

	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
	NTS2015302								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Niet-technische samenvatting	x							
3	Projectvoorstel				x			x	
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x			x	
5	DEC-advies				x		x	x	
6	Factuurinformatie				x		x	x	
7	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
8	Mail verzoek aanvullende informatie 11-11-2015				x		x	x	
9	Verzoek aanvullende informatie				x		x	x	
10	Mail verzoek aanvullende informatie DEC 12-11-'15				x		x	x	
11	Reactie aanvullende informatie				x		x	x	
12	Mail reactie aanvulling DEC 13-11-2015				x		x	x	
13	Advies CCD		x						x
14	Beschikking en vergunning				x		x	x	
15	Mail beschikking en vergunning 16-12-2015				x		x	x	
16	Mail terugkoppeling DEC 17-12-2015				x		x	x	

04 NOV. 2015



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

☒ Ja > Vul uw deelnemernummer in 10300 1302.
☐ Nee > U kunt geen aanvraag doen

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

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.
Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.

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.

(Titel) Naam en voorletters [REDACTED] ☒ Dhr. ☐ Mw.
Functie Postdoc
Afdeling [REDACTED]
Telefoonnummer [REDACTED]
E-mailadres [REDACTED]

- 1.5 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters [REDACTED] ☐ Dhr. ☒ Mw.
Functie [REDACTED]
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 0 1 _ 1 2 _ 2 0 1 7
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Phenotypic assessment of motor control, anxiety and social behavior in a transgenic rat model for Huntington's disease
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Onderzoek naar het effect van genetische veranderingen in ratten op de ontwikkeling van Huntington's disease
- 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.
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.
☐ Via een eenmalige incasso
☒ Na ontvangst van de factuur

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:

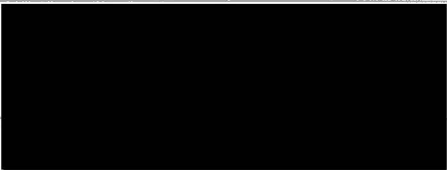
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan 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 

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.	Phenotypic assessment of motor control, anxiety and social behavior in a transgenic rat model for Huntington's Disease

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.

Huntington's disease (HD) is a devastating inherited neurodegenerative disease characterized by progressive motor, cognitive, and psychiatric symptoms without any cure to slow down or stop the progress of the disease. It is therefore crucial to identify the arise of each class of symptoms ('phenotypes') before the onset of the full-blown disorder and how they predict the motor deficit, because early symptoms may be targeted by early interventions slowing down the disease process. Hence, our research question is: which classes of symptoms develop sequentially over time preceding the manifestation of HD in a translational rat model?

Summary

Neuropsychiatric and neurological disorders constitute a major health problem in Europe, and their impact on public health and society is increasing with the aging of the population. According to the Strategic Research Agenda of the European Platform on Innovative Medicines (IMI) (<http://www.imieurope.org>) one of the most important bottlenecks for finding more effective drugs for brain disorders is the development of model systems that translate to human pathology and are predictive of clinical efficacy. To address this bottleneck, new transgenic rat models for these disorders require phenotyping.

Behavioural phenotyping of rats provides an advantage over mice given their elaborative behavioural repertoire. More specifically, rat models have made substantial contributions to our understanding of biological function and behavior. Large numbers of rat disease models exist and have successfully proven their utility for modeling the human condition (von Hörsten et al., 2003; Abbott, 2004). Although behaviour can be studied with some restrictions in mice, the current scientific knowledge concerning the complexity of learning and memory, as well as the multiplicity of brain systems supporting it, come from behavioural research using rats (Report of the NIH Rat Model Priority Meeting, 1999). Comparative analyses of movements in rats and primates show homology of many motor patterns across species. Advances have been made in identifying rat equivalents of akinesia, tremor, postural deficits and dyskinesia, which are relevant to neurological disorders (Cenci et al. 2002). Other practical advantages of rats include their larger size, which facilitates direct invasive procedures, such as blood and cerebrospinal fluid collections, repetitive physiological measurements and surgical manipulations [which could be scope of follow-up studies].

Whereas understanding disorder symptoms is important, even more important is the understanding of phenotypes that precede the full-blown disorder symptoms and their stability during the course of the disorder, so that possible therapies can be more effective in preventing

further development of these disorders. This insight is mostly lacking in clinical studies, because prospective longitudinal studies are very time consuming and costly. The relatively short life span of experimental rodents allows us to overcome this limitation of clinical (human) studies. One particularly relevant neurological disorder in the framework of the foregoing concerns Huntington disease (HD). HD is an autosomal dominantly inherited neurodegenerative disease with a prevalence of 6 per 100,000 in Europe and North America (Pringsheim et al. 2012). Development of HD is dependent on a single mutation that results in the extension of the CAG repeat sequence present in the gene for the Huntingtin protein (The Huntington's disease collaborative research group, 1993). Huntington's Disease symptoms (more details below) comprise adult-onset personality changes, generalized motor dysfunctions, and cognitive decline (Zuccato et al. 2010). The peak age of adult-onset HD is between 35 and 50 years. Huntington's disease progresses over 15-20 years. Characteristic symptoms reflect a triad of motor, cognitive, and psychiatric manifestations of the disease. The onset of disease is currently defined as the point at which characteristic motor signs develop; this is when a patient moves from being a "premanifest gene carrier" to having "manifest" disease (Novak et al. 2010). On the other hand, HD patients can develop cognitive or psychiatric symptoms (or both) during the prodromal ("premanifest") period, often many years before any motor signs are seen (Tabrizi et al. 2009, Paulsen et al. 2008). **Due to the importance of the identification of the arise of each class of symptoms, the goal of this project will be the detailed investigation of the phenotypes preceding the onset of HD, modeled by the BACHD transgenic rat model.**

Huntington's Disease

Huntington's disease (HD) is a dominantly inherited neurodegenerative disorder that is caused by an unstable expansion of a CAG repeat within the coding region of the IT-15 gene (HD Collaborative Research Group, 1993). It is an adult-onset, chronic and progressive neurodegenerative disease and clinically characterized by abnormal choreic involuntary movements and by psychiatric, psychological and intellectual disorders, and radiologically characterized by striatal atrophy of variable degree. The worldwide prevalence of HD is 5–10 cases per 100.000 persons but varies greatly geographically as a result of ethnicity, local migration and past immigration patterns. HD is an hereditary, progressive, degenerative and often fatal neurodegenerative disorder and there is no cure and strategies available to prevent or reduce the incidence of this disorder. In the early stages, HD is classically associated with progressive emotional, psychiatric, and cognitive disturbances (Bates et al. 2002). Commonly reported symptoms in HD include progressive weight loss, alterations in sexual behavior, and disturbances in the wake-sleep cycle that occur very early in the course of the disease and may partly be explained by hypothalamic dysfunction (Politis et al. 2008). In the later stages, HD is characterized by motor signs, progressive dementia, or gradual impairment of the mental processes involved in comprehension, reasoning, judgment, and memory (Bates et al. 2002, Rosenblatt et al. 2007). Due to increasingly severe dementia and progressive motor dysfunction, patients with advanced HD may become unable to walk, have poor dietary intake, eventually cease to talk, and become unable to care for themselves, therefore potentially requiring long-term institutional care. Life-threatening complications may result from injuries related to serious falls, poor nutrition, infection, choking, and inflammation. Most HD patients eventually succumb due to aspiration pneumonia because of swallowing difficulties (Bates et al. 2002). The majority of therapeutics currently used in HD are designed to ameliorate the primary symptomatology of the HD condition itself (psychiatric agents for the control of behavioral symptoms, motor sedatives, cognitive enhancers, and neuroprotective agents) and thus to improve the quality of life of the patients. Since HD is a progressive and degenerative disorder we aim at identifying the phenotypes preceding the onset of HD, and investigating their stability during the course of the disease.

The urgency of a good rodent model of Huntington's Disease

Since the discovery of the HTT mutation 20 years ago, close to 10,000 papers have been published on HD, approximately half of which relate to attempts to model various aspects of the disease. The organisms used for this endeavour have included worms (*Caenorhabditis elegans*), fruitflies (*Drosophila melanogaster*), mice, rats, sheep and, more recently, pigs and monkeys. The findings from animal model studies have helped to elucidate important pathways that are disrupted in HD and have provided important insights into the pathogenesis of this disease. These developments have

been accompanied by the identification of several therapeutic candidates and novel approaches to therapy (Ross and Tabrizi 2011). Indeed, over 15 clinical trials have been conducted in patients with HD since the discovery of the HTT mutation (Walker 2007, Mestre et al. 2009). Despite the considerable progress in our understanding of the disease, an effective treatment that either prevents or slows the pace of HD remains out of reach. The slow rate of progression of HD often necessitates lengthy and therefore costly clinical trials. In addition, the number of patients with HD that are available to participate in such trials is limited, which means that a relatively small number of compounds can be tested at any one time. Thus, animal models will continue to have a role not only as a filter for test compounds before the initiation of human clinical trials but also as a means for identifying candidate compounds with therapeutic promise. The translational potential of an animal model of disease may be gauged on the basis of its construct, face and predictive validity (Puoladi et al 2013). Rodent models of HD are versatile, not least because there are established batteries of tests available for them that allow assessment of motor, cognitive and psychiatric-like features of the disease. The high level of conservation of genes between rodents and humans makes interrogation of specific molecular targets more feasible than it is in other animal models. Moreover, the availability of a vast collection of tools for rodent studies allows the investigation of several behavior domains using different well-established paradigms. Thus, the purpose of this project is the detection of the first core symptoms of HD and the monitoring of its development by assessing different aspects of the clinical phenotype of this transgenic rat model.

The BACHD rat model

The [REDACTED] has recently generated a new transgenic rat model of HD, the BACHD rat. This rat model is of particular interest since it expresses the full length human mutant huntingtin (fl-mhtt) with 97 CAG-CAA mix repeats under control of the human HD promoter gene (Yu-Taeger et al. 2012). BACs (Bacterial Artificial Chromosomes), containing human genomic DNA spanning the full-length HTT gene with 97 CAG/CAA repeats and including all regulatory elements (Gray et al, 2008), were microinjected into oocytes of Sprague Dawley rats. The BACHD rat model is particularly relevant since it presents motor impairments and neuropathological phenotypes reminiscent of symptoms seen among HD patients (Yu-Taeger et al. 2012, Abada et al. 2013a, Abada et al. 2013b). The life span of the BACHD rat model (18 months) allows the investigation and the assessment of the symptoms preceding the full-blown disease. Therefore, we will be able to define precise time windows for future interventions.

Validity of the current transgenic model

In principle, the relevance of a given animal model of human disease is often judged on the basis of three broad measures of validity: the animal model's construct validity, face validity and predictive validity.

Construct validity: pertains to how closely the animal model reproduces the pathogenic lesion that underlies the disease in humans. For genetic diseases such Huntington's Disease, a model with high construct validity would reproduce the human mutation in the context of the full-length human gene under the control of the gene's endogenous promoter. In the context of Huntington's disease (HD), the construct validity of models expressing full-length human mutant huntingtin (HTT) (the genomic sequence or cDNA) is greater than those expressing full-length mouse mutant Htt (Puoladi et al. 2013). Furthermore, models in which mutant HTT or a fragment thereof is under the control of the HTT promoter show greater construct validity than models in which the same coding sequence is under the control of a non-HTT promoter. This is precisely the case of the BACHD rat model which contains human genomic DNA spanning the full-length HTT gene with 97 CAG/CAA repeats, under the control of the HTT human promoter and including all regulatory elements (Yu-Taeger et al. 2012)

Face validity: relates to the extent to which the animal model reproduces the symptoms and phenotypes associated with the human disease. For HD, animals with high face validity would reproduce progressive motor and cognitive deficits as well as psychiatric-like disturbances (Puoladi et al. 2013). Previous studies have shown that BACHD rats present motor and cognitive impairments reminiscent of symptoms seen among HD patients (Yu-Taeger et al. 2012, Abada et al. 2013a, Abada et al. 2013b). Moreover, neuroanatomically and histologically, the models would display selective, age-dependent striatal and cortical neuronal loss and atrophy, nuclear inclusions and neuropile aggregates (Puoladi et al. 2013). Neuropathologically, the distribution of neuropil aggregates and nuclear accumulation of N-terminal mutant huntingtin in BACHD rats is similar to the

observations in human HD brains (Yu-Taeger et al. 2012). Aggregates occur more frequently in the cortex than in the striatum and neuropil aggregates appear earlier than mutant htt accumulation in the nucleus. Furthermore, an imbalance in the striatal striosome and matrix compartments has been detected in early stages of the disease. In addition, reduced dopamine receptor binding was detectable by in vivo imaging. Predictive validity: it is judged based on how closely improvements in response to treatment in the animal model parallel, or predict, improvements in patients. For treatable conditions, the predictive validity of an animal model may be tested, but for diseases such as HD that are without an effective treatment, assessment of the predictive validity of an animal model is currently impossible (Puoladi et al. 2013).

As mentioned before, previous studies have shown that BACHD rats present motor impairments and neuropathological phenotypes reminiscent of symptoms seen among HD patients (Yu-Taeger et al. 2012, Abada et al. 2013a, Abada et al. 2013b)

Furthermore, previous unpublished data from our [REDACTED] have been shown that BACHD rats present severe HD-like phenotypes starting from the age of 18 months. These findings derive from blood test results that provide evidence of mitochondrial dysfunction (Eckmann et al. 2014) and the onset of neurodegeneration. Due to the high incidence of tumors and consequent mortality of both WT and BACHD rats, however, few studies have been conducted in animals at this advanced age. Previous experiments have been already performed in this transgenic rat model, but they are lacking of information about phenotypes preceding the onset of severe symptoms in BACHD rats. Additionally, the studies performed so far did not cover several behavioural domains (social behavior, sensori-motor function) but were mainly focused on coordination, gait and cognition (Yu-Taeger et al. 2012, Abada et al. 2013a, Abada et al. 2013b). The investigation of the previously mentioned domains is necessary for the early detection of the first core symptoms of the disease and the monitoring of its development so that possible therapies can be more effective in preventing further development of neurodegeneration. Thus, the core of this project will be the detailed investigation of the phenotypes preceding the onset of HD, modeled by the BACHD rat model. In order to do that we will combine classical behavioural paradigms with novel automated and sophisticated methods (namely the Phenotypers) which allow high-throughput testing.

Content of the project and funding: The content of this project has been approved and funded by [REDACTED]

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 aim of this project is to phenotype this rat model for Huntington's Disease in order to define behavioural features that precede the manifestation of the full-blown disorder symptoms. We anticipate that this will provide a fundament for understanding disorder progress and the design of timely interventions.

Rats will be characterized across behavioural domains (at specific developmental time windows):

- **Social behaviour**

- Emotion (anxiety and depression)
- (Sensori-) Motor function

Our lab is experienced in the investigation of the previously mentioned domains in rats, and in addition, also in the use of methods to obtain molecular markers and interpret and correlate the data to the behavioural parameters; thus, molecular measurements are also included in this project to optimize the translational value of the results. Moreover, novel automated paradigms and analysis methods for rats will be developed and validated, which also is part of our expertise by means of close cooperation with manufacturers and participation in EU-funded projects. Our experience with behavioural and molecular measurements in rats, together with the availability of the required equipment and the expertise of how to apply these provides high feasibility of this project.

3.3 Relevance

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

The World Health Organization estimated in 2006 that neurological disorders and their direct consequences affect as many as one billion people worldwide. Neurological disorders included in the neuropsychiatric category contribute to 2% of the global burden of disease, while cerebrovascular disease and some of the neuroinfections (poliomyelitis, tetanus, meningitis and Japanese encephalitis) contribute to 4.3% of the global burden of disease in 2005. Thus neurological disorders constitute 6.3% of the global burden of disease. Furthermore, neurological disorders are an important cause of mortality and constitute 12% of total deaths globally. In particular, Huntington's Disease (HD) is a progressive, degenerative, genetic disease. The worldwide prevalence of HD is 5–10 cases per 100.000 persons but varies greatly geographically as a result of ethnicity, local migration and past immigration patterns. HD symptoms comprise adult-onset personality changes, generalized motor dysfunctions, and cognitive decline. The peak age of adult-onset HD is between 35 and 50 years. A small percentage of patients (10%) develop symptoms before age 20. Increased focus on research strategies, prevention, and care is therefore necessary to reduce the burden associated with HD. Animal models of neurological disorders are essential for the assessment of new therapeutic options. Here we focus on Huntington's Disease because of the associated burden for the patient and society, and our research track record and funding.

3.4 Research Strategy

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

This project is aimed to phenotype an existing transgenic rat models for Huntington Disease. The overarching aim is to elucidate the phenotypes that precede the full-blown manifestation of the disorder and their stability during the course of the disorder. We aim to extend previous findings with earlier and later time points of measurement with age-adjusted tests and we aim to use more sophisticated behavioural methods to assess

phenotypes preceding and during manifestation of the full-blown disorder symptoms. Regarding the sophisticated behavioural methods we will implement the Phenotyper, a homecage-like observation cage for rats that is completely optimized for video tracking and can be customized with additional automated tools to subject the animals to behavioural tests and training.

We will phenotype rats across behavioural domains at specific developmental time windows, as specified below:

- Social behaviour
- Emotion (anxiety and depression)
- (Sensory-) Motor function

Additionally, in order to reveal the brain correlates of the behavioural phenotypes identified in the behavioural tests rats will be killed, either by decapitation or perfusion. Decapitation will be applied when fresh brain material is needed, e.g. for the assessment of protein or mRNA levels, or for neurochemical assessments. Perfusion will be applied when fixed brain material is needed, for immunohistochemistry.

In the 17 years since the discovery of the HD gene, a large number of basic research studies has highlighted that multiple molecular and biochemical pathways ultimately lead to a complex disease phenotype. Today, the current status of HD research looks promising. The development of strategies to counteract HD at its primary source, including RNAi and intrabodies, is now well underway. Multiple downstream pathways and molecules are emerging as suitable therapeutic targets (Zuccato et al. 2010) Modulating the cellular stress response, correcting the BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) deficiency associated with HD, and targeting specific proteins are some of the many encouraging candidate pathways that may yield effective treatments. Furthermore, systematic, unbiased approaches to identify HD modifiers promise to further enrich the opportunities for therapeutic intervention. Despite significant achievements in the understanding of the pathogenesis of HD, more efforts are needed to clearly identify the abnormalities/pathways/targets that are most critical for neurodegeneration and to distinguish them from the ones that are secondary responses or simply related epiphenomena. Those abnormalities associated with normal huntingtin function and possibly influenced by the CAG expansion seem to have greater appeal. Some of the activities altered by the mutation might specifically occur in adulthood and in acute phases of the disease or be already present at young ages, leading to subtle phenotypes. Overall, this classification is important to discriminate key targets specific to HD from those for more generic neurodegeneration, and to exclude the nonessential ones. Revealing disease trigger processes will provide potential routes to HD-specific therapeutics and allow prioritizing the growing portfolio of therapeutic candidates. The identification of the timing of appearance of the different dysfunctions (early and late events) and of the mechanisms that explain the selective neuronal vulnerability, in combination with more precise guidelines to translate the results of animal studies into the clinic will provide new hopes for a cure. In addition, new biomarkers to follow HD progression and markers to monitor drugs' engagement in a given molecular mechanism will hopefully constitute new tools for moving faster into the clinic.

Therefore, within this project the BACHD rat model will be behaviorally characterized using a unique integrated system based on video tracking and operant testing in a home cage situation. In addition, innovative behavioural paradigms will be developed to test for the social and emotional impairments (social interaction and anxiety) typically seen in HD (Zuehlke et al., 2007; Vaccarino et al., 2011). These findings will be extended with the assessment of (sensory-)motor function. Overall, this will enable the detection of early onset of specific symptoms and provide read-out parameters for future pre-clinical studies applying novel substances for the treatment of HD.

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.

We will phenotype rats across behavioural domains at specific developmental time windows, as specified below:

- Social behaviour: Social Interaction and ultrasonic vocalizations in the Phenotyper: P28-50 (corresponding to adolescence), P65-95 (corresponding to early adulthood), 3-7 months (middle adulthood), 8-12 months (late adulthood).
- Emotion (anxiety and depression): elevated plus maze, light/dark box test, Phenotyper: Light Spot Test, Discriminative Avoidance Task (DAT): P28-50 (corresponding to adolescence), P65-95 (corresponding to early adulthood), 3-7 months (middle adulthood), 8-12 months (late adulthood).
- (Sensori-) Motor function: Holding bar, grip strength test, static rod, Phenotyper: Home cage screening & circadian rhythm: P65-95 (corresponding to early adulthood), 3-7 months (middle adulthood), 8-12 months (late adulthood).

The rats are divided into 2 groups (wild type and transgenic animals) but for the experimental purposes they are going to be divided into three batches. Each of these 3 batches will be subjected to different tests as described below. Overall, all animals follow the schedule below:

• Group A : wild type rats.

• Group B : BACHD transgenic rats.

• **Batch 1:** It consists of 24 control (12 male and 12 female) animals and 24 transgenic (12 male and 12 female). This batch is going to be:

o Individually tested for anxiety and depression using the following paradigms and at the following ages: elevated plus maze, light/dark box test, Phenotyper: Light Spot Test, Discriminative Avoidance Task (DAT): P28-50 (corresponding to adolescence), P65-95 (corresponding to early adulthood), 3-7 months (middle adulthood), 8-12 months (late adulthood).

• **Batch 2:** It consists of 48 control (24 male and 24 female) animals and 48 transgenic (24 male and 24 female). This batch is going to be:

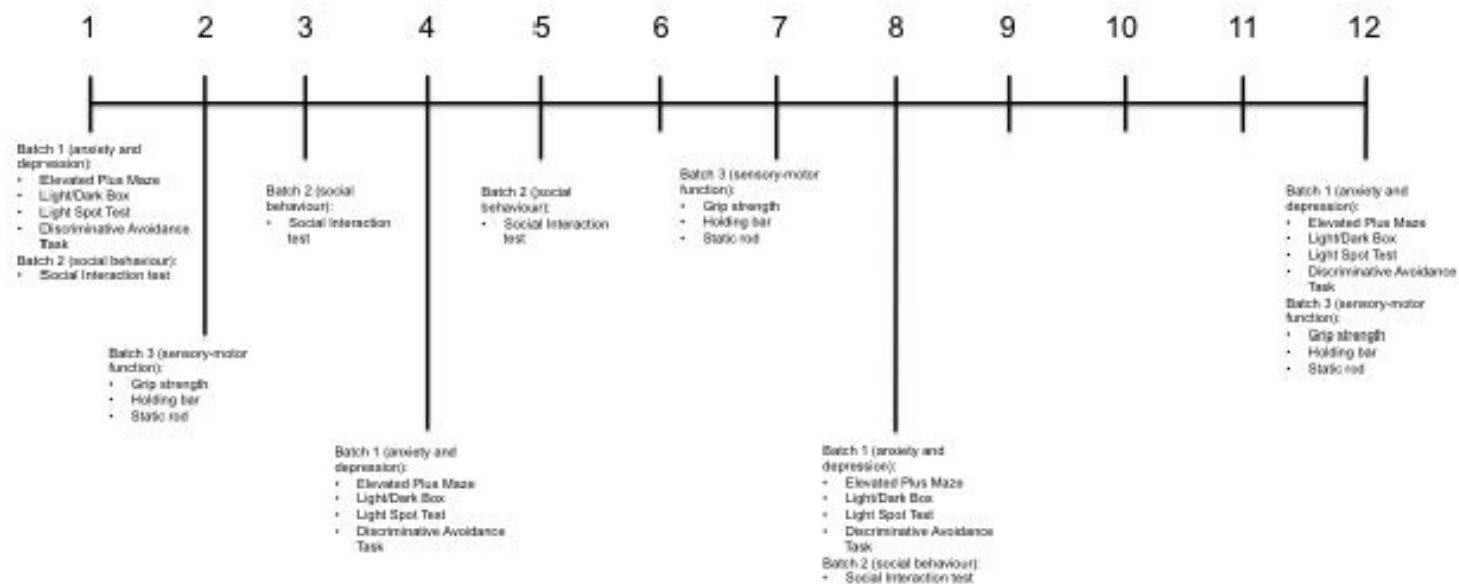
o Tested in group of two rats for social behaviour using the following paradigms and at the following ages: social Interaction test and ultrasonic vocalizations in the Phenotyper: P28-50 (corresponding to adolescence), P65-95 (corresponding to early adulthood), 3-7 months (middle adulthood), 8-12 months (late adulthood).

• **Batch 3:** It consists of 24 control (12 male and 12 female) animals and 24 transgenic (12 male and 12 female). This batch is going to be:

o Individually tested for (Sensori-) Motor function using the following paradigms and at the following ages: holding bar, grip strength test, static rod, Phenotyper: Home cage screening & circadian rhythm: P65-95 (corresponding to early adulthood), 3-7 months (middle adulthood), 8-12 months (late adulthood).

We will employ longitudinal testing, followed at the end by decapitation/perfusion approaches; as specified above, a separate batch of animals will be used for each behavioural domain.

months of age



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

This project aims to phenotype a transgenic rat model for Huntington's Disease across developmental time windows in order to assess phenotypes preceding and during the full-blown manifestation of disorder symptoms.

We use 'standard' tests, automated behavioural systems such as the PhenoTyper to assess behaviour across domains (social behaviour (automated systems); emotion (standard tests + automated systems), motor coordination (standard tests and automated systems)). Tests are adjusted to the capabilities of the rats at each developmental time window. Additionally, we will assess the brain correlates of the behavioural phenotypes by post-mortem analyses.

We are therefore prioritizing the completeness of a longitudinal study rather than the investigation of the molecular markers at different ages, which could be part of future projects. We aim at detecting interesting and useful phenotypic traits, which might be age- and/or genotype-specific and only clearly identified by an integrated and comprehensive analysis. That's the reason why we are going to combine classical and automated paradigms. The behavioral quality of our study will be mostly possible thanks to the home-cage nature of the automated testing, which virtually introduces no artifacts induced by handling and novelty-related stress. Clearly, only longitudinal individualized screening provides the highest likeliness to reliably characterize a certain model of disease (Crawley and Paylor 1997) such Huntington's Disease. As a matter of fact, the general requirement of repeated testing is more easily achieved with a higher level of standardization, by using automated technology.

Thus, these combined experimental approaches will provide the opportunity to investigate and validate new interventions and therapies in the future. There are no go/no go points, since measurements are not dependent on each other; the absence of a phenotype at a certain developmental stage does not mean that the phenotype will be absent. A specific phenotype not present at early time point can be caught up later in development.

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	Breeding and Behavioural phenotyping and molecular correlates

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 Breeding and Behavioural phenotyping and molecular correlates

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.

BACHD transgenic rats (heterozygous) and wild type (WT) littermates will be bred on a Sprague Dawley background and then used for the experiments described below. The genetically altered animals are expected to have a likely harmful phenotype so the breeding will be considered with discomfort. After weaning, WT and transgenic animals will be divided in three batches, and each batch will be tested as described below. We will then phenotype rats across behavioural domains at specific developmental time windows, as specified below. The primary outcome parameters as defined below fit within the behavioural domains as specified in the project proposal. Thus, the parameters have been chosen such that provide indices of changes in social behaviour, emotion and (sensori)-motor function. Huntington's Disease patients show symptoms that can be translated in changes in these behavioural domains that can be studied in rodent models. Besides generating validation-data by 'standard' tests, experiments are designed using automated behavioural testing equipment such as the PhenoTyper. This is done to be able to correlate the variables and develop an automated screening assay to monitor the onset and development of HD. In the PhenoTyper, behaviour is measured automatically, and thus objectively and tirelessly, observed generating a wide range of parameters per individual animal and, in the case of the social interaction study, for each couple of animals. By monitoring the spontaneous (i.e.undisturbed) behaviour, we aim to detect early onset of symptoms and subtle changes in this rat model for Huntington Disease. Moreover, in these studies the animals are monitored for a long period. As a result it becomes possible to assess long-term phenotypic characteristics. The main focus of these PhenoTyper studies is on establishing relevant parameters for this HD rat model, and thereby to accelerate new therapies.

Below we describe the primary outcome parameters per behavioural domain, and at what developmental stage we will measure these parameters:

Social behaviour: Social Interaction and ultrasonic vocalizations in the PhenoTyper: P28-50 (corresponding to adolescence), P65-95 (corresponding to early adulthood), 3-7 months (middle adulthood), 8-12 months (late adulthood).

Between the different symptoms, disrupted social behavior is significantly present in Huntington's Disease patients (Novak et al. 2010). Thus, in order to overcome social problems, non-drug based management of HD is usually applied, involving carers to help at home, residential or nursing home care and day centers to maintain social interactions (Novak et al. 2010). Social interactions are a fundamental and adaptive component of the biology of numerous species. Social recognition is critical for the structure and stability of the networks and relationships that define societies. For animals, such as rodents, recognition of conspecifics may be important for maintaining social hierarchy and for mate choice. To assess sociability in animal models, several behavioral tests have been developed (Kaidanovich-Beilin et al. 2011; Pietropaolo et al. 2011). Integrative research using animal models and appropriate tests for social behavior may lead to the development of improved treatments for social psychopathologies. Therefore, in order to find any elements of impaired social behavior, or social interest per se due to the disease, the PhenoTyper-9000 is used to monitor social interactions and investigate the influence of short-term social separation (1hr >24hrs) with simultaneous recordings of ultrasonic vocalizations.

Longitudinal approach:

1. BACHD transgenic and WT; P28-50 > P65-95 > 3-7 months > 8-12 months; Social Interaction and ultrasonic vocalizations in the Phenotyper > decapitation/perfusion*

Emotion (anxiety and depression): elevated plus maze, light/dark box test, Phenotyper: Light Spot Test, Discriminative Avoidance Task (DAT): P28-50 (corresponding to adolescence), P65-95 (corresponding to early adulthood), 3-7 months (middle adulthood), 8-12 months (late adulthood).

Although the onset of HD is clinically diagnosed on the basis of motor performance, symptoms of psychiatric disturbances such as anxiety, irritability, impulsivity, aggression, apathy and depressed mood are prevalent among pre-diagnostic HD gene carriers and patients with HD (Rosenblatt 2007, Folstein et al. 1983). As many as 40–50% of patients with HD are found to experience depression, and depressed mood may precede disease onset by 4–10 years (Folstein et al. 1983, Pflanz et al. 1991, Kirkwood et al. 2001, Duff et al. 2007). It is therefore important to recognize psychiatric symptoms in HD so that symptomatic treatment can be offered. This may be difficult later in the disease because diagnoses may be obscured by other features of the disease; depression, for instance, may be difficult to detect in a patient who has altered facial expressions and tone of voice. Conversely, metabolic symptoms such as weight loss and sleep disturbance may be wrongly attributed to depression. For these reasons it is of crucial importance to define when exactly anxiety and depression appear in the course of HD and define time windows for future interventions. This battery of tests will be used since these are validated and broadly used paradigms to assess depression and anxiety in rodent models (Aarts et al. 2015; de Heer et al. 2008; Bourin et al. 2003; Walf et al. 2007). In addition, classical paradigms will be combined with automated tasks assessed in the Phenotyper.

Longitudinal approach:

2. BACHD transgenic and WT; P28-50 > P65-95 > 3-7 months > 8-12 months; [elevated plus maze, light/dark box test]; [Phenotyper: Light Spot Test, Discriminative Avoidance Task (DAT)] > decapitation/perfusion*.

(Sensory-) Motor function: Grip strength test, holding bar, static rod, prepulse inhibition, Phenotyper: Home cage screening & circadian rhythm: P65-95 (corresponding to early adulthood), 3-7 months (middle adulthood), 8-12 months (late adulthood).

Sensory-motor functions are closely dependent on the integrity of the brain and nervous system. Disturbances in motor function are the most apparent signs of HD. Chorea, a dance-like involuntary movement, is the major motor symptom in HD and is seen in over 90% of patients with this disorder (Hayden 1981, Folstein et al. 1986). Bradykinesia, a slowness in the performance of voluntary movements, and rigidity, a resistance to passive joint movements, often develop as the disease progresses and become dominant in the late stages of the disease (Young et al. 1986, Thompson et al. 1988). Similarly, dystonia, involuntary muscle contractions that can cause twisting and abnormal postures, is a feature of advanced stages of disease (Young et al. 1986, Bittenbender et al. 1962). Other signs of motor deficits are early impairment of voluntary motor function, difficulties with fine motor control and gait disturbances. Dysarthria, speech abnormalities as a result of dysfunction of the motor component of speech production, is present early in the illness and becomes more pronounced with disease progression. Finally, difficulties in swallowing, termed dysphagia, develop in advanced stages of HD and may lead to choking. Standardized tests have been developed to assess these functions in rodents (Aartsma-Rus et al. 2014; Deacon et al. 2013). Indeed, (sensory-)motor function consists of several parameters that can be assessed with validated

paradigms measuring muscle strength, fine motor control, locomotor and general activity and circadian rhythm. The combination of classical and Phenotyper tests will shed light on the different sensorimotor impairments of the different rat models.

Longitudinal approach:

3. BACHD transgenic and WT; P65-95 > 3-7 months > 8-12 months; [Grip strength test, holding bar, static rod] and [Phenotyper: Home cage screening & circadian rhythm] > decapitation/perfusion*.

After completion of the behavioural test animals will be sacrificed either by decapitation or by perfusing them in order to evaluate the molecular correlates of the behaviour paradigms. Like mentioned before, we are giving priority to the completeness of a longitudinal study rather than to the investigation of the molecular markers at different ages, which would lead to sacrifice several animals during the course of the study. The detection of some interesting and subtle phenotypic traits could occur at late developmental stages and only longitudinal individualized screening provides the highest likeliness to reliably identify subtle phenotypes. Our main interest is the assessment and quantification of serotonin receptors and transporters as well as markers of neuroplasticity and neuronal degradation. The relationship between serotonin and anxiety, depression and social behaviour has been extensively studied (Graeff et al. 1996, Baldwin et al. 1995, Deakin et al. 1998, Ago et al. 2014, Yoshimi et al. 2014) but the precise choice of the markers will be defined during the behavioural testing, based on the outcome of the different behavioural tests.

*In order to reveal the brain correlates of the behavioural phenotypes identified in the behavioural tests rats will be killed, either by decapitation or perfusion. Decapitation will be applied when fresh brain material is needed, e.g. for the assessment of protein or mRNA levels, or for neurochemical assessments. Perfusion will be applied when fixed brain material is needed, for immunohistochemistry. The choice of the method will be based on the results obtained from the behavioral tests.

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

BACHD transgenic rats (heterozygous) and wild type (WT) littermates will be bred in the facility and then tested across developmental stages. For breeding, BACHD males will be paired with wild type females under the housing conditions normally in use at the facility. In the experimental approach the behavioural tests and the time windows at which the animals will be tested are defined, specifying the tests performed by each batch of animals. Below we provide details of the behavioural tests and the decapitation/perfusion.

Batch 1: Anxiety and Depression

Light spot test: the light spot test is a novel, automated assay for anxiety-related high-throughput testing of rodents in an automated home-cage environment (Aarts et al. 2015). After a period of at least 3 days that the test animal is housed in the PhenoTyper* under reversed daylight, during which several parameters representing novelty and habituation are measured, a focused light beam is projected on the feeding area during the first three hours of the dark phase, i.e. the active period of the animal. This induces an approach-avoidance dilemma for the animal: the choice between

approaching the feeder and avoiding the aversive bright light. During this 3-hour time window the animal has the opportunity to display a large variety of responses: from seeking shelter, exploring the area around the illuminated zone to ignoring the light and eating. The animal's behaviour will be continuously recorded by video tracking software (at P28-50 (corresponding to adolescence), P65-95 (corresponding to early adulthood), 3-7 months (middle adulthood), 8-12 months (late adulthood)).

DAT (Discriminative avoidance task): the DAT is a useful test to investigate the critical relationship between learning/memory and anxiety (de Heer et al. 2008). During habituation to the Phenotyper* (day 1-4), the animals are observed and data are continuously collected using Ethovision. At day 4, for each animal it is determined which of the two entrances of the shelter is preferred. After that, every time the animal gets in the shelter using the preferred entrance a light is switched on and it remains on as long as the animal stays in the shelter. As soon as the animal leaves the shelter the light goes off. When the animal uses the other entrance of the shelter no light is presented. The test lasts around 4 days, dependent on the acquisition of the individual animals. When and if the animals show a clear shift of preference (i.e. > 70% use of the non-lighted entrance), a reversal protocol is started to measure flexibility of learning (at P28-50 (corresponding to adolescence), P65-95 (corresponding to early adulthood), 3-7 months (middle adulthood), 8-12 months (late adulthood)).

Light/Dark box: the light/dark test is an useful test to predict anxiolytic-like or anxiogenic-like activity in rodents (Bourin et al. 2003). It is based on the innate aversion of rodents to brightly illuminated areas and on the spontaneous exploratory behaviour of rodents in response to mild stressors, that is, novel environment and light. The test apparatus consists of a small dark safe compartment (one third) and a large illuminated aversive compartment (two thirds). Transitions have been reported to be an index of activity-exploration because of habituation over time, and the time spent in each compartment to be a reflection of aversion (at P28-50 (corresponding to adolescence), P65-95 (corresponding to early adulthood), 3-7 months (middle adulthood), 8-12 months (late adulthood)).

Elevated plus maze: The elevated plus maze is a well-characterized behavioral paradigm to define brain regions and mechanisms underlying anxiety-related behavior (Walf et al. 2007). The maze contains two open arms and two closed arms. The test relies upon the animal's natural tendency to stay in enclosed spaces and their avoidance for open spaces and heights – anxious animals will spend more time in the closed arms than less anxious animals and show a longer latency to first enter the centre area or open arms (at P28-50 (corresponding to adolescence), P65-95 (corresponding to early adulthood), 3-7 months (middle adulthood), 8-12 months (late adulthood)).

Batch 2: Social behaviour

Social testing & Ultrasonic vocalizations: In order to find any elements of disrupted social behavior, or social interest per se due to the disease, the PhenoTyper*-9000 is used to monitor social interactions and investigate the influence of short-term social separation (1hr >24hrs) with simultaneous recordings of ultrasonic vocalizations (USV). Social interactions and USV's will also be measured when the animals are reunited again. With Ethovision software, approach and avoidance, the distance between the animals and proximity is automatically registered and calculated (at this moment only available for short-term monitoring up to 1-2 hrs) (at P28-50 (corresponding to adolescence), P65-95 (corresponding to early adulthood), 3-7 months (middle adulthood), 8-12 months (late adulthood)).

Batch 3: (Sensory)-motor functions

Grip-Strength Test: the grip strength test is a widely-used non-invasive method designed to evaluate rodents limb strength that has been used to investigate the effects of neuromuscular disorders and drugs (Aartsma-Rus et al. 2014). It is based on the natural tendency of a mouse/rat to grasp a bar or grid when it is suspended by the tail. During this test the animal grips with both forelimbs (or hind-limbs) a single bar or a mesh. The purpose of this assay is to assess the animals fore and/or hind limb strength. This method can be used to measure disease progression and neurobehaviour as well as to test effect of specific therapeutic interventions in mouse/rat models of neuromuscular disorders; increases in grip strength have been interpreted as evidence of increased muscle strength. Since the test has to be performed one animal at a time with a period of

rest time between each of the three-five trials per animal it requires several minutes (5-9 minutes). For this test a grip-strength device will be used that can measure and record the grip-strength (at P65-95 (corresponding to early adulthood), 3-7 months (middle adulthood), 8-12 months (late adulthood)).

Holding Bar (or Hanging test): seeks to evaluate motor function and deficit in rodent models (Aartsma-Rus et al. 2014). The animal is placed in order that can grab the bar and is suspended above the floor. The test thus begins with the animal hanging from an elevated bar; the latency to when the animal falls is recorded. Alternatively a box filled of water can be placed on the bottom to motivate the animals to hold the bar. The test is performed three days per week with three trials per session. Testing typically lasts from one up to three weeks.

Static rod: to define the onset of motor symptoms, motor coordination will be tested in a 'turning task', by placing each rat at the end of a suspended, horizontal wooden rod (Deacon et al. 2013). The output consists of two measures: orientation time (time taken to orientate 180° from the starting position towards the shelf) and transit time (the time taken to travel to the shelf end (nose beyond the 10 cm mark from the shelf end of the rod) (at P65-95 (corresponding to early adulthood), 3-7 months (middle adulthood), 8-12 months (late adulthood))).

Ex vivo

Based on the outcome of the behavioural tests, the animals will be sacrificed either by decapitation or by perfusion. The choice of the method will be then made according to the readouts of the different tests. We estimate that each method will be used in 50% of the animals (50% decapitation, 50% perfusion).

Decapitation: Rats are handled, transported from experimental room to decapitation room, and within one second decapitated using a guillotine, by an experienced experimenter. The decapitation is done without anesthesia, because anesthesia is known to interfere with gene expression. It also causes unnecessary injection pain to the animal. The decapitation in our hands is so quick that the animal has no time to notice what happens.

Perfusion: the rats will be anesthetized using sodium pentobarbital (90 mg/kg). Paw reflex needs to be assessed to ensure that the rat is fully anesthetized. Rat's thorax will be opened and a needle (1,5 x 43 mm) will be placed in the left ventricle of the heart. Then liver will be cut open to drain the blood. The rat will be perfused with saline until the liver turns pale. The animal will be perfused using 300 ml of paraformaldehyde (PFA). Then jaws needs to be checked (if they are stiff) trying to open the mouth. The brain will be then removed and fixated in PFA at 4°C. In the end the tissue will be stored in 0.1M PBS at 4 °C.

*Phenotyper (Noldus Information Technology): specially designed cages for recording and video-tracking of home cage activity. Each cage contains a top unit with built-in hardware for videotracking, i.e. a digital infrared- sensitive video camera and infrared lights. These provide constant and even illumination of the cage. An infrared filter placed in front of the camera prevented interference with room illumination. This method allows continuous behavioural recordings in both dark and light periods. The cages (PT4500: 45x45 cm; PT9000: 90x90cm) are made of transparent perspex walls with an aluminium floor covered with sawdust and paper shreds. A feeding station and a water bottle are attached to the outside of a cage wall. A shelter (height: 10 cm, diameter: 9 cm; non-transparent material) was fixed in one of the corners. The PT4500 version will be used for all the experiments using a Phenotyper except from the Social testing where the PT9000 will be used.

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

The number of animals used for the breeding was calculated considering data acquired from our [REDACTED] (see table below).
Animals for registration (depicted in red) have been counted in accordance with the instructions given from the NVWA.

We estimate that we need approximately 12 rats per group (Jansson et al 2014, FIG.1). In the social interaction test the animals will be assessed in pairs and a pair in such experiment is considered as a statistical unit. Therefore, in this experiment a number of 24 animals per genotype (24 w.t and 24 transgenic) is required to reach statistical significance. We will calculate the precise group sizes per animal model using a power analysis, based on data collected so far by us and others.

- **Batch 1:** It consists of 24 control (12 male and 12 female) animals and 24 transgenic (12 male and 12 female). This batch is going to be:

- o Individually tested for anxiety and depression using the following paradigms and at the following ages: elevated plus maze, light/dark box test, Phenotyper: Light Spot Test, Discriminative Avoidance Task (DAT): P28-50 (corresponding to adolescence), P65-95 (corresponding to early adulthood), 3-6 months (middle adulthood), 9-12 months (late adulthood).

- **Batch 2:** It consists of 48 control (24 male and 24 female) animals and 48 transgenic (24 male and 24 female). This batch is going to be:

- o Tested in group of two rats for social behaviour using the following paradigms and at the following ages: social Interaction test and ultrasonic vocalizations in the Phenotyper: P28-50 (corresponding to adolescence), P65-95 (corresponding to early adulthood), 3-6 months (middle adulthood), 9-12 months (late adulthood).

- **Batch 3:** It consists of 24 control (12 male and 12 female) animals and 24 transgenic (12 male and 12 female). This batch is going to be:

- o Individually tested for (Sensory-) Motor function using the following paradigms and at the following ages: holding bar, grip strength test, static rod: P65-95 (corresponding to early adulthood), 3-6 months (middle adulthood), 9-12 months (late adulthood).

Total of animals: 15 breeding males + 52 BACHD males + 48 WT males + 52 BACHD females + 48 WT females= 215 animals

(Total of animals needed in the experiments: $(4 \times 24) + (2 \times 48) = 192$ rats)

Number of animals paired F = females M = males	Expected number of litters	Expected number of pups	Expected number of males pups	Expected number of female pups
45 30 WT females (F) 15 BACHD males (M)	25	250	73 WT (48 used in experiment) 52 BACHD (48 used in experiment)	73 WT (48 used in experiment) 52 BACHD (48 used in experiment)

The number of animals used for the breeding was calculated considering data acquired from our

- 1) The average litter size was about 10 pups,
- 2) The breeding success was 80%,
- 3) The ratio BACHD: WT was about 5:7,
- 4) The expected ratio males: females is about 50: 50.

B. The animals

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

BACHD transgenic (TG) rats bred on a Sprague Dawley background and wild type (WT) littermates will be used in the study. This rat model (see project proposal) has been chosen because it mimics the genetic factor responsible to HD symptoms development in humans. Rat have a more elaborative behavioural repertoire compared to mice, and therefore they are the species of choice for extensive behavioural phenotyping of complex neuropsychiatric and neurological disorders. Moreover, there are largely documented sex differences in anxiety (Gater et al, 1998; Kessler et al, 1994) and previous studies have shown that male and female react differently to stressful or threatening stimuli. Sex differences have also been noted in social behaviour studies (Stack et al. 2009). Therefore we want to perform the different experiments in both male and female animals.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Rat	Own breeding	215	P1 up to 12 months

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: The rat is the best animal model to perform behavioural studies to investigate neurological and neuropsychiatric disorders. Because of the complexity of these kind of disorders, it is impossible to use lower-order animals. Furthermore, in a model like the BACHD rat model we can study the onset and development of disease-symptoms from an early age on. This may also allow to investigate preventive treatments in a later stage of research. Such a longitudinal approach, which is part of this project, is very time consuming and costly in humans, and therefore rarely done. In addition, specific brain mechanisms and behaviors cannot be studied in vivo in humans, because of ethical restraints.

REDUCTION: A reduction in the number of animals per group would reduce statistical power needed to demonstrate behavioural effects. In case of the experiments conducted in the PhenoTyper, more data per animal is obtained (continuous monitoring for hours up to several days) with a reduction of the number of animals needed. In the case of the classical paradigms instead, the selection of the different kind of tests has been strict, including only essential paradigms for the purpose of the study. Furthermore, since longitudinal experiments will include the usage of the same animals throughout the study, this will lead to minimal amount of animals needed.

REFINEMENT: Since in part of the experiments the rats are placed in the PhenoTyper where multiple tests can be performed, handling and other human interventions are minimized, resulting in a reduction of stress for the animal, and thus in more reliable results. All the paradigms are painless and non-invasive tests. Furthermore, social housing, cage enrichment, handling and day/night rhythm will be applied.

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

Animals will be monitored daily and closely by the caretakers, weighed and scored individually for signs of discomfort and checked twice a week to be able to detect Human End Point conditions. Furthermore, the use of a completely automated video tracking system for continuous experiments, reducing the handling, minimizes the human intervention that may cause stress for the animals. Also, habituation to housing, day/night rhythm and handling will be applied.

Decapitation will be done without anesthesia, because anesthesia interferes with gene expression. Because the decapitation will be done in a fraction of a second, the rats will not suffer.

Perfusion will take place under deep anesthesia.

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.

Not applicable

Accommodation and care

F. 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.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The rats may experience psychological stress (e.g. Light Spot, light/dark box) in the behavioural tests, but this is not associated with physical damage. In the light/dark box test, rats may experience stress since novel environment and light are considered mild stressors. The same applies to the Light Spot test, with the difference that rats are housed in such a safe environment as the Phenotyper. In the Phenotyper 4500 the rats are socially isolated, which causes mild stress to social rats. In the Phenotyper 9000 social interaction will be assessed using cagemates, and acclimatization to the new environment will be provided prior to testing. The other behavioural tests are minimally stressful. The stress involves the placement of the animal in a new environment (e.g. static rod test), effects of which may be comparable to the effects of cage cleaning. No adverse effects are expected immediately before the killing.

Specific line discomfort:

The BACHD transgenic rats are expected to develop severe physiological abnormalities starting from 18 months of age. It is indeed correct that full-blown disorder symptoms will only be seen in 18 month and older rats. However, it cannot be concluded from this that the health status of the transgenic and wild-type rats is similar. That is not known and will be investigated in this project. Indeed, we aim at assessing phenotypes preceding the full-blown disorder symptoms. Since it is unlikely that symptoms suddenly appear at 18 months of age, we expect the arise of moderate symptoms in BACHD transgenic animals before the onset of the HD symptoms. Since wild-type control animals do not develop HD symptoms, we expect that they will also not develop symptoms that precede HD, and thus that their suffering is mild.

Explain why these effects may emerge.

Rats are exposed to novel test cages, which may cause stress in the first place. This stress is about equal to cage cleaning. In all the home-cage tests performed in the Phenotyper, the use of a completely automated video tracking system for continuous experiments reduces the handling, the human intervention and the consequent stress to the very minimum.

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

The goal is to follow the development of phenotypes that precede the manifestation of full-blown disorder symptoms with the future aim of testing useful therapies and validating parameters for Huntington's Disease. As such, the (mild) adverse effects caused by the behavioral testing itself cannot be avoided. Information on the development of the main symptoms is thus necessary and are the core of the study. Animals will be monitored closely (during Phenotyper monitoring and repeated behavioural testing), weighed and scored individually for signs of discomfort and

checked twice a day to be able to detect humane end point conditions. Additionally, the use of a completely automated video tracking system for continuous experiments, reducing the handling, minimizes the human intervention that may cause stress for the animals. Also, habituation to housing, day/night rhythm and handling will be applied.

Concerning the decapitation/perfusion there are no prevention measures, because the goal is to kill the rats to obtain brain material. **However, the rats are habituated to handling and will be used to this, even more because they have been subjected to repeated behavioural tests, including handling. It is known that rats get used to this very easily and then do not show signs of stress by handling. The animals will be decapitated by familiar and skilled persons, reducing the risk of stress to the minimum.**

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 criteria to take the animal out of the experiments are based on human observation of factors known as clear symptoms of pain/stress/discomfort and defined for humane end point detection*. Weight loss of more than 15%-20% in one day is considered as a humane endpoint. Also (a combination of) general symptoms such as raised fur, hunched back (arched back), poor coat conditions, are also considered as humane endpoints after which the animals should be euthanized. All the criteria that have been considered in the past, during other experiments, as "humane endpoints" will be further clarified by being intensively in contact with the veterinarians at [REDACTED]

*Standard human endpoints rodents: piloerection, loss of body weight (> 15%), immobility, poor self-care, tremor, self-damage, abnormal body posture, convulsions, tumors, elephant teeth.

BACHD transgenic rats: during an observation period of 18 months no increased mortality was observed (non published data from our [REDACTED] [REDACTED]). In previous findings the BACHD rats reached the HEP at >18 months of age, which was the endpoint the researchers had determined because of the severity of the symptoms that the animals had developed. **This is not the case since the last time point of testing will be 12 months of age: previous findings (Yu-Taeger et al. 2012, Abada et al. 2013a,b) suggest that mild to moderate symptoms can appear during this time span.**

Indicate the likely incidence.

Once again, the transgenic BACHD rats will reach the human endpoint at 18 months of age but tests will be performed until 12 months of age so we expect that the incidence will be <1%.

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 control group that will be used for the experiments and the transgenic animals used for breeding (52% of total number of animals) will experience mild discomfort.

The transgenic adult animals will be tested until 12 months of age and will develop disease symptoms. This group of animals will therefore experience moderate discomfort later in life (48% of total number of animals).

Classification = (WT+BACHD) Mild for breeding, behavioural tests and decapitation + perfusion (52% of total number of animals);

Classification = (BACHD) Moderate (max) for disease development* (48% of total number of animals)

*The BACHD transgenic rats are expected to develop symptoms that will ultimately lead to the HEP at 18 months of age. During the HEP stage the animals will have severe symptoms. Thus, since we aim at assessing phenotypes preceding the full-blown disorder symptoms the experiments will be carried out during a period of 12 months, starting from 1 month (batches 1 and 2) and 2 months (batch 3) of age. During this stage of (disease) development there will be a gradual arise of symptoms. We therefore estimate the discomfort to be maximally (at a later stage during the project when the disease symptoms develop) 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.

We need the rat brains to measure the molecular mechanisms underlying emotion, social as well as motor-related behaviour in BACHD rats.

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

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2015-0100
2. Titel van het project: Phenotypic assessment of motor control, anxiety and social behavior in a transgenic rat model for Huntington's Disease
3. Titel van de NTS: Onderzoek naar het effect van genetische veranderingen in ratten op de ontwikkeling van Huntington's Disease
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: 25-08-2015
 - ☐ aanvraag compleet
 - ☐ in vergadering besproken: 08-09-2015 en 06-10-2015
 - ☐ anderszins behandeld
 - ☐ termijnonderbreking(en) van 15-09-2015 tot 22-09-2015
 - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - ☐ aanpassing aanvraag: 22-09-2015
 - ☐ 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: 15-09-2015
 - Strekking van de vragen:

Niet-technische samenvatting:

-3.5 Het percentage van de dieren waarop de verschillende ongeriefclassificaties van toepassing zijn is niet aangegeven.

-4.1 In zijn algemeenheid is onderzoek naar Huntington's disease wel mogelijk in bijvoorbeeld zebravissen, hoewel niet het beoogde gedragsonderzoek. De onderzoekers worden verzocht dit aan te passen.

Project Proposal:

- 3.1 De rationale voor het uitgebreid karakteriseren van deze transgene dieren is onvoldoende duidelijk gemaakt. Voor welk onderzoek dat niet in patiënten kan worden uitgevoerd is deze uitgebreide karakterisering noodzakelijk?
- 3.2 De commissie verzoekt u hier alleen het doel van deze projectaanvraag te vermelden. Het tekstblok "We will specifically focus on.....[]....applying novel substances for the treatment of HD" past beter bij punt 3.4
- 3.3 In de laatste zin van dit gedeelte verwijst u terloops naar het feit dat u "funding" hebt verkregen voor dit project, kennelijk om daarmee het belang te benadrukken. De commissie is het met u eens dat het feit dat u van de EU financiering hebt verkregen voor dit project en dat het project is ingebed in "Phenorat", laat zien dat het belang van uw project onafhankelijk getoetst is door vooraanstaande vakgenoten. U zou dat echter dan ook duidelijk zo moeten vermelden. De terloopse verwijzing naar "funding" wordt wellicht niet zo begrepen.
- 3.4.2 De proef duurt 12 maanden. Kunt u uitleggen en verantwoorden waarom u een vergunning voor 5 jaar nodig zou hebben?

Description of Animal Procedures:

-DAP

*I. De BACHD transgene ratten zullen pas vanaf 18 maanden ernstige motorische cognitieve en fysiologische abnormaliteiten ontwikkelen. Tot die tijd is hun gezondheidstoestand vergelijkbaar met wild-type muizen uit hetzelfde nest. Tegelijkertijd schrijven de onderzoekers dat het ongerief door het genotype in de leeftijdsfase waarin de dieren worden getest mild tot matig is. De commissie is van mening dat deze beweringen in tegenspraak met elkaar zijn.

*J. Uit eerdere bevindingen bleken de BACHD ratten vanaf 18 maanden het humane eindpunt te bereiken vanwege de ernst van de symptomen die de dieren in de daaraan voorafgaande periode hadden ontwikkeld. Waarom verwachten de onderzoekers dat de BACHD ratten in dit experiment deze symptomen pas vanaf 18 maanden zullen ontwikkelen (zie vorige vraag en de informatie gegeven bij onderdeel I)?

*K: Waarom schatten de onderzoekers het ongerief voor de transgene dieren in als matig wanneer zij niet oud genoeg worden om symptomen van de ziekte te ontwikkelen en gedragstesten ondergaan die slechts licht ongerief veroorzaken? Onder K dient u ook weer te geven welk percentage van de proefdieren het respectievelijke ongerief zal ondergaan.

- Datum antwoord: 22-09-2015

- Strekking van de antwoorden:

Niet-technische samenvatting:

-3.5 This is now added to the NTS.

-4.1 Reference to this example, and why it cannot be used, is now added to the NTS.

Project Proposal:

-3.1 A new section has been added to explain the urgency of the characterization of animal models of Huntington's Disease and why these kind of studies cannot be carried out in patients.

-3.2 This section has been moved to section 3.4.1.

-3.3 More details about the funding have been included in the relevant section.

-3.4.2

The licence time has been reduced to two years, considering the time needed for the behavioural and the molecular studies.

Description of Animal Procedures:

* I. It is indeed correct that full-blown disorder symptoms are only seen in 18 month and older rats. However, it cannot be concluded from this that the health status of the transgenic and wild-type rats is similar. That is not known and will be investigated in this project. Indeed, we aim at assessing phenotypes preceding the manifestation of the full-blown disorder symptoms. Since it is unlikely that symptoms suddenly appear at 18 months of age, we expect the arise of moderate symptoms in transgenic animals before the onset of the HD symptoms. Since wild-type control animals do not develop HD symptoms, we expect that they will also not develop symptoms that precede HD, and thus that their suffering is mild.

* J. Based on previous findings, we expect that the transgenic animals will start to develop mild to moderate symptoms during the 12 months of testing. In fact, the aim of the proposed project is to identify time windows during which each class of symptoms will start appearing.

* K: The transgenic rats are expected to develop symptoms that ultimately will lead to the HEP at 18 months of age. During the HEP stage the animals will have severe symptoms. In the preceding phase, the symptoms are expected to be moderate. The symptoms are not likely to be mild, because there will be gradual build-up of symptoms that ultimately lead to the HD systems at 18 months of age. See also our answer to point I

- 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 phenotype this rat model for Huntington's Disease in order to define behavioural features that precede the manifestation of the full-blown disorder symptoms'. De te behalen onderzoeksresultaten zullen duidelijk maken welke afwijkingen op het gebied van sociaal gedrag, emoties of motorische functies optreden voordat de typische symptomen van de ziekte van Huntington zich openbaren bij de transgene ratten. Voorts wordt duidelijk of er veranderingen zijn in bijvoorbeeld eiwitten of mRNA in bepaalde hersengebieden die deze afwijkingen zouden kunnen verklaren. Deze resultaten kunnen op termijn leiden tot begrip van de manier waarop deze neurodegeneratieve ziekte zich ontwikkelt en uiteindelijk mogelijk tot de ontwikkeling van interventies. De ziekte van Huntington is een erfelijke ziekte die zich doorgaans openbaart tussen het 35^e en 50^e levensjaar. Symptomen zijn ondermeer onwillekeurige bewegingen, verstandelijke achteruitgang en verandering in persoonlijkheid. Er is geen therapie voor deze progressieve ziekte, waaraan patiënten gemiddeld na 19 jaar overlijden. Maatschappelijk is dit onderzoek van belang, omdat de resultaten kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van interventies die de progressie van de ziekte afremmen.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Deze groep heeft veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De gekozen aanpak leidt tot betrouwbare uitspraken over het optreden van afwijkingen voordat de typische symptomen van deze neurodegeneratieve ziekte zich openbaren bij deze transgene ratten. De commissie is verder van mening dat ruim voldoende aannemelijk is gemaakt dat de bevindingen in het gekozen genetische gemodificeerde ratmodel relevant kunnen zijn voor de situatie in humane patiënten.
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 en de fok is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk bepaald door de ontwikkeling van de ziekte van Huntington met de bijbehorende neurodegeneratieve processen. De DEC schat het ongerief als gevolg van de benodigde gedragstesten in als licht. Het ongerief als gevolg van de ontwikkeling van de ziekte is uiteindelijk matig, aangezien de dieren worden gedood voordat ernstige symptomen van de ziekte optreden. De DEC is van mening dat de combinatie van al deze factoren leidt tot licht ongerief voor de dieren in fok en de wildtype dieren en tot maximaal matig ongerief voor de volwassen transgene dieren. Het cumulatief ongerief voor de ratten in de beschreven vergunningaanvraag is dus juist ingeschat als licht voor 71% van de dieren en matig voor de overige dieren.
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 neurodegeneratieve ziekte die gedragsafwijkingen veroorzaakt kan niet goed bestudeerd worden zonder proefdiermodellen.
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. De longitudinale aanpak waarbij meerdere metingen op dezelfde dieren worden gedaan voorkomt onnodig gebruik van proefdieren. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 167 ratten.

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. Door gebruik van de Phenotyper kooien ondergaan de dieren minder handelingen, en kunnen er continu data verzameld worden over het gedrag van de dieren. 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 het optreden van afwijkingen op het gebied van sociale interacties, motorische functies en emoties voordat de typische symptomen van de ziekte van Huntington zich openbaren bij ratten met een erfelijke aanleg voor deze ziekte. De resultaten zullen inzicht geven in de manier waarop deze neurodegeneratieve ziekte zich ontwikkelt. Deze inzichten kunnen mogelijk tot de ontwikkeling van interventies leiden die de progressie van de ziekte bij mensen afremmen. Het belang van meer inzicht in de manier waarop de ziekte van Huntington zich ontwikkelt en het beschikbaar komen van interventies acht de DEC substantieel, gezien de ernst van deze aandoening.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat 71% van de dieren licht ongerief en 29% van de dieren matig ongerief zullen ondervinden als gevolg van de gedragstesten en de ontwikkeling van de ziekte van Huntington. 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 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:	2015-0100
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(628)



**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
AVD103002015302

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 AVD103002015302. 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, t.a.v. [REDACTED]
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
IBAN: NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: UMC St Radboud

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
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(628)

Wilt u een nieuwe machtiging
afgeven? Nee

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: 1 december 2017
Titel project: Phenotypic assessment of motor control, anxiety and social behavior in a transgenic rat
Titel niet-technische samenvatting: Onderzoek naar het effect van genetische veranderingen in ratten op de ontwikkeling va
Naam DEC: RU DEC
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen ([REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]

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: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Nijmegen
Datum: 2 november 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen



Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN(628)



**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
AVD103002015302

Bijlagen

2

Datum 5 november 2015

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 5 november 2015

Vervaldatum: 5 december 2015

Factuurnummer: 15700302

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002015302	€ 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.

Van: Info-zbo
Verzonden: woensdag 11 november 2015 13:26
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: Aanvullende informatie aanvraag AVD103002015302
Bijlagen: Aanvullende informatie AVD103002015302.pdf

Geacht [REDACTED]

Op 2 november 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Phenotypic assessment of motor control, anxiety and social behavior in a transgenic rat model for Huntington's Disease', met aanvraagnummer AVD103002015302. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In de bijgaande brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]
Uitvoeringsexpert

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres info@zbo-ccd.nl. Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Postbus 9101, t.a.v. [REDACTED]

6500HB 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

AVD103002015302

Datum 11 november 2015

Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Bijlagen

1

Geachte [REDACTED]

Op 2 november 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Phenotypic assessment of motor control, anxiety and social behavior in a transgenic rat model for Huntington's Disease', met aanvraagnummer AVD103002015302. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Onduidelijkheden

In uw aanvraag beschrijft u van plan te zijn alleen mannelijke ratten te testen. De CCD hecht er aan dat het aantal dieren in voorraad gedood terug te dringen. Kunt u toelichten of het mogelijk is dieren van beide geslachten te gebruiken en als dit niet mogelijk is kunt u dan onderbouwen waarom het belangrijk is dieren van 1 geslacht te gebruiken?

Wij vragen u deze informatie te verstrekken.

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

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Stuurt u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt.

Wanneer een beslissing

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

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).

Datum

11 november 2015

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD103002015302

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post



Melding

Bijlagen via de post

- U wilt één of meerdere bijlagen naar ons versturen? Voeg *altijd* deze Melding Bijlagen toe. Wij weten dan welke documenten van u zijn en hoeveel documenten u opstuurt.
- Meer informatie vindt u op www.centralecommissiedierproeven.nl
- Of bel met ons: 0900 28 000 28 (10 ct/min).

1 Uw gegevens

- 1.1 Vul de gegevens in.
- | | | |
|----------------|--|------------|
| Naam aanvrager | | |
| Postcode | | Huisnummer |
- 1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?
Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.
- | | |
|----------------|--|
| Aanvraagnummer | |
|----------------|--|

2 Bijlagen

- 2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.*
- | | |
|--------------------------|--|
| ☐ | |
| ☐ | |
| ☐ | |

3 Ondertekening

- 3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
- Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
- | | |
|--------------|--------|
| Naam | |
| Datum | - - 20 |
| Handtekening | |

Van: Info-zbo
Verzonden: donderdag 12 november 2015 9:41
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: aanvullende informatie AVD103002015302

Geachte DEC leden,

Op 2 november heeft u advies aan de CCD gebracht op aanvraag AVD103002015302, met titel 'Phenotypic assessment of motor control, anxiety and social behavior in a transgenic rat model for Huntington's Disease', uw kenmerk: 2015-0100.

We begrijpen uit de tekst van de aanvraag dat mannelijke ratten vanaf 1 maand oud langere tijd achter elkaar individueel in de Phenotyper 4500 gehuisvest worden. Zou u toe kunnen lichten hoe u tot de ongerief classificatie licht bent gekomen?

De aanvrager beschrijft in zijn aanvraag gebruik te willen maken van alleen mannelijke ratten in zijn experimenten. We hebben de aanvrager rechtstreeks gevraagd om zijn keuze te onderbouwen.

In verband met doorlooptijd willen we u vragen om uiterlijk vrijdag, 13 november 2015, op deze email te reageren.

Alvast hartelijk dank voor uw medewerking.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]
Uitvoeringsexpert

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Dear Committee members,

Thank you for your review of project-license proposal AVD103002015302, named 'Phenotypic assessment of motor control, anxiety and social behavior in a transgenic rat model for Huntington's Disease'. Below you can find the point raised and a justification for that.

In uw aanvraag beschrijft u van plan te zijn alleen mannelijke ratten te testen. De CCD hecht er aan dat het aantal dieren in voorraad gedood terug te dringen. Kunt u toelichten of het mogelijk is dieren van beide geslachten te gebruiken en als dit niet mogelijk is kunt u dan onderbouwen waarom het belangrijk is dieren van 1 geslacht te gebruiken?

Thank you for your insightful comment. Because we will breed the BACHD rats ourselves, we will generate both male and female rats. We agree that the experimental use of the female rats to gain insight in sex differences in behaviour preceeding the onset of HD is more justified than not using the female rats. This is also scientifically relevant, as there are documented sex differences in anxiety (Gater et al, 1998; Kessler et al, 1994) and social behaviour (Stack et al, 2010), behavioural components that will be measured in this project. It is the traditional or conservative idea that females are intrinsically more variable than males and must be tested at each of four stages of the estrous cycle to generate reliable data. We recently came across a meta-analysis which concluded that variability was not significantly greater in females than males for any endpoint (Prendergast et al, 2014). The authors also indicate that utilization of female mice in neuroscience research does not require monitoring of the estrous cycle. Therefore, we can readily include female rats in our project. On the other hand, our collaborators working with this rat model have always been using male rats. Thus, since all the results we have so far are coming from male rats we would like to correlate the results between male and female to assess if the results are comparable in our type of research. Based on published work (Jansson et al, 2014 FIG.1) and previously collected data on an impulsivity task (DRL) a power analysis has been performed to calculate the number of male rats needed in this experiment. The calculation was performed using G*Power (vers. 3.1) using a power of 0.80 and an alpha error probability of 0.05.

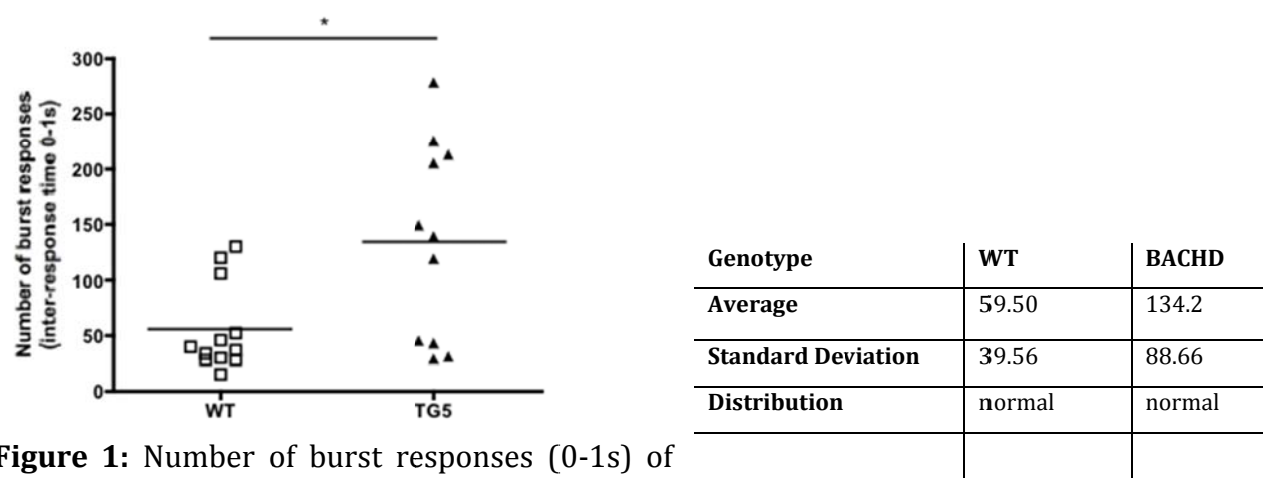


Figure 1: Number of burst responses (0-1s) of wild-type and BACHD male animals in the DRL-10. Left: graph, right: tabular representation.

From the results below it can be seen that 12 male rats per group are needed:

Analysis: A priori: Compute required sample size – given alpha, power, and effect size

Input:

Tail(s) = One

Effect size $d = 1.088131$

α err prob = 0.05

Power ($1 - \beta$ err prob) = 0.80

Allocation ratio $N2/N1 = 1$

Output:

Noncentrality parameter $\delta = 2.6653657$

Critical $t = 1.7171444$

Df = 22

Sample size group 1 = 12

Sample size group 2 = 12

Total sample size = 24

Actual power = 0.8256541

We will therefore use 12 male rats for each group (24 for the social interaction experiment) to reach statistically significant differences. Since we expect sex differences in the behaviours and all previous data have been collected with males we will use the same number of male ($n=12$) and female ($n=12$) animals for each group. In this way we have sufficient statistical power to assess the presence or absence of differences between sexes. Since female animals will be born and registered anyway (breeding with discomfort) this will only cause a small increase in the overall number of animals used. While, by including the females in this experiment instead of euthanizing them, we will gather valuable information and be able to assess whether or not male and female animals can be combined in one group (6 males and 6 females) for future studies, without loss of power.

We have adjusted the project accordingly.

If you need further clarifications don't hesitate to contact us.

Best regards,



References:

Gater R, Tansella M, Korten A, Tiemens BG, Mavreas VG, Olatawura MO (1998). Sex differences in the prevalence and detection of depressive and anxiety disorders in general health care settings: report from the World Health Organization Collaborative Study on Psychological Problems in General Health Care. Arch Gen Psychiatry 55: 405–413.

Jansson EKH, Clemens LE, Riess O, Nguyen HP (2014). Reduced motivation in the BACHD rat model of Huntington disease is dependent on the choice of food deprivation strategy. PLoS One; 9: e105662.

Kessler RC, McGonagle KA, Zhao S, Nelson CB, Hughes M, Eshleman S, Wittchen HU, Kendler KS (1994). Lifetime and 12-month prevalence of DSM-III-R psychiatric disorders in the United States. Results from the National Comorbidity Survey. Arch. Gen. Psychiatry 51: 8–19.

Prendergast B, Onishi K, Zucker I (2014). Female mice liberated for inclusion in neuroscience and biomedical research. Neuroscience and Biobehavioral Reviews. 40: 1-5.

Stack A, Carrier N, Dietz D, Hollis F, Sorenson J, Kabbaj M (2010). Sex Differences In Social Interaction in Rats: Role of the Immediate-Early Gene zif268. Neuropsychopharmacology. 35: 570-580

[REDACTED]

Van: [REDACTED]
Verzonden: vrijdag 13 november 2015 16:57
Aan: info@zbo-ccd.nl
Onderwerp: RE: aanvullende informatie AVD103002015302

Geachte CCD,

De dieren zullen ca. 8 dagen achter elkaar solitair gehuisvest zijn in de Phenotyper. In eerste instantie heeft de commissie dit als licht ongerief ingeschaald, mede vanwege het feit dat de dieren in dezelfde kamer, waar zij elkaar kunnen zien en ruiken, zullen worden gehuisvest. Een verblijf van 8-9 dagen is niet echt langdurig, maar ook niet kort. In combinatie met de gedragstesten die de dieren ondergaan, wordt het ongerief voor de dieren matig. Wat dit betreft wil de commissie haar mening dus herzien, en schat het ongerief voor de dieren die in de Phenotyper een gedragstest ondergaan in als matig.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
Concernstaf Kwaliteit en Veiligheid
[REDACTED]
M
[REDACTED]
[REDACTED]

Radboud universitair medisch centrum

Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED]

Geert Grooteplein 10 [REDACTED]

www.radboudumc.nl

Aanwezig: ma, di en do van 9.00 – 15.00 uur

Van: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Verzonden: donderdag 12 november 2015 9:41
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: aanvullende informatie AVD103002015302

Geachte DEC leden,

Op 2 november heeft u advies aan de CCD gebracht op aanvraag AVD103002015302, met titel 'Phenotypic assessment of motor control, anxiety and social behavior in a transgenic rat model for Huntington's Disease', uw kenmerk: 2015-0100.

We begrijpen uit de tekst van de aanvraag dat mannelijke ratten vanaf 1 maand oud langere tijd achter elkaar individueel in de Phenotyper 4500 gehuisvest worden. Zou u toe kunnen lichten hoe u tot de ongerief classificatie licht bent gekomen?

De aanvrager beschrijft in zijn aanvraag gebruik te willen maken van alleen mannelijke ratten in zijn experimenten. We hebben de aanvrager rechtstreeks gevraagd om zijn keuze te onderbouwen.

In verband met doorlooptijd willen we u vragen om uiterlijk vrijdag, 13 november 2015, op deze email te reageren.

Alvast hartelijk dank voor uw medewerking.

Met vriendelijke groet,



Uitvoeringsexpert

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Het Radboudumc staat geregistreerd bij de Kamer van Koophandel in het handelsregister onder nummer 41055629.
The Radboud university medical center is listed in the Commercial Register of the Chamber of Commerce under file number 41055629.

Het Radboudumc staat geregistreerd bij de Kamer van Koophandel in het handelsregister onder nummer 41055629.
The Radboud university medical centre is listed in the Commercial Register of the Chamber of Commerce under file number 41055629.



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

Postbus 9101
6500 HB NIJMEGEN (route 231)
|||||

**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
AVD103002015302
Bijlagen
1

15 DEC. 2015

Datum
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 2 november 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Phenotypic assessment of motor control, anxiety and social behavior in a transgenic rat" met aanvraagnummer AVD103002015302. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 19 november 2015 heeft u uw aanvraag aangevuld. U heeft de vraag van de CCD over het geslacht van de proefdieren beantwoord. U heeft de aanvraag herzien na de vragen van de CCD en op 19 november een aangepaste versie van de projectaanvraag gestuurd.

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 en hieronder gemotiveerd. U kunt met uw project "Phenotypic assessment of motor control, anxiety and social behavior in a transgenic rat" starten. De vergunning wordt afgegeven van 15 december 2015 tot en met 1 december 2017. De looptijd van de vergunning wijkt af omdat de datum in de aanvraag in het verleden ligt.

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 hebben de DEC om aanvullende informatie gevraagd. Op 13 november 2015 heeft de DEC gereageerd op onze vragen vragen over het ongerief veroorzaakt door de individuele huisvesting in de Phenotyper.

Wij kunnen ons grotendeels vinden in de inhoud van het advies en in de nadien ingekomen reactie van de Dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie grotendeels over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

De CCD stelt in aanvulling een algemene voorwaarde en een specifieke voorwaarde aan dit project. De algemene voorwaarde betreffende artikel 10, lid 1a van de wet wordt gesteld om te voldoen aan dat gene wat volgt uit dit artikel. De specifieke voorwaarde betreft de acclimatisatie periode van de dieren aan de omgedraaide dag/nacht ritme. De CCD acht het noodzakelijk dat de acclimatisatie periode voldoende is om het dierenwelzijn en de resultaten van het onderzoek niet te beïnvloeden. Om die reden stelt de CCD in dit kader een voorwaarde. Mede gelet op de wettelijke rol van de IvD beperkt deze voorwaarde de uitvoering van het project niet.

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 nummers in de rechter kantlijn in deze brief.

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. 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).

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:


Ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

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, t.a.v. [REDACTED]

Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN

Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 15 december 2015 tot en met 1 december 2017, voor het project "Phenotypic assessment of motor control, anxiety and social behavior in a transgenic rat" met aanvraagnummer AVD103002015302, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Postdoc. 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 per digitale indiening op 19 november 2015;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 19 november 2015;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 2 november 2015, ontvangen op 2 november 2015.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 19 november 2015

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Breeding and Behavioural phenotyping and molecular correlates	Ratten (Rattus norvegicus) / BACHD transgenic rat om Sprague Dawley achtergrond; P1 tot 12 maanden; beide geslachten	215	Matig / moderate	

Voorwaarden

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

De IvD zal toezicht houden dat de acclimatisatie periode aan de omgedraaide dag/nacht ritme voldoende is om geen negatief effect op het dierenwelzijn en op de resultaten van de testen te hebben.

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 waar bij 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 delooptijd 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 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 blijvende schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand..

Volgens artikel 13b 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 13d 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 13c 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.

De Minister heeft vrijstelling ontheffing verleend volgens artikel 13c, die de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.

[REDACTED]

Van: Info-zbo
Verzonden: woensdag 16 december 2015 7:48
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: Beschikking AVD103002015302
Bijlagen: DEC Advies 302.pdf; Beschikking AVD103002015302.pdf

Geachte heer, mevrouw,

Deze brief is ook per post verstuurd.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl
[REDACTED]

.....
[REDACTED] Den Haag Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....

Van: Info-zbo
Verzonden: donderdag 17 december 2015 15:22
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: terugkoppeling besluit aanvraag AVD103002015302

Geachte DEC leden,

Op 2 november heeft u advies uitgebracht op een aanvraag voor een projectvergunning met titel 'Phenotypic assessment of motor control, anxiety and social behavior in a transgenic rat model for Huntington's Disease' en aanvraagnummer AVD103002015302, uw kenmerk: 2015-0100. Wij danken u voor uw advies en we koppelen het besluit van de CCD graag terug.

Op 19 november 2015 heeft de aanvrager zijn aanvraag aangevuld. Hij heeft de vraag van de CCD over het geslacht van de proefdieren beantwoord. Hij heeft de aanvraag herzien na de vragen van de CCD en op 19 november een aangepaste versie van de projectaanvraag gestuurd, waarin het gebruik van beide geslachten opgenomen is.

Wij hebben ook u om aanvullende informatie gevraagd. Op 13 november 2015 heeft u gereageerd op onze vragen over het ongerief veroorzaakt door de individuele huisvesting in de Phenotyper.

Wij kunnen ons grotendeels vinden in de inhoud van het advies en in de nadien ingekomen reactie van de Dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie grotendeels over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

De CCD stelt in aanvulling een algemene voorwaarde en een specifieke voorwaarde aan dit project. De algemene voorwaarde betreffende artikel 10, lid 1a van de wet wordt gesteld om te voldoen aan dat gene wat volgt uit dit artikel.

'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 waar bij 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 delooptijd 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.'

De specifieke voorwaarde betreft de acclimatisatie periode van de dieren aan de omgedraaide dag/nacht ritme. De CCD acht het noodzakelijk dat de acclimatisatie periode voldoende is om het dierenwelzijn en de resultaten van het onderzoek niet te beïnvloeden. Om die reden stelt de CCD in dit kader een voorwaarde. Mede gelet op de wettelijke rol van de IvD beperkt deze voorwaarde de uitvoering van het project niet.

'De IvD zal toezicht houden dat de acclimatisatie periode aan de omgedraaide dag/nacht ritme voldoende is om geen negatief effect op het dierenwelzijn en op de resultaten van de testen te hebben.'

De vergunning wordt afgegeven van 15 december 2015 tot en met 1 december 2017.

De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht.

We hopen u hiermee voldoende te hebben geïnformeerd.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres info@zbo-ccd.nl. Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.