et al., *Genetic testing in pheochromocytoma or functional paraganglioma*. J Clin Oncol, 2005. 23(34): p. 8812-8.
5. Gimenez-Roqueplo, A.P., *New advances in the genetics of pheochromocytoma and paraganglioma syndromes*. Ann N Y Acad Sci, 2006. 1073: p. 112-21.
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
10. White, R., K. Rose, and L. Zon, *Zebrafish cancer: the state of the art and the path forward*. Nat Rev Cancer, 2013. 13(9): p. 624-36.
11. Barriuso, J., R. Nagaraju, and A. Hurlstone, *Zebrafish: a new companion for translational research in oncology*. Clin Cancer Res, 2015. 21(5): p. 969-75.
- [REDACTED]
14. van Rooijen, E., et al., *Zebrafish mutants in the von Hippel-Lindau tumor suppressor display a hypoxic response and recapitulate key aspects of Chuvash polycythemia*. Blood, 2009. 113(25): p. 6449-60.
15. Ahmed, S.U., et al., *Generation of subcutaneous and intrahepatic human hepatocellular carcinoma xenografts in immunodeficient mice*. J Vis Exp, 2013. (79), e50544, doi:10.3791/50544.

3.2 Purpose

Describe the project's main objective and explain why this objective is achievable.

- If the project is focussed on one or more research objectives, which research questions should be addressed during this project?
 - If the main objective is not a research objective, which specific need(s) does this project respond to?
-

The main objective of this project is to generate animal models **to gain insight in the molecular mechanisms behind the emergence and development of** pheochromocytoma. No proper in vivo model has been described for this type of cancer to date. Attempts to generate a mice model for pheochromocytoma were unsuccessful so far (Lepoutre-Lussey et al., 2015). Animal models for pheochromocytoma will enable us to investigate the underlying molecular pathways of the disease, the progression of the disease, and create the opportunity to develop therapeutics.

These objectives are achievable because we are working within a research group with a track record of projects on ;
). We already have experience with the CRISPR/Cas9 technique (). We work together on this project with an internist who specialized in pheochromocytoma. We are in contact with the researchers who generated and analyzed the VHL mutant zebrafish and we have a close collaboration for the graft mice work with a research group, who are experts in that field. In addition, we have an exquisite zebrafish facility with all the expertise and equipment we need for this project.

3.3 Relevance

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

The scientific relevance of this study is that it will yield fundamental insight in the modes of action causing pheochromocytoma. The exact pheochromocytoma-causing molecular processes are poorly understood. The social relevance of this study is that the generation of animal models for pheochromocytoma allows us to improve our understanding of the disease's aetiology and to test therapeutics against this non-curable type of cancer. Currently, 100 to 150 new pheochromocytoma patients are reported in The Netherlands each year. The majority of these patients suffers from hypertension, migraine, palpitation and sweating. Patients with malignant pheochromocytoma have a poor prognosis.

3.4 Research Strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy).

To study the underlying processes of the formation of pheochromocytoma in zebrafish, we will generate knock out and patient mutant strains of pheochromocytoma-related genes with CRISPR/Cas9. The patient mutation will mimic a mutation that was identified in a patient and is often a small deletion or amino acid substitution and will probably lead to a (partial) loss of function of the protein. We will carefully study the phenotype of homozygous mutants, both for anticipated characteristics and in an unbiased manner with a microarray (Animal procedure 1). These fish will be used

to gain fundamental insight in the underlying molecular pathways causing the disease. In parallel, zebrafish will be generated carrying a heterozygous mutation combined with a tissue-specific somatic mutation in the wild type allele in the interrenal gland. These zebrafish will be homozygous mutant for a pheochromocytoma-related gene in chromaffin cells only, similar to the situation in patients. These zebrafish will be used to study the phenotype of the interrenal gland and they will be investigated for metastatic features (Animal procedure 2). The two types of mutants, whole-animal mutants and tissue-specific mutants, are generated for separate purposes. The whole-animal mutants allow us to study the underlying molecular mechanisms of pheochromocytoma. This will yield insight in the fundamental pathways involved in the tumour formation and development. These mutants will also be used for drugs screens before they are 6 dpf. This cannot be done in the tissue-specific mutant, because that strain has only a very small portion of mutated cells and all other cells of their body do not have the mutation. The tissue-specific mutant strains are generated to study tumour growth and metastasis. For these purposes we want to have a mutant that closely resembles the patient situation, like the tissue-specific mutant does. As is the case in humans, it is very likely that the whole-animal mutant zebrafish do not survive long enough to develop primary and metastatic tumours. **On top of that, we expect that the risk factor for the generation of whole-animal mutants is low, while it will be higher for the generation of the tissue-specific mutants.**

Zebrafish have an interrenal gland instead of an adrenal gland. The only difference is the location of the gland. Besides that, the cell type, chromaffin cells, and the adrenalin/noradrenalin-producing function of the interrenal gland are exactly the same as the cell type and function of the mammalian adrenal gland.

Next to the zebrafish work, we will study the molecular pathways causing pheochromocytoma in a mouse nor-adrenergic chromaffin adrenal cell line,

After knock out of [REDACTED] and careful characterization of the cell line, we wish to transplant these cells into mice to study the tumour development in a mammalian model system. This cell line without the [REDACTED] mutation will serve as a negative control. We also want to do this for patient-derived fibroblast cells carrying a [REDACTED] mutation in both alleles, again after careful characterization of the cells. As a negative control, these cells will be transfected with a wildtype [REDACTED] construct. All cells will be supplemented with a bioluminescence construct to facilitate the distinction of the transplanted cells from other cells. Neither of the cell lines has been grafted before, therefore some initial experiments are needed to optimize the procedure for these cells. The transplantation will be done by performing a (xeno)graft in mice as was previously described (S. Sivanand *et al.*, 2012) (Animal procedure 3). If possible, the [REDACTED] cells will be transplanted in immune-competent mice. The human fibroblast cells have to be transplanted in the immune-deficient nude mice. After successfully grafting the cells, the tumour growth and metastasis will be monitored.

3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

The pheochromocytoma-related mutant zebrafish strains can be readily made using the latest CRISPR/Cas9 techniques. The knock out and patient mutant strains will be made by injection of CRISPR/Cas9 reagents into the one-cell embryo. Once we obtained a heterozygous mutant, we will cross it out with wild type zebrafish and cross the progeny in to generate homozygous offspring. Heterozygous pheochromocytoma-related mutant zebrafish are not anticipated to be different from wild type zebrafish, as is the case in humans. For the generation of chromaffin cell-specific null mutants, the heterozygous mutant will acquire a transgene expressing the CRISPR/Cas9 reagents in the chromaffin cells only. In that way, zebrafish will be created that can carry a homozygous mutation in the chromaffin cells and not in other cells.

After establishing the pheochromocytoma-related mutant zebrafish strains, the homozygous mutants will be subjected to a series of experiments (Animal procedure 1). The mutants will be analysed for gross histological changes. The survival time, the heart rate, and stroke volume will be scored for these homozygous mutants compared to their wild type siblings. We anticipate that the mutants will have shorter lifespan, increased heart rate, and increased stroke volume as this is the case for the VHL mutant zebrafish (Van Rooijen *et al.*, 2009). We will check with EdU staining whether there are any extra cell divisions occurring in the mutants. If possible, we will compare the metanephrine and normetanephrine levels of mutant and wild type zebrafish. Metanephrine and normetanephrine are stable waste products of the instable adrenaline and noradrenaline. If it turns out that it is not possible to measure metanephrine and normetanephrine in zebrafish samples, we will measure adrenaline and noradrenaline levels. In patients, metanephrine and normetanephrine levels are often elevated in their blood and urine because of the increased number of chromaffin cells in the tumour tissue.

To gain insight in the underlying molecular mechanisms of the disease we would like to perform a microarray on mRNA obtained from the mutant zebrafish and wild type siblings for all our mutant strains. With this experiment we will gain unbiased information of the changes in gene expression on a genome-wide level.

Besides performing the same analyses as described for the homozygous mutants, we will perform a series of additional experiments with the tissue-specific mutant strains. The levels of metanephrine and normetanephrine (or adrenaline and noradrenaline) will be determined in the urine and blood and compared to wild type siblings. The interrenal gland of the tissue-specific mutants will be analysed for histological changes and alterations in expression levels of hypoxia-related genes. We will look for features of metastasis in the interrenal-specific mutants by using a fluorescent HIF reporter, which is highly expressed in tumour tissue (Animal procedure 2).

We plan to use both graft mice models to investigate tumour development and metastasis. We will inject mutated tsAM5NE cells and patient-derived fibroblast cells into the of the mice and monitor tumour growth and metastasis. We will perform histological analysis, like analyzing the formation of new blood vessels.

3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points

Our goal is to generate zebrafish and cell models that will give us insight in the basic mechanisms behind the emergence and development of pheochromocytoma and models that mimic pheochromocytoma tumours to study the progression of the disease.

For the zebrafish, our first milestone will be to see whether zebrafish carrying a homozygous mutation in a pheochromocytoma-related gene show the anticipated phenotype. These homozygous zebrafish will provide us insight in the fundamental processes underlying this disease. A second

milestone will be to see whether tissue-specific mutants develop tumours and can be used to study the aetiology of this chromaffin cell-specific cancer. These zebrafish will be generated in parallel to the homozygous mutants described above. The studies in mice will depend on whether we can obtain cells that phenocopy pheochromocytoma tumours. Having such cells is a third milestone and a prerequisite for transplantation of these cells into mice. The graft mice model, the final milestone, will enable us to study the tumour growth and metastatic features of pheochromocytoma.

3.4.4 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	Analyzing the zebrafish phenotype of homozygous whole animal mutants
2	Examining the interrenal phenotype of the tissue-specific mutants
3	Transplanting cells in mice

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, see our website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 1	Type of animal procedure Analyzing the zebrafish phenotype of homozygous whole animal mutants

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.

Mutant strain generation

Per pheochromocytoma-related gene, we want to generate a knock out mutant strain and one strain carrying a patient mutation. For these two whole-animal mutant strains we wish to generate heterozygous strains. The knock out strain will be used to examine the phenotype in absence of the protein of interest and gain basic knowledge on what processes it is involved. The patient mutation often is a small deletion or amino acid substitution and will probably lead to a (partial) loss of function of the protein. The corresponding zebrafish strain will closer resemble the tumour and will also be used to confirm the phenotype of the knock out strain.

We will generate all these mutant strains with the latest CRISPR/Cas9 technology. CRISPR/Cas9 enables us to generate complete null mutations and the exact same mutations as observed in patients. The use of CRISPR/Cas9-induced mutations also allows us to investigate the long term effects of mutations. We will combine elements of previous studies to maximize the efficiency of our approach and minimize inducing unintended mutations elsewhere in the genome (Chang *et al.*, 2013; Gagnon *et al.*, 2014).

Phenotypic analysis of homozygous whole animal mutants

We wish to examine the phenotype of the homozygous knock out and patient mutant zebrafish. For one of the pheochromocytoma-related genes, VHL, the larval phenotype has been described in some extent. Because the mutations affect the same molecular pathway, we expect to find similar phenotypes for the mutant strains of the other pheochromocytoma-related genes. VHL is one of the most downstream components of the pathway and therefore might result in a stronger (direct effect) phenotype then when a more upstream component is mutated (indirect effect). The phenotypic aspects we expect based on the VHL mutant phenotype are shorter survival time, increased heart rate, and increased stroke volume (experiment 1).

. We also want to investigate the metanephrine and normetanephrine levels in the mutants and wild type siblings, since these are increased in patients (experiment 3).

Other parameters we want to determine for mutants of

s an unbiased approach to gain insight in the proteins involved in this type of cancer, we would like to perform a microarray experiment on mutant larvae and wild type siblings and determine the changes in expression level on a genome-wide scale (experiment 6).

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

Mutant strain generation

Since this DEC application only concerns the handling of zebrafish after 5 dpf, we focus here exclusively on describing the animal procedures for zebrafish of 6 dpf and older. The CRISPR/Cas9 procedure is performed in the embryos. Therefore, we do not describe the injection procedure in detail. For the knock out and patient mutants we will inject the CRISPR/Cas9 reagents in the one-cell embryo and genotype the zebrafish at 2 days post fertilization (dpf). We will select and grow up zebrafish with the desired mutation only.

Experiment 1

To determine the life span of the homozygous mutants the lethality will be scored daily. VHL mutants die after 8 to 11 days post fertilization (dpf) and we anticipate that other homozygous pheochromocytoma-related mutants have a similar life span. The heart rate and stroke volume of the mutants will be scored using a high speed video imaging set up. This will be done for larvae of 6, 8, and 10 dpf. If the pheochromocytoma-related mutants turn out to have a shorter or longer life span, we will adapt the time points accordingly.

Experiments 2-6

We want to measure EdU incorporation, [REDACTED], and genome-wide gene expression later than 5 dpf, but earlier than 2 days before the zebrafish die as determined in (1). For these measurements we will kill mutant and wild type at that stage.

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

We will reduce the number of animals by selecting the zebrafish with the desired mutation before 6 dpf and only let these mutants grow up. When available we will use published data to calculate the minimal number of animals needed to obtain significant results. For the survival time, the heart rate, and stroke volume we found published results (Van Rooijen *et al.*, 2009). Based on the standard deviation and the effect size of these results and an alpha of 0,05 and a power of 0,8, we calculated the number of animals needed with the statistics program Piface (Lenth, 2009). We lowered the expected effect size, because we anticipate that a non-functional VHL protein has a strong direct effect on the stabilization of HIFs, while this effect of other non-functional pheochromocytoma-related proteins is more indirect and therefore probably weaker. We will also use published data to estimate the number of animals needed to obtain enough material for the microarray procedure, [REDACTED]. We could not find evidence for metanephrine and normetanephrine measurements in zebrafish. We will perform a pilot study with the VHL mutants ourselves before the critical age of 6 days post fertilization (dpf).

B. The animals

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

We chose zebrafish as a model organism for several reasons. First, as described in the background of the project proposal, zebrafish have proven to be an excellent model for studying cancer (White *et al.*, 2013; Barriuso *et al.*, 2015). Second, zebrafish possess (potential) homologues of all the pheochromocytoma-related genes. Third, zebrafish have chromaffin cells. We will use the widely used wild type zebrafish strain AB.

Mutant strain generation

We estimate that we will need 50-80 zebrafish over 2 generations per stable knockout or patient mutant strain. Since zebrafish had an ancient genome duplication they often have two copies of a gene. This means we would maximally need 200–320 zebrafish per gene. We estimate that we will maximally generate mutant strains for four genes. This comes down to maximally 800–1.280 zebrafish in total for the mutant strain generation. $50 - 80 \text{ (number of fish needed per mutant strain)} \times 2 \text{ (zebrafish might have two homologs of a gene, diploid)} \times 2 \text{ (knockout and patient mutant strain)} \times 4 \text{ (max. number of genes to study)} = 800 - 1.280$

Phenotypic analysis of homozygous whole-animal mutants

We will use these mutant zebrafish strains for the following experiments:

1. For the life span experiment we will examine 30-40 mutant larvae and 30-40 wild type siblings per mutant strain. The heart rate and cardiac output will be scored with the same high speed video. Based on published data we calculated that we will need 25-40 mutant larvae and 25-40 wild type siblings per mutant strain (Van Rooijen *et al.*, 2009).
2. For the EdU incorporation and [REDACTED] we will need around 60-80 mutant zebrafish per mutant strain and a similar amount of wild type siblings.
3. The metanephrine and normetanephrine measurements have never been performed on whole-animal-lysates of zebrafish larvae. We are planning to do a pilot study to determine the number of larvae needed. We will start by using wild type and VHL mutant larvae of maximally 5 days old and test whether we can detect metanephrine and normetanephrine in their tissue and urine using mass spectrometry. Based on the outcome of this pilot study, we will decide how to measure these compounds.
- [REDACTED]
5. The genome succinylation analysis will be done in triplo using mass spectrometry. Around 40-80 larvae are needed to gather enough material for a mass spectrometry sample (Zhang *et al.*, 2015). For each mutant strain this would mean 240-480 zebrafish for three samples and three controls.
6. For the microarray experiment we will need 50-80 zebrafish of both the homozygous mutant as the wild type siblings to obtain enough RNA for the procedure (Van Rooijen *et al.*, 2009). To confirm the microarray data we would like to perform in situ hybridization experiments for the genes that have an altered expression level in the mutants. We would like to do this for not more than 10 genes per mutant strains. For each staining 100 larvae are needed, of which 50 serve as a control (Chitramuthu and Bennett, 2013). In total, we would need up to 1160 fish per mutant strain.

In total up to 2.040 fish will be needed to perform all these experiments for the [REDACTED] mutant strains and maximally 1.480 fish for the [REDACTED] mutant strains. We plan to make a knock out and a patient mutant strain for each gene we want to investigate, meaning we would need maximally 4.080 fish larvae per gene. We estimate that we will not generate mutant strains for more than four genes for practical reasons, which would come down to max. 16.320 zebrafish.

$2.040 \text{ (max. number of fish needed for all experiments)} \times 2 \text{ (mutant strains per gene)} \times 4 \text{ (max. number of genes to study)} = 16.320$

Together with the generation of the mutant strains the total number of fish needed is max. 17.600.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Danio rerio, strain AB mutated	Own breeding	16320	Probably larvae
Danio rerio, strain AB mutated	Own breeding	1280	Adult

C. Re-use

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☒ No, continue with question D.

☐ 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.

D. 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: Integrative aspects such as neo-vascularisation and effects of released hormones cannot be studied in cell culture. One of the pheochromocytoma-related genes, Von Hippo Lindau (VHL), has already been mutated in zebrafish (Van Rooijen *et al.*, 2009). Although the objective of that particular study was not related to pheochromocytoma, but to other aspects of the VHL disease, the mutated zebrafish exhibited the anticipated phenotype. Because VHL is acting in the same hypoxia-related pathway as the other Cluster 1 genes, we think zebrafish will be a good model organism for pheochromocytoma as well.

Reduction: We used statistics and published data to estimate the minimal number of animals needed. We reduce the number of animals by genotyping them at 2 dpf, so we can already select the fish with the desired mutation at that time point and only let these mutants grow up.

Refinement: The zebrafish will be housed in groups, the water in our facility is 26 to 28 degrees and is continuously refreshed, the zebrafish are fed twice a day, and the facility provides a circadian light-dark rhythm.

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

To minimise animal suffering we will monitor the zebrafish daily and perform the experiments as soon as the zebrafish reached the age of planned analysis. We will kill them if a humane endpoint is reached. Adverse effects on the environment are not anticipated.

Repetition and Duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

☒ No

☐ Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

G. 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 H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

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

The homozygous mutant larvae might experience pain, because they will probably die in the experiment in which the survival time is determined. For most of the other experiments they will live until a few days prior to their expected death. It is not possible to keep them under constant anaesthesia during their development.

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Like in patients, the fish might suffer from high blood pressure. We do not expect any other adverse effects on the welfare of the zebrafish.

Explain why these effects may emerge.

This is a symptom of pheochromocytoma.

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

It is not possible to decrease the blood pressure.

J. 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 K.

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

The zebrafish will be killed when the zebrafish show clear signs of physical or behavioral distress due to the size or location of a tumour. Also, if fish show abnormal development, like curved shape, or abnormal swimming behavior the fish will be killed.

Indicate the likely incidence.

This is difficult to indicate, because there are no pheochromocytoma fish models. We expect that the vast majority of the fish will be killed after the experiments and not reach a humane endpoint.

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned (non-recovery, mild, moderate, severe).

We expect that the heterozygous knock out and patient mutant strains will not experience any discomfort, because humans carrying a heterozygous mutation in a pheochromocytoma-related gene do not exhibit any symptoms. Therefore, we assign these zebrafish strains to the category mild discomfort and expect that we can confirm after two generations that these zebrafish indeed do not show any signs of discomfort. The collection of materials zebrafish is assigned to the non-recovery category. The homozygous mutant zebrafish are assigned to the category moderate and we do not expect discomfort for the wild type siblings. In total, 53% of the fish are categorized as experiencing mild discomfort and 47% moderate discomfort.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

L. Method of killing

☐ No

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

It is likely that there will be mutants generated that carry a mutation in somatic cells only and not in their germ cells. These zebrafish cannot transmit the mutation to their progeny and can therefore not be used in our project and thus will need to be killed. This is a general drawback of the CRISPR/Cas9 technology in zebrafish. There is no method to confirm that the zebrafish developing from the injected embryos carry the intended germ line mutations other than determining whether they pass the mutation on to their offspring.

For several experiments described above we need to collect lysates, RNA, or protein from the larvae. This can only be collected after killing them.

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.

☒ Yes

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, see our website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 2	Type of animal procedure Examining the interrenal phenotype of the tissue-specific mutants

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.

Mutant strain generation

Per gene, we want to generate one mutant strain with a chromaffin cell-specific mutation. The tissue-specific mutant strain is the best representation of the situation in the patient and will serve as a model to study tumour growth and metastasis, while the underlying molecular mechanisms can be studied best in the whole-animal mutants. We will generate these mutant strains with the latest CRISPR/Cas9 technology. For the tissue-specific mutants we will generate transgenic zebrafish with a tol2 cassette that can express the CRISPR/Cas9 reagents of which the Cas9 protein will be expressed from a chromaffin cell-specific promoter. We will combine the tissue-specific mutant with the heterozygous whole animal mutant background to resemble the genotype that is most frequent in patients. This method for generation of tissue-specific mutants was previously published (Ablain *et al.*, 2015).

Phenotypic analysis of tissue-specific mutants

We would like to investigate the development of pheochromocytoma using our tissue-specific mutants. In these pheochromocytoma-related mutants we want to determine the metanephrine and normetanephrine levels in their blood and urine compare the values with wild type siblings. Swimming water containing urine measurements will be performed every week and will be the indicator of when the zebrafish develop a tumor. Once they have a tumour, we want to analyse the morphology and characteristics of the interrenal gland of these mutants. We will therefore isolate the kidneys containing the interrenal gland from these mutants and subject them to RNA expression and immunohistochemistry protein localization studies.

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

Mutant strain generation

Since this DEC application only concerns the handling of zebrafish after 5 dpf, we focus here exclusively on describing the animal procedures for zebrafish of 6 dpf and older. The CRISPR/Cas9 treatment is done in the embryos. Therefore, we do not describe the injection procedure in detail. The selection of transgenic fish for the tissue-specific mutant is done within the first five days post fertilization by selecting larvae that express a fluorescent injection marker encoded by the transfected CRISPR/Cas9 construct.

Phenotypic analysis of tissue-specific mutants

The zebrafish will be housed in standing water for 24 hours to collect urine. This will be done every week until elevated metanephrin or normetanephrin levels are detected, which is a sign that the fish has developed a chromaffin cell tumor. For urine collection adult fish will be housed individually, while it might be necessary to house larvae in groups to be able to collect enough urine. The blood for measuring the metanephrine and

normetanephrine levels of the tissue-specific mutants and wild type siblings will be collected from adult fish once they show increased levels of metanephrine and normetanephrine in their urine. The blood will be collected during a terminal procedure by cutting the tail while the animals are under anaesthesia. Because it is not known whether metanephrine and normetanephrine concentrations can be measured in zebrafish blood, we will first perform a pilot experiment with VHL mutants and wild type fish to determine this. We will subsequently collect the head kidneys including the interrenal gland of these adult mutants and wild type siblings.

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

We reduce the number of animals by selecting the transgenic zebrafish before 5 dpf and only let these mutants grow up. To be able to collect enough kidneys to perform RNA and protein stainings on we expect to need 100 mutant animals and 100 siblings per mutant strain. We anticipate we want to stain for several components of the pheochromocytoma-related pathways, as well as for multiple candidates that came out the microarray discussed in animal procedure 1. Per staining we will need around 40 kidneys, of which 20 will serve as a control sample. We expect to stain for maximally 10 mRNAs or proteins with each mutant strain, meaning we would need 400 fish. In total, we estimate that we will generate maximally mutant strains for four genes, which would come down to 1600 fish.

B. The animals

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

We will use the widely used wild type zebrafish strain AB. For the chromaffin cell-specific strains we expect we will need 15 zebrafish per gene for the first generation of zebrafish which is unstable and up to 400 zebrafish of the second stable generation of which we want to collect blood and tissue from at the adult stage. Since we are planning to generate mutants for max. four genes, we will need maximally 1660 fish. For the pilot experiment to detect the levels of metanephrine and normetanephrine in the blood of wildtype zebrafish and fish treated with [REDACTED], we will need 240 fish. We calculated this number based on the fact that 5 microliter of blood can be collected from an adult zebrafish, 200 microliter of blood is needed as a sample for the mass spectrometry analysis, and we want to perform the experiment in triplo.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Danio rerio, strain AB, transgenic	Own breeding	1660	Adult
Danio rerio, VHL mutant	[REDACTED]	120	Adult
Danio rerio, wild type	[REDACTED]	120	Adult

C. Re-use

Will the animals be re-used?

C. Re-use

☒ No, continue with question D.

☐ 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.

D. 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: Integrative aspects such as neo-vascularisation and effects of released hormones cannot be studied in cell culture. One of the pheochromocytoma-related genes, Von Hippo Lindau (VHL), has already been mutated in zebrafish (Van Rooijen *et al.*, 2009). Although the objective of that particular study was not related to pheochromocytoma, but to other aspects of the VHL disease, the mutated zebrafish exhibited the anticipated phenotype. Because VHL is acting in the same hypoxia-related pathway as the other pheochromocytoma-related genes, we think zebrafish will be a good model organism for pheochromocytoma.

Reduction: We reduce the number of animals by selecting the fish with the desired mutation before 5 dpf and only let these mutants grow up.

Refinement: The zebrafish will be housed in groups most of the time, the water in our facility is 26 to 28 degrees and is continuously refreshed, the zebrafish are fed twice a day, and the facility provides a circadian light-dark rhythm.

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

To minimise animal suffering we will monitor the zebrafish daily and perform the experiments as soon as the zebrafish reached the age of planned analysis. We will kill them if a humane endpoint is reached. Adverse effects on the environment are not anticipated.

Repetition and Duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

☒ No

☐ Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

G. 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 H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

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

The chromaffin cell-specific mutant zebrafish might develop tumours and because of that may experience pain. To reduce the discomfort of these zebrafish we analyse them for the anticipated phenotypes as early as possible and will kill them as soon as possible afterwards or when they reach a humane endpoints. It is not possible to administer pain relief continuously to zebrafish.

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Depending on the size and location of the tumour and metastasized tumours, the fish might experience physical limitations. The fish might experience stress when they are housed individually to collect urine. Like in patients, the fish might suffer from high blood pressure. We do not expect any other adverse effects on the welfare of the zebrafish.

Explain why these effects may emerge.

Tumour formation and during the urine collection procedure the fish will be housed individually for 24 hours.

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

We will house zebrafish individually only when needed. There is no method to prevent the discomfort due to the development of cancer.

J. 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 K.

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

The zebrafish will be killed when the zebrafish show clear signs of physical or behavioral distress, like abnormal swimming behavior, due to the size or location of a tumour. Also, if fish show abnormal development, like curved shape, the fish will be killed.

| Indicate the likely incidence.

This is difficult to indicate, because the proposed experiments have never been done before. If the effects are as in humans, we expect that the chromaffin cell-specific mutant zebrafish will all develop tumours and that about 67% of the chromaffin cell-specific [REDACTED] mutants will have metastasized tumours. We expect that the vast majority of the fish will be killed directly after the experiments and not reach a humane endpoint.

| **K. Classification of severity of procedures**

| Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned (non-recovery, mild, moderate, severe).

The tissue-specific mutants will likely develop pheochromocytoma that might metastasize and we therefore assign those strains (44% of the fish) to the category moderate discomfort. The procedure for the siblings (44%) includes individual housing, a procedure that is assigned to category mild. For blood collection the procedure is assigned to non-recovery (12%).

End of experiment

| **L. Method of killing**

| Will the animals be killed during or after the procedures?

| ☐ No

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

It is likely that there will be mutants generated that carry a mutation in somatic cells only and not in their germ cells. These zebrafish cannot transmit the mutation to their progeny and can therefore not be used in our project and thus will need to be killed. This is a general drawback of the CRISPR/Cas9 technology in zebrafish. There is no method to confirm that the zebrafish developing from the injected embryos carry the intended germ line mutations other than determining whether they pass the mutation on to their offspring. Animals will also be killed to be able to collect blood and tissue from them.

| 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.

| ☒ Yes

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, see our website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 3	Type of animal procedure Transplanting cells in mice

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.

We are going to work on a cell model for pheochromocytoma. We will grow and develop two different cell lines for this purpose. We will use patient-derived fibroblasts with mutations in both [REDACTED] alleles and a mouse adrenal cell line, [REDACTED], carrying a [REDACTED] knock out mutation. As controls, we will supplement the fibroblast cell line with a [REDACTED] rescue construct and we will use the [REDACTED] cells with intact [REDACTED] genes. After careful characterization of these cell lines, we would like to graft them in mice. The fibroblast cells in nude immuno-incompetent mice and the [REDACTED] cells in immuno-competent mice if possible. We will first test if the cells are not rejected by the host mice, determine how many cells need to be injected, and whether a tumour mass is formed. If the cells are accepted and forming a tumour, we will study tumour growth and metastasis in these graft mice models. The primary outcome parameters are tumour growth and metastasis of transplanted cells.

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

For the graft procedure we will follow a protocol which has been published (Ahmed *et al.*, 2013). Mice will be anesthetized by inhalation with an isoflurane vaporizer. Mice will be placed on a warming pad, fur will be shaved, and the area will be sterilized using Betadine. Cells will be injected subcutaneously. Adrenal injection of cells is not possible, because the gland is too small. Bioluminescent imaging at the recently-established [REDACTED] [REDACTED] will be performed twice a week under anaesthesia. This allows us to monitor tumor growth over time (luciferase quantification) in these graft assays. The experiment will end when metastasis is observed.

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

We will use 12 mice per group for the final experiment only, in which the tumour growth and metastasis will be determined. We choose this number of animals because there are no data on which we can calculate the number of animals needed and it was shown that 12 animals per group provide the best change of significant results in a study [1].

1. Julious, S.A., *Sample size of 12 per group rule of thumb for a pilot study*. Pharmaceutical Statistics, 2005. Volume 4, Issue 4, pages 287–291

B. The animals

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

To investigate tumour growth and metastasis of cell lines we turn to mice models since they provide excellent graft models. We will use nude mice of the strain NOD/SCID for the fibroblasts, since these mice are immuno-deficient and the cells are from a different species. For the [REDACTED] cells we will use the widely used black six mice. Males and females will be injected at 4 to 6 weeks of age as done previously (Sivanand *et al.*, 2012). To determine whether the cells are not rejected and form a tumour mass we will use maximally 15 mice per cell line. In the final experiment, 30 mice will be used per cell line, 12 for either the patient-derived cells or the mouse adrenal [REDACTED] knock out cells, 12 for the negative control group and 6 for the positive control group.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Mice strain NOD/SCID	own breeding	45	4 - 6 weeks old
Mice strain C57BL/6	own breeding	45	4 - 6 weeks old

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☒ No, continue with question D.

☐ 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.

D. 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: No alternatives are available to answer our research question about tumour growth and metastasis of pheochromocytoma. Integrative aspects such as neo-vasculariation and effects of released hormones cannot be studied in cell culture.

Reduction: Since this is the first study with these cells in mice, we will use 12 mice per group. It was shown that 12 animals per group provide a good change of obtaining significant results (Julious, 2005).

Refinement: Mice will have ad libitum access to food and water for the duration of the experiment. Mice will be housed in groups. Cage enrichment (shelters) will be supplied to reduce stress in the animals. The mice facility provides the mice with a 12 hour light - 12 hour dark circadian rythm. All these aspects will lead to minimizing the discomfort of the animals. The design and the duration of the experiment are such that the discomfort of the animals is as little as possible.

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

To minimise animal suffering the mice will be monitored daily. They will be housed in groups. [Anaesthesia](#) will be used just before and during surgery. Painkillers will be used afterwards. We will kill them if a humane endpoints is reached. We see no reason why adverse effects on the environment would occur.

Repetition and Duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

☒ No

☐ Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

G. 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 H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

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

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

Mice will be anesthetized by inhalation with an isofluorane vaporizer and buprenorphine will be administered by intraperitoneal (IP) injection immediately after surgery, while the mice are still anesthetized, and a second dose 12 hours after surgery. Mice will be placed on a warming pad, fur will be shaved, and the area will be sterilized using Betadine.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

All mice might possibly experience discomfort because of the location of a metastasized tumour. For the fibroblast xenograft mice, we do not expect any other effects on the welfare of the animals. The mice with the [REDACTED] cells might suffer from high blood pressure.

Explain why these effects may emerge.

The high blood pressure that might occur in the mice with [REDACTED] cells is caused by excessive production of adrenalin and/or noradrenalin by the grafted adrenal cells.

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

Metastasis will be frequently monitored. There are no measures to be taken against the high blood pressure.

J. 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 K.

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

The mice will be monitored daily and evaluated for body weight and tumor growth by physical exam twice weekly. When the mice show obvious signs of discomfort, like tarnished fur and abnormal behaviour, they will be anesthetized with isofluorane, exsanguinated by cardiac puncture and killed.

Indicate the likely incidence.

We anticipate that the mice will be killed directly after the experiments and not reach a humane endpoint.

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned (non-recovery, mild, moderate, severe).

The grafted mice are assigned to the category moderate.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

For the collection of tumour material the mice need to be killed.

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.

☒ Yes

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2015-0098
2. Titel van het project: Towards understanding and treatment for pheochromocytoma
3. Titel van de NTS: Op naar begrip van en behandeling voor bijniertumoren
4. Type aanvraag:
 - ☐ nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - Naam DEC: RUDEC
 - Telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED] bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - Mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject:
 - ☐ ontvangen door DEC: 21-07-2015
 - ☐ aanvraag compleet
 - ☐ in vergadering besproken: 04-08-2015 en 08-09-2015
 - ☐ anderszins behandeld
 - ☐ termijnonderbreking(en) van 13-08-2015 tot 25-08-2015, van 15-09-2015 tot 22-09-2015, en van 12-10-2015 tot 16-10-2015
 - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - ☐ aanpassing aanvraag: 25-08-2015, 15-09-2015 en 16-10-2015
 - ☐ advies aan CCD: 02-11-2015
7. Eventueel horen van aanvrager
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Strekking van de vraag / vragen
 - Strekking van het (de) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag
8. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 13-08-2015
 - Strekking van de vragen:

Niet-technische samenvatting:

-3.4 De doelgroep zal niet begrijpen wat het analogieprincipe inhoudt. Graag anders opschrijven of uitleggen.

-4.2 Uit de laatste zin is niet duidelijk waarom dit bijdraagt aan vermindering van het aantal proefdieren.

-4.4 De gegeven informatie is niet toereikend. Wat wordt er precies bekeken bij de proefdieren (bv. Ventilatiesnelheid?) en op welke manier leidt dat tot het beperken van de negatieve gevolgen voor het welzijn van de dieren (wanneer wordt er besloten tot welke actie?)

Project Proposal:

-3.1 Een onderbouwing waarom de zebravis goed bruikbaar is voor kankeronderzoek ontbreekt nog. In de bijlage voor dierproef 1 worden hiervoor referenties genoemd die te summier zijn (de naam van het tijdschrift en de vermelding van de pagina's ontbreken) om terug te vinden. De onderzoekers worden verzocht dit uitgangspunt meer uitgebreid (waarom vormen deze vissen een excellent model?) te onderbouwen onder 3.1.

-3.1 Het project is gereviewed en gefinancierd door de [REDACTED]. Heeft deze organisatie het project op wetenschappelijke wijze gereviewed?

-3.4 Indien er geen tumoren zouden ontstaan in de vissen met orgaanspecifieke mutaties (dierproef 2) lijkt er geen reden om dierproef 1 uit te voeren. De onderzoekers worden derhalve verzocht de volgorde van de dierproeven om te draaien en dit go/no go moment op te nemen in de aanvraag. Indien zij anderszins van mening zijn worden zij verzocht dit duidelijk en overtuigend te beargumenteren.

-3.4 De toelichting op de aan- of afwezigheid van bijnieren in zebravissen is verwarrend. Is een 'interrenal gland' hetzelfde als een 'adrenal gland' afgezien van de positie en de naam?

Description of Animal Procedures:

-DAP1 (DAP2 na gevraagde aanpassing)

*2. A. De onderzoekers hanteren een power van 0.9. Zij worden verzocht uit te leggen waarom de gebruikelijke power van 0.8 onvoldoende zou zijn.

*2.B. De bruikbaarheid van de zebravis als model voor kanker is onvoldoende toegelicht (zie ook de eerste vraag bij het project proposal).

*2. B. Het geschatte aantal dieren is gebaseerd op tetraploidie, terwijl de dieren diploid zijn.

*2. H. Continue pijnbestrijding bij vissen is wel mogelijk.

-DAP3.

*1.3 Het betreft niet alleen naakte muizen

*2.A.1. De [REDACTED] cellen worden niet in naakte muizen maar in immunocompetente C57BL/6 muizen getransplanteerd.

*2.A.2 Is injectie in de nier wel een goed model voor pheochromocytoom (in het protocol waarnaar wordt verwezen is sprake van 'renal cell carcinoma')? Waarom is injectie in de bijnier niet mogelijk? Waarom kiezen de onderzoekers voor het aanbrengen van een tumor onder het nierkapsel – hetgeen bij uitgroeien van de tumor veel ongerief voor het dier veroorzaakt – en niet voor het aanbrengen van een subcutane tumor? Dit laatste is technisch eenvoudiger, minder belastend voor het dier en de tumorgroei is eenvoudiger te volgen.

*2.A.3. Kunnen de onderzoekers de keuze voor 12 muizen per groep duidelijker uitleggen? Geldt dit aantal voor alle mogelijke dierexperimenten?

*2.D Het onderdeel verfijning is niet adequaat beantwoord.

*2.J De onderzoekers dienen hier alleen humane eindpunten te noemen (tumorgrootte van 10 mm is een experimenteel eindpunt).

- Datum antwoord: 25-08-2015

- Strekking van de antwoorden:

Niet-technische samenvatting:

- 3.4 De zin is aangepast en het woord analogieprincipe is niet meer aanwezig in de bijgevoegde versie van de aanvraag.
- 4.2 Deze zin is nu verwijderd uit de aanvraag.
- 4.4 De tekst is uitgebreid.

Project Proposal:

- 3.1 Er is een stuk tekst toegevoegd over de zebravis als uitstekend modelorganisme voor kankeronderzoek. Ook is er een referentielijst toegevoegd.
- 3.1 Ja, onze aanvraag is uitgestuurd naar een commissie van vooraanstaande wetenschappers voor evaluatie. Nadat zij hun adviezen hadden uitgebracht en deze naar hun tevredenheid waren verwerkt in de aanvraag, heeft de [REDACTED] de beurs toegekend. Deze informatie is nu ook in de aanvraag verwerkt.
- 3.4 De twee typen mutanten, de algehele mutant en de weefselspecifieke mutant, worden voor verschillende doeleinden gemaakt. De algehele mutant wordt gemaakt om de onderliggende signaal transductie routes te bestuderen. Dit kan niet in de weefselspecifieke mutant, omdat daar slechts een klein deel van de cellen gemuteerd zijn. De weefselspecifieke mutant wordt gemaakt om naar tumorvorming en metastasering te kijken. Daarbij willen we de humane situatie in patiënten met een feochromocytoom zoveel mogelijk nabootsen en de weefselspecifieke mutant lijkt het meest op de patiënt. Het is daarnaast zeer aannemelijk dat de algehele mutant niet lang genoeg leeft om tumorgroei en metastase te kunnen bestuderen. Bovendien zou het kunnen dat in de algehele mutant ook tumoren in andere weefsels ontstaan, aangezien het bekend is dat mutaties in Cluster 1 genen ook kunnen leiden tot het ontstaan van tumoren in andere organen, zoals de nier. Deze uitleg is ook verwerkt in de tekst van de aanvraag.
- 3.4 De formulering omtrent de 'interrenal gland' is aangepast.

Description of Animal Procedures:

- DAP1 (DAP2 na gevraagde aanpassing)
- *2. A. De power die gehanteerd zal worden is veranderd in 0,8.
- *2.B. Er is nu verwezen naar de uitleg die in het projectvoorstel staat.
- *2. B. Zebravissen hebben lang geleden een genoomduplicatie ondergaan. Daardoor kan het zijn dat zebravissen twee homologe genen hebben van een humaan gen. Toegelichte berekeningen waaruit het totaal aantal dieren komt zijn nu toegevoegd.
- *2. H. Ik, noch de zeer ervaren dierverzorger, noch collega-onderzoekers die met zebravissen werken kennen middelen die gebruikt worden voor continue pijnbestrijding bij zebravissen. Ook is het zo dat de kans dat de vissen pijn ervaren als gevolg van de tumor zeer klein is, aangezien patiënten met een feochromocytoom dit ook niet hebben.
- DAP3.
- *1.3 Klopt, dit is nu veranderd.
- *2.A.1. Klopt, dit is nu veranderd.
- *2.A.2 De bijnier is te klein om de benodigde hoeveelheid cellen in te injecteren. De aanvraag is aangepast en bevat nu subcutane injectie in plaats van injectie onder het nierepithelium.
- *2.A.3. Er zijn geen eerdere graft experimenten uitgevoerd met de voorgestelde cellen. Aangezien er dus geen data zijn waaruit we de verwachte standaard deviatie kunnen

afleiden, nemen we 12 dieren per groep. Er is namelijk aangetoond dat dit aantal dieren per groep een goede kans geeft op een significant resultaat, zie referentie in de aanvraag. Dit aantal geldt alleen voor de uiteindelijke proef waar tumorgroei en metastase wordt bestudeerd.

Deze toelichting is ook in de aanvraag verwerkt.

*2.D Uit uw opmerking blijkt niet wat er precies mist. Dit onderdeel is nu wat uitgebreid in de aanvraag en voldoet nu hopelijk aan uw verwachtingen.

*2.J De tumorgrootte is verwijderd uit het onderdeel humane eindpunten.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

- Datum: 15-09-2015

- Strekking van de vragen:

Project Proposal:

-3.2 De onderzoekers poneren dat er geen in vivo model is beschreven voor dit type kanker. De commissie heeft een review artikel gevonden over dit onderwerp: From Nf1 to Sdhb knockout: successes and failures in the quest for animal models of pheochromocytoma (C. Lepoutre-Lussey et al, Molecular and Cellular Endocrinology (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2015.06.027>) en meent dat het door de onderzoekers geponeerde in het licht van de inhoud van dit review geen stand houdt. Zij verzoekt de onderzoekers de informatie uit dit review op te nemen in de aanvraag en de aanvraag zo nodig aan te passen.

-Het antwoord op de gestelde vraag over 3.4 is niet afdoende om de huidige proefopzet te verantwoorden. Wanneer er in proef 2 geen tumoren ontstaan, is er geen reden meer om proef 1 uit te voeren. Het doel is immers het genereren van een tumormodel. De onderzoekers worden nogmaals verzocht de volgorde van dierexperimenten om te draaien en een go/no go moment op te nemen in de aanvraag. Indien zij anderszins van mening zijn worden zij verzocht dit duidelijk en overtuigend te beargumenteren.

Description of Animal Procedures:

-DAP3

*2.A.3 De keuze voor 12 muizen per groep wordt niet ondersteund door de gegeven referentie. In dit artikel komt een groeps grootte van 12 niet voor. De berekeningen voor de benodigde groeps grootte zijn in dit artikel ook gestoeld op een bepaalde effectgrootte die men wil aantonen. De onderzoekers worden verzocht opnieuw te beargumenteren waarom zij deze groeps grootte willen hanteren.

*2.D In de toelichting van de CCD staat uitgelegd wat met verfijning wordt bedoeld (onder D op pagina 13): het beoogde doel van de proef kan niet worden bereikt met een andere opzet (design) waardoor de dieren minder ongerief ondervinden. De onderzoekers worden verzocht deze vraag opnieuw te beantwoorden.

- Datum antwoord: 22-09-2015

- Strekking van de antwoorden:

Project Proposal:

-3.2 De betreffende tekst is aangepast en genuanceerd. De referentie is opgenomen in de tekst. Ook in de referentie staat dat er tot op heden geen goed diermodel is voor Cluster 1 feochromocytoma.

-Het doel van dit onderzoeksproject is om diermodellen te genereren voor feochromocytoma. Mocht dit lukken dan zullen ze worden gebruikt om een beter begrip van de moleculaire mechanismen te krijgen die leiden tot tumorvorming en om de mogelijkheid te krijgen in een diermodel te kunnen screenen voor blokkers van deze pathways. Zoals beschreven is het nog nooit gelukt hiervoor een goed diermodel op te zetten. Wij denken dat dit samenhangt met de moleculaire pathways die geactiveerd worden met een [REDACTED] mutatie en dat daarmee zebravissen het ideale diermodel kan zijn, maar bij gebrek aan goed inzicht in de onderliggende mechanismes en gezien de eerdere pogingen door andere groepen met andere modellen is het project risicovol. Om deze reden omvat ons voorstel 2 proeven (proef 1 en 2) die een verschillend risicoprofiel en bruikbaarheid zullen hebben. Bij Proef 1 zullen alle cellen een mutatie hebben in [REDACTED]. Technisch gezien zal deze opzet zeker slagen (laag risico) en de verwachting is dat een deel van de moleculaire pathway die zal leiden tot feochromocytoma's uit deze vissen te herleiden is. Het is echter te verwachten dat de vissen te kort leven om tumoren te ontwikkelen. Wel verwachten wij grootschalige medicijn testen uit te kunnen voeren bij de larvale stadia van deze mutanten. Dit kan leiden tot het identificeren van potentiële medicijnen tegen feochromocytoma. Bij proef 2 proberen we het [REDACTED]gen alleen in de bijnier uit te schakelen. Hoewel dit het ideale modelsysteem zou zijn heeft dit model een aantal nadelen. Allereerst is het risico dat deze opzet niet zal slagen beduidend groter dan van proef 1. Immers, we weten niet of de grootte en keuze van de promotor die voor weefsel-specifieke deletie van [REDACTED] moet zorgen goed genoeg is. Daarnaast weten we niet of de vissen dan tumoren zullen gaan ontwikkelen. Ten derde is de bijnier van de vis zo klein dat we daar minder analyses aan kunnen doen dan aan de hele vis zoals gegenereerd in proef 1. Algehele mutanten kunnen dus op zichzelf waardevolle bijdragen leveren aan het onderzoeksveld.

Description of Animal Procedures:

-DAP3

*2.A.3 De referentie is aangepast. Excuses voor de verwarring.

*2.D Deze informatie is nu verwerkt in de aanvraag.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

- Datum: 12-10-2015

- Strekking van de vragen:

Project Proposal:

-De doelstelling van het project is het genereren van een tumormodel. Tot welk model leidt proef 1 en wat is de waarde van dit model? Indien in proef 1 geen tumormodel in strikte zin wordt gegenereerd, kunnen de onderzoekers de doelstelling dan anders verwoorden waardoor zowel proef 1 als proef 2 binnen deze nieuwe doelstelling passen? Een goede omschrijving van het doel van het project is noodzakelijk voor de ethische afweging en de toetsbaarheid van het project. De onderzoekers worden verzocht deze vraag met zorg te beantwoorden.

Description of Animal Procedures:

-DAP3, vraag D. De gegeven referentie toont aan dat in zijn algemeenheid voor een pilotstudie een groepsgrootte van 12 verdedigbaar is, maar dit geldt niet zonder meer voor dit experiment. Als aanname voor de globale berekening van het benodigde aantal dieren gaat de commissie desalniettemin akkoord met deze groepsgrootte. Zij gaat er vanuit dat u in het werkprotocol een goed onderbouwde groepsgrootte zult hanteren.

- Datum antwoord: 16-10-2015
- Strekking van de antwoorden:

Project Proposal:

-Het diermodel dat gegenereerd wordt in proef 1 is een diermodel waarbij in alle cellen een mutatie aanwezig is. Naar verwachting zal dit diermodel waardevolle inzichten geven in de basale mechanismes die een rol spelen bij het ontstaan van feochromocytomen. Dit diermodel is inderdaad geen tumormodel in strikte zin, daarom is de projectomschrijving nu op meerdere plekken breder opgezet. Ook de titel van het project is aangepast.

Description of Animal Procedures:

-DAP3, vraag D. Ik neem uw overweging mee en zal in het werkprotocol een goed onderbouwde groepsgrootte hanteren.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)

- Aard expertise
- Deskundigheid expert
- Datum verzoek
- Strekking van het verzoek
- Datum expert advies
- Expert advies

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
 - ☐ uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling, namelijk 'to generate animal models to gain insight in the molecular mechanisms behind the emergence and development of Cluster 1 pheochromocytoma'. De onderzoeker streeft er naar goed omschreven diermodellen voor feochromocytoom te verkrijgen. Het is aannemelijk dat deze diermodellen meer inzicht zullen verschaffen in de moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan het ziektebeeld en in de progressie van de ziekte, en aanknopingspunten voor een therapie zullen opleveren. Feochromocytoom komt niet vaak voor in de populatie, maar is wel een ernstige ziekte met een

slechte prognose. Wanneer de tumor niet operatief verwijderd kan worden, is er geen verdere behandeling van deze letale ziekte mogelijk. Maatschappelijk is dit onderzoek van belang, omdat de resultaten kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van een therapie voor feochromocytoom, wat zou resulteren in gezondheidswinst voor mensen met deze aandoening. De DEC acht het belang van die doelstelling substantieel.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De groep heeft samenwerkingspartners gevonden die op alle onderscheiden aspecten relevante ervaring inbrengen in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De gekozen aanpak leidt tot goed omschreven diermodellen voor feochromocytoom.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk bepaald door de homozygote genetische aanleg voor feochromocytoom in de zebravissen en de groei van tumorcellen in de muizen. De DEC schat het ongerief voor de zebravissen als gevolg van de benodigde video-observatie, herhaalde individuele huisvesting gedurende 24 uur, en bloedafname onder terminale anesthesie in als licht; het ongerief voor de zebravissen als gevolg van de homozygote genetische aanleg voor feochromocytoom (hetzij in het hele dier, hetzij weefselspecifiek) schat de commissie in als matig. De DEC schat het ongerief voor de muizen als gevolg van de benodigde subcutane injectie van tumorcellen tijdens anesthesie en de herhaalde imaging tijdens anesthesie in als licht; het ongerief als gevolg van de subcutaan groeiende tumoren totdat zij metastaseren schat de commissie in als matig. Het cumulatief ongerief voor de zebravissen en de muizen in de beschreven vergunningaanvraag is dus juist ingeschat als licht voor 53% van de vissen, matig voor 47% van de vissen, en matig voor alle muizen.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De doelstelling van het project kan niet gerealiseerd worden zonder proefdieren of door gebruik van minder complexe diersoorten. Een ziekte waarbij meerdere organen zijn betrokken kan niet goed bestudeerd worden zonder proefdiermodellen. Transplantatie van humane tumorcellen is niet mogelijk in minder complexe diersoorten dan muizen.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC is het eens met het beschreven onderzoeksmodel en de onderbouwing van het aantal benodigde dieren. Door het gebruik van imaging om tumorgroei en metastasering te volgen kunnen meerdere metingen aan één dier gedaan worden, wat tot betrouwbaardere resultaten leidt en minder dieren vergt. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 19.500 vissen en 90 muizen.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven. De experimentele handelingen bij de dieren zullen worden uitgevoerd door hierin getrainde onderzoekers, waardoor de stress voor de dieren zoveel mogelijk wordt beperkt. Dagelijkse controles van de dieren zorgen ervoor dat bij onverwacht optredend ongerief tijdig kan worden ingegrepen. De te gebruiken zebravislarven worden dagelijks gescoord op letaliteit van de aangebrachte mutatie. De commissie heeft besproken of dit een aanvaardbare methode is, en of er geen andere uitleesparameters mogelijk zijn dan het doodgaan van de larven. Ook heeft de commissie een discussie gevoerd over de vraag of er in dit opzicht een verschil gemaakt zou

mogen worden tussen zebravislarven en bijvoorbeeld muizenpups. Is het hanteren van dit soort uitleesparameters ethisch minder problematisch als het zebravislarven betreft? De commissie concludeert dat het geven van een antwoord op die vraag meer tijd en inspanning zou vergen dan deze procedure toelaat. Ze gaat uiteindelijk akkoord met de beschreven methode, vanwege het ontbreken van reële alternatieven. De tumorcellen worden subcutaan getransplanteerd bij de muizen, waardoor tumorgroei en metastasering is te volgen met bioluminescente imaging. Doordat metastasering al in een vroeg stadium kan worden vastgesteld wordt het ongerief voor de dieren zo veel mogelijk beperkt. De DEC is ervan overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.

Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project, zelfstandig leesbaar, beknopt en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

Op basis van de onder C genoemde overwegingen komt de DEC tot de volgende ethische afweging.

Met dit onderzoek worden belangrijke wetenschappelijke inzichten verworven in de moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan het ontstaan van feochromocytoom. Tevens worden goede tumormodellen voor feochromocytoom Cluster I ontwikkeld, waarmee in de toekomst de effectiviteit van nieuwe therapeutische strategieën getest kan worden. Het belang van meer inzicht in de moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan het ontstaan van feochromocytoom en het beschikbaar komen van goede tumormodellen acht de DEC substantieel, gezien de slechte prognose van deze zeldzame ziekte.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat alle muizen en 47% van de vissen matig ongerief en 53% van de vissen licht ongerief zullen ondervinden als gevolg van de erfelijke aanleg voor de ziekte of de onderhuidse transplantatie van tumorcellen in combinatie met de benodigde handelingen. De commissie is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren.

De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

E. Advies

1. Advies aan de CCD
 - ☐ De DEC adviseert de vergunning te verlenen
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

Radboud universitair medisch centrum
Concernstaf, sectie Kwaliteit en Veiligheid

Postbus 9101,
6500 HB Nijmegen

Postbus 9101,
6500 HB Nijmegen

KvK 41055629/4

Datum
2 november 2015

Onderwerp
Factuurinformatie Projectaanvraag

Geachte CCD,

Hierbij sturen wij u de administratieve gegevens behorend bij de ingediende projectaanvraag. Wij verzoeken u de factuur te versturen naar [REDACTED] als gemachtigde van de vergunninghouder. Hiervoor AUB het bij u bekend e-mailadres [REDACTED] en **bovenstaand postadres** [REDACTED] Postbus 9101, [REDACTED], 6500 HB Nijmegen) gebruiken.

Om verwerking door de financiële afdeling mogelijk te maken verzoeken wij **op de factuur** de volgende gegevens te vermelden:

Factuuradres:	Radboudumc 28 F&A crediteuren Postbus 9101 6500HB, Nijmegen
Kostenplaats en kostensoort:	040823-461220
CDL projectnummer:	2015-0098
Verantwoordelijk onderzoeker:	[REDACTED]

Bij voorbaat dank.

Met vriendelijke groeten

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD103002015301

Bijlagen

2

Datum 5 november 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 2 november 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002015301. 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. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

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: 10300
Naam instelling of organisatie: Radboud Universiteit Nijmegen
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 41055629
Straat en huisnummer: Geert Grooteplein 10
Postbus: 9101
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
IBAN: NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: UMC St Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: Professor
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: Postdoc
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

Gegevens gemachtigde

BSN: [REDACTED]
Naam: [REDACTED]
Postbus: 9101
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
Wat mag de gemachtigde doen?
☐ Een projectvergunning aanvragen
☐ Een wijziging op een verleende projectvergunning aanvragen
☐ Een melding doorgeven op een verleende projectvergunning
☐ Een bezwaarschrift indienen en daarover communiceren met de Centrale Commissie Dierproeven en alle andere handelingen verrichten die nodig zijn voor een goede afwikkeling van het bezwaarschrift
☒ Alle bovenstaande opties

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 december 2015
Geplande einddatum: 30 november 2020
Titel project: Towards treatment for pheochromocytoma
Titel niet-technische samenvatting: Op naar een behandeling voor bijniertkanker
Naam DEC: RU DEC
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen
E-mailadres DEC:

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 741,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: ☒ Projectvoorstel
☒ Beschrijving Dierproeven
☒ Niet-technische samenvatting
Overige bijlagen: ☒ Melding Machtiging
☒ DEC-advies

Ondertekening

Naam:
Functie:
Plaats: Nijmegen
Datum: 2 november 2015



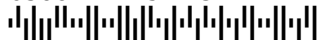
> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen



Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD103002015301

Bijlagen

2

Datum 5 november 2015

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 5 november 2015

Vervaldatum: 5 december 2015

Factuurnummer: 15700301

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002015301	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

Postbus 9101
6500 HB NIJMEGEN

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl
T 0900-28 000 28 (10 ct /min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015301

Uw referentie

Datum **03 DEC. 2015**

Bijlagen
1

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte heer/mevrouw,

Geachte [REDACTED]

Op 2 november 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Towards treatment for pheochromocytoma" met aanvraagnummer AVD103002015301. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op verzoek van de CCD heeft u de Niet technische Samenvatting aangepast. Deze hebben wij op 30 november 2015 ontvangen.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. De gestelde voorwaarden zijn algemene voorwaarden die worden gesteld bij meerjarige projecten zodat wordt voldaan aan hetgeen voortvloeit uit artikel 10 van de wet. U kunt met uw project "Towards treatment for pheochromocytoma" starten. De vergunning wordt afgegeven van 4 december 2015 tot en met 30 november 2020. Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU DEC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 2 november 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie over, met als toevoeging de voorwaarde dat eventuele go/no go beslissingen worden genomen met instemming van de IvD.

Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

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 20401, 2500 EK 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 gegevens 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. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisend belang.

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 aanvrager valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



mr. drs. H.M. van der Gaag-Halbertsma
plv Algemeen Secretaris

Dit besluit is genomen met inachtneming van het Besluit mandaat, volmacht en machtiging van de Centrale Commissie Dierproeven CCD 2014 zoals de Centrale Commissie Dierproeven heeft vastgesteld op 19 december 2014, ref 2014-04 en is gepubliceerd in de Staatscourant van 2 januari 2015, Nr. 163

Bijlagen

- Vergunning

- Hiervan deel uitmakend:
- DEC-advies
 - Weergave wet- en regelgeving



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Radboud Universiteit Nijmegen
Adres: Postbus 9101
Postcode en woonplaats: 6500 HB Nijmegen
Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 4 december 2015 tot en met 30 november 2020, voor het project "Towards treatment for pheochromocytoma" met aanvraagnummer AVD103002015301, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Professor. Voor de uitvoering van het project is Instantie voor Dierenwelzijn verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 2 november 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 2 november 2015;
 - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 30 november 2015;
 - c. Advies van Dierexperimenten commissie dd 2 november 2015, ontvangen op 2 november 2015

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Analyzing the zebrafish phenotype of homozygous whole animal mutants	Zebravissen (Danio rerio) de dieren worden genetisch gemodificeerd	17600	Matig / Moderate
Examining the interrenal phenotype of the tissuespecific mutants	Zebravissen (Danio rerio) de dieren worden genetisch gemodificeerd	1900	Matig / Moderate
Transplanting cells in mice	Muizen (Mus musculus) / NOD/SCID, C57BL/6	90	Matig / Moderate

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wet zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat eventuele go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.

In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is 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. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

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. Uit artikel 10b 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 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft 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 van Economische Zaken 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 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 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 blijven 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 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 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 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.