

		Inventaris Wob-verzoek W17-12								
			wordt verstrekt			weigeringsgronden				
nr.		document NTS 20172004	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1		Origineel aanvraagformulier				x		x	x	
2		NTS	x							
3		Projectvoorstel				x		x	x	
4		Bijlagen beschrijving dierproeven				x		x	x	
5		DEC-advies				x		x	x	
6		Ontvangstbevestiging				x		x	x	
7		Verzoek om aanvullende informatie				x		x	x	
8		Antwoord op verzoek om aanvullende informatie				x		x	x	
9		Adviesnota CCD		x						x
10		Beschikking en vergunning				x		x	x	



Aanvraag

Projectvergunning Dierproeven

Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.zbo-ccd.nl of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	☒ Ja > Vul uw deelnemernummer in 10300 ☐ Nee > U kunt geen aanvraag doen										
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">Naam instelling of organisatie</td> <td>Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen</td> </tr> <tr> <td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td> <td>Instantie voor dierenwelzijn</td> </tr> <tr> <td>KvK-nummer</td> <td>4 1 0 5 5 6 2 9</td> </tr> </table>	Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	Instantie voor dierenwelzijn	KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9				
Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen											
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	Instantie voor dierenwelzijn											
KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9											
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">Straat en huisnummer</td> <td>Geert Grooteplein 10</td> </tr> <tr> <td>Postbus</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td>6500HB Nijmegen</td> </tr> <tr> <td>IBAN</td> <td>NL90ABNA0231209983</td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td>UMC St Radboud</td> </tr> </table>	Straat en huisnummer	Geert Grooteplein 10	Postbus	[REDACTED]	Postcode en plaats	6500HB Nijmegen	IBAN	NL90ABNA0231209983	Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud
Straat en huisnummer	Geert Grooteplein 10											
Postbus	[REDACTED]											
Postcode en plaats	6500HB Nijmegen											
IBAN	NL90ABNA0231209983											
Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud											
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[REDACTED] ☒ Dhr. ☐ Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td>PhD-student</td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] ☒ Dhr. ☐ Mw.	Functie	PhD-student	Afdeling	[REDACTED]	Telefoonnummer	[REDACTED]	E-mailadres	[REDACTED]
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] ☒ Dhr. ☐ Mw.											
Functie	PhD-student											
Afdeling	[REDACTED]											
Telefoonnummer	[REDACTED]											
E-mailadres	[REDACTED]											
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">(Titel) Naam en voorletters</td> <td>☐ Dhr. ☐ Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	☐ Dhr. ☐ Mw.	Functie		Afdeling		Telefoonnummer		E-mailadres	
(Titel) Naam en voorletters	☐ Dhr. ☐ Mw.											
Functie												
Afdeling												
Telefoonnummer												
E-mailadres												

- | | | | | |
|-----|--|--|-----------------------------|--|
| 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 | [Redacted] | ☐ Dhr. ☐ Mw. |
| | | Functie | Instantievoor Dierenwelzijn | |
| | | Afdeling | [Redacted] | |
| | | Telefoonnummer | [Redacted] | |
| | | E-mailadres | [Redacted] | |
| 1.7 | Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde? | ☐ Ja > <i>Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag</i>
☒ Nee | | |

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- | | | | | | | | | |
|-------------|--|--|------------|---------------------|-----------|---------------------|-------------|------------|
| 3.1 | Wat is de geplande start- en einddatum van het project? | <table border="1"> <tr> <td>Startdatum</td> <td>0 1 _ 0 7 _ 2 0 1 7</td> </tr> <tr> <td>Einddatum</td> <td>0 1 _ 0 7 _ 2 0 2 2</td> </tr> </table> | Startdatum | 0 1 _ 0 7 _ 2 0 1 7 | Einddatum | 0 1 _ 0 7 _ 2 0 2 2 | | |
| Startdatum | 0 1 _ 0 7 _ 2 0 1 7 | | | | | | | |
| Einddatum | 0 1 _ 0 7 _ 2 0 2 2 | | | | | | | |
| 3.2 | Wat is de titel van het project? | Dynamic intravital imaging of breast cancer cell invasion and metastasis | | | | | | |
| 3.3 | Wat is de titel van de niet-technische samenvatting? | De invloed van cel-cel adhesie eiwitten op het uitzaaiingsproces van borstkanker | | | | | | |
| 3.4 | Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt? | <table border="1"> <tr> <td>Naam DEC</td> <td>RU DEC</td> </tr> <tr> <td>Postadres</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> </table> | Naam DEC | RU DEC | Postadres | [REDACTED] | E-mailadres | [REDACTED] |
| Naam DEC | RU DEC | | | | | | | |
| Postadres | [REDACTED] | | | | | | | |
| E-mailadres | [REDACTED] | | | | | | | |

4 Betaalgegevens

4.1	Om welk type aanvraag gaat het?	☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.287,00 Lege ☐ Wijziging € Lege
4.2	Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen. <i>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.</i>	☐ 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 en 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. <table> <tr> <td>Naam</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td>Instantie voor dierenwelzijn</td> </tr> <tr> <td>Plaats</td> <td>Nijmegen</td> </tr> <tr> <td>Datum</td> <td>0 1 - 0 6 - 2 0 1 7</td> </tr> <tr> <td>Handtekening</td> <td></td> </tr> </table>	Naam		Functie	Instantie voor dierenwelzijn	Plaats	Nijmegen	Datum	0 1 - 0 6 - 2 0 1 7	Handtekening	
Naam												
Functie	Instantie voor dierenwelzijn											
Plaats	Nijmegen											
Datum	0 1 - 0 6 - 2 0 1 7											
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.zbo-ccd.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.	Dynamic intravital imaging to study the role of [REDACTED] in breast cancer cell invasion and metastasis

2 Categories

2.1	Please tick each of the following boxes that applies to your project.	☒ Basic Research ☐ Translational or applied research ☐ Regulatory use of 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.

Metastasis, in which cancer transitions from a local to a systemic disease, is fundamental to mortality of breast cancer and all other carcinomas. Cancer cells invade the tissue surrounding the primary tumor to metastasize during early phases of cancer disease. Furthermore cancer cells can evade and disseminate from metastases, and cause new metastases and disease progression. Thus, understanding the mechanisms of metastatic progression is relevant for early and late-stage cancer disease; consequently, research dissecting the steps and mechanisms of metastasis is critical for successful molecular targeting of metastasis in high-risk patients and at any stage of already metastatic disease.

The metastatic cascade is a complex multistep process involving different tissues at different times. The steps include dissemination of cancer cells from the primary tumor, invasion of local tissue to reach blood vessels, intravasation, survival in the circulation, extravasation and colonization of distant organs. Each of the tissues traversed consists of different components, like fibrous extracellular matrix (ECM) of different densities and compositions, blood vessels, nerve bundles and muscle fibers, cell types like fibroblasts and immune cells, and different chemical environments including growth factors and chemokines. Consequently, these steps all impose their own requirements on the migrating tumor cells for survival and metastasis. Therefore, major interest of the laboratory focuses on the mechanisms that enable (i) local tissue invasion, (ii) entering circulation of the blood system, and (iii) successful arrival of cells at distant sites to establish secondary tumors. Importantly, all these steps occur in the living organism and cannot be recapitulated by *in vitro* models alone in sufficient detail for the analysis of their underlying mechanisms and relevance for therapy. Therefore, further investigations critically depend upon research in higher vertebrates. Despite intensive research, many of these steps are still poorly characterized.

The original paradigm of cancer cell invasion stated that all cancers disseminate individually after losing [REDACTED] and other epithelial features in a process called epithelial-mesenchymal transition (EMT). Contrary to this notion, recent accumulating evidence shows that collective migration is an important strategy by which cancer cells locally invade tissue, survive in the bloodstream and establish colonies at secondary sites

[1,2,3,4]. In collective migration, the same processes that occur in migration of individual cells, such as local matrix remodeling, traction force generation and sensing of guidance cues, occur at a multicellular level. In order to move as a group, cancer cell collectives require [REDACTED], which maintain cluster integrity while ensuring mobility of the group [9], particularly [REDACTED] mediated by [REDACTED] which is the main [REDACTED] molecule in mammary and all other epithelia. Thus uncertainty exists about the occurrence and mechanisms of both modes of migration, as well as their relative contributions to metastasis and the requirement of [REDACTED] in cancer cell invasion.

To form [REDACTED], including [REDACTED], directly interact with the cytosolic protein [REDACTED] (hereafter referred to as [REDACTED], and this interaction is required to stabilize [REDACTED]. In addition to strengthening [REDACTED] fulfills multiple other functions, including controlling cell motility through the activity of the [REDACTED] and after translocation into the nucleus the regulation of several transcription factors, such as [REDACTED] and [REDACTED] which control the expression of inflammatory cytokines and cell survival. Whether [REDACTED] contributes to cancer metastasis is unclear.

Based on preliminary data from the previous project studying the role of [REDACTED] in local invasion and metastasis (RU-DEC 2011-039), an unexpected function of [REDACTED] in supporting collective invasion and, in one cell model, enhanced metastasis was found. After orthotopic implantation of non-metastatic [REDACTED], tumors grew more rapidly but did not gain the ability to metastasize. In [REDACTED] tumors, invasion was largely undiminished after [REDACTED] knockdown, but metastatic ability impaired. As we found out after the experiments were completed, the analysis of circulating tumor cells (CTCs) was unfortunately inconclusive, for technical reasons. The [REDACTED] to obtain peripheral blood resulted in contamination with epidermal cells, which stained cytokeratin positive and imposed as false-positive events confounding circulating breast cancer cell counts. Therefore, this dataset needs to be repeated by a more reliable puncture route [REDACTED] for longitudinal analysis; [REDACTED] at end-point).

These combined preliminary data strongly suggest a metastasis-enhancing role of cell-cell cooperation, mediated by [REDACTED], and conflicts with published work on [REDACTED] as a cancer suppressor gene.

Based on these results, we pursue the new hypothesis that [REDACTED] support the metastatic cascade. Using a dual strategy, we first aim to verify the preliminary results on the function of [REDACTED] by additional experiments and improved CTC analysis strategy. In addition to [REDACTED] we aim to validate the function of [REDACTED] in metastasis, by targeting [REDACTED] as a non-redundant [REDACTED] protein.

This in-depth analysis on the role of [REDACTED] in metastasis will provide definitive proof and mechanistic insight into how [REDACTED] support metastatic progression.

A poorly understood aspect of [REDACTED] is its [REDACTED]. The usage of [REDACTED] leads to the expression of multiple [REDACTED] that differ in [REDACTED]. The two most common [REDACTED], exhibit cell type-specific expression patterns. [REDACTED] is often expressed in [REDACTED] and [REDACTED] as well as in [REDACTED] and neuronal cells. [REDACTED] on the other hand, is mainly expressed in [REDACTED] cells. [REDACTED] are functionally distinct, as they each have unique binding partners (e.g. [REDACTED] [5] and [REDACTED] [6]), and differ in affinity for shared binding partners (e.g. [REDACTED] [7]). The induction of EMT causes a switch from [REDACTED] to [REDACTED] expression, and increased motility has been observed in cells lines expressing [REDACTED] *in vitro* [8]. Combined with the EMT paradigm, this has led

to the view that cancer cells, when gaining migratory properties, acquire a single cell phenotype and switch from [REDACTED] to [REDACTED]. These data implicate differentially expressed [REDACTED] in [REDACTED] regulation in cancer cells during invasion and metastasis *in vivo*.

Deviating from the EMT paradigm, using the first [REDACTED]-specific antibody which we recently developed, we found that the expression of [REDACTED] but not [REDACTED] is increased at the invasive front of breast tumors in histological sections in patient samples and in migrating groups of breast cancer cells *in vitro*, whereas [REDACTED] expression is reduced or lost. Thus, specific upregulation of [REDACTED] and/or down-regulation of [REDACTED] may increase invasive potential, possibly by tuning [REDACTED] strength. This concept is supported by our recent finding that the [REDACTED] ratio in invading regions is increased in patients that suffered from distant metastases. This indicates that [REDACTED] expression is a clinically relevant factor in breast cancer metastasis. Furthermore, using targeted downregulation of [REDACTED] in breast cancer cells *in vivo*, we found that the cells showed reduced capacity to metastasize to the lung, indicating that the relevance of [REDACTED] in breast cancer is complex and that certain [REDACTED] types, i.e. those containing [REDACTED] and [REDACTED] may actually enhance metastasis.

Thus, our preliminary data suggest that [REDACTED] critically influences the metastatic ability of tumor cells *in vivo*.

To validate these findings and identify mechanisms to inhibit this process, the following questions will be addressed in this study: 1) Do collective and single cell migration modes lead to different metastatic efficiency? 2) Do [REDACTED] promote or limit the efficacy of invasion into the mammary gland?

Furthermore, preliminary data suggest that migrating tumor cells differentially express [REDACTED]. In this study, we aim to elucidate the effects of [REDACTED] expression on [REDACTED], cancer cell invasion and metastasis in the complex environments of the body.

References:

1. Bronsert, P *et al.*, Cancer cell invasion and EMT marker expression: a three-dimensional study of the human cancer-host interface, *J Pathol* 234: 410–422 (2014)
2. Cheung, K *et al.*, Polyclonal breast cancer metastases arise from collective dissemination of keratin 14-expressing tumor cell clusters, *PNAS* vol 113 no 7 E854-E863 (2016)
3. Khalil, A *et al.*, Unpublished work
4. Friedl, P *et al.*, Tumour cell invasion and migration: Diversity and escape mechanisms, *Nature Reviews Vol 3* (2003)

9. Venhuizen and Zegers (2017), Making heads or tails of it: Cell-Cell Adhesion in Cellular and Supracellular Polarity in Collective Migration, *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017 Feb 28

3.2 Purpose

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

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

The main objective of this study is to elucidate the roles of [REDACTED]-based [REDACTED] and [REDACTED] in the different steps of breast cancer cell invasion and metastasis. We will accomplish this by using established cell models for metastatic breast cancer, which were genetically engineered to lack [REDACTED] or selectively express either [REDACTED] in a KO background.

We will study the passage of these cell lines through the different steps of the metastatic cascade in the following way:

- 1) local tissue invasion: an orthotopic mammary imaging window model set-up in our lab allows us to apply intravital multiphoton microscopy (MPM) over a time course of multiple days together with end-point [REDACTED] for imaging of local tissue invasion and tumor-cell intravasation into the vasculature of the same mouse;
 - 2) successful entry into the vasculature and circulation: circulating tumor cells (CTCs) in the peripheral blood will be isolated and quantified, as well as [REDACTED] status;
 - 3) the frequency of reaching the lungs and other organs, survive and/or establish metastatic outgrowth:
- Metastatic outcome analysis will be achieved by serial sectioning and tumor-cell specific staining of the lungs and other organs, combined with imaging post-processing, metastasis screens and *ex vivo* immunofluorescent techniques.

In recent years we have set up the aforementioned techniques to address each key step of the metastatic cascade. These combined technologies enable the extraction of maximum information from the same animal and obtain mechanistically deep information on how deregulation of [REDACTED] and [REDACTED] affect different steps of the metastatic cascade. The results of this study will increase understanding of the fundamentals of collective breast cancer invasion, which will potentially lead to novel targets for therapeutic intervention.

3.3 Relevance

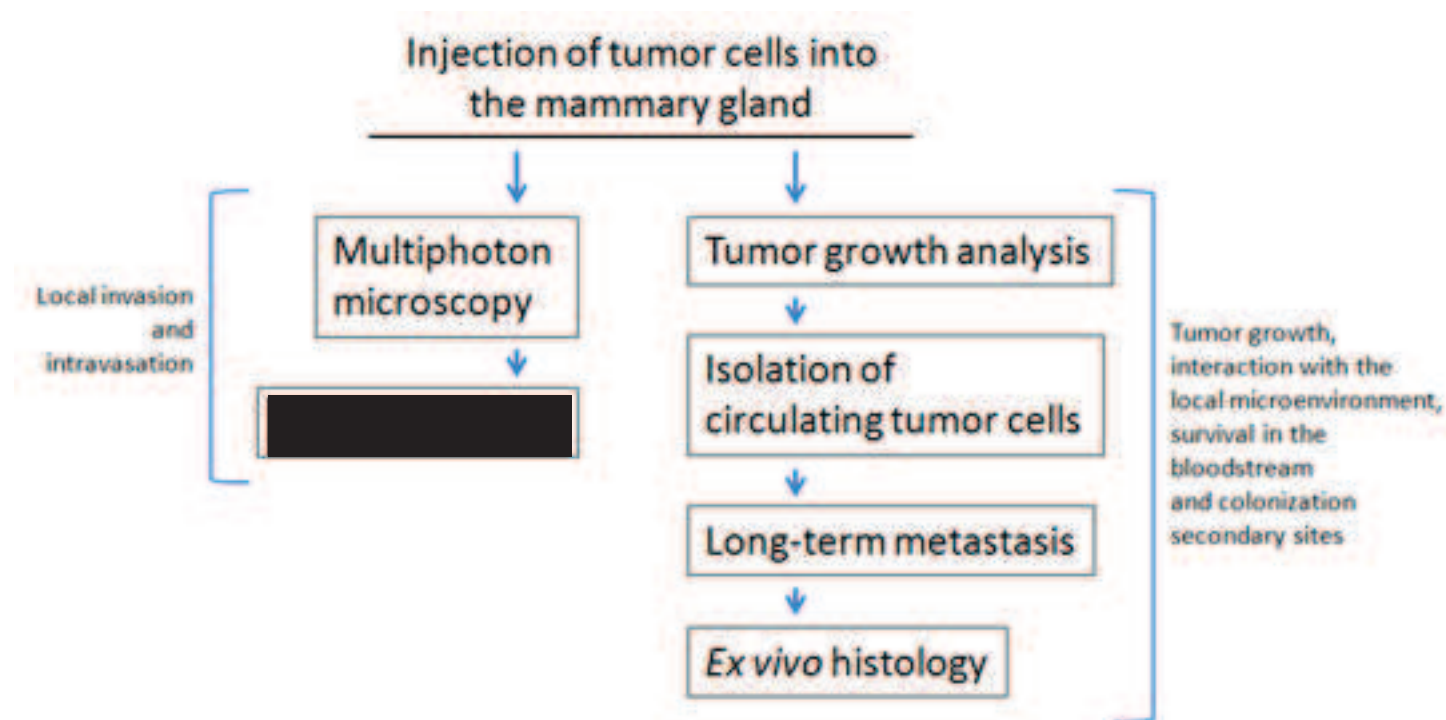
What is the scientific and/or social relevance of the objectives described above?

This study will provide fundamental knowledge about the mechanisms of invasion and metastasis and evaluate potential targets for therapeutic interference in critical steps of the metastatic cascade. Cancer mortality predominantly results from metastatic dissemination of tumor cells coupled to growth and resistance to therapy. Consequently, metastatic progression imposes significant burden to affected individuals from early to late-stage disease, either for medial follow up, different types of (neo)adjuvant treatment, and targeted therapy aiming to cure the disease or, at least, to limit further progression. To date, no therapeutic intervention is available to reduce metastatic propagation during either early or late-stage disease. Thus, addressing the molecular regulation of the metastatic cascade in breast cancer will advance the knowledge on how metastasis proceeds, and by which diagnostic and therapeutic strategies we can target early and/or late-stage metastasis. Because [REDACTED] signalling is strongly linked to growth and survival, a potential scenario of this project could demonstrate strategies to detect aggressive subsets, by differential [REDACTED] and [REDACTED] staining in tumor samples, and/or to silence active metastasis. If inhibition of [REDACTED] indeed causes impaired functions of cancer

cell collectives and compromised ability to invade tissue and metastatic efficacy, future anti-cancer therapeutic approaches might aim to inhibit the function of [REDACTED] and their downstream signals, both strategies currently not considered for (pre)clinical application.

3.4 Research Strategy

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



Tumor cells with fluorescent labels will be injected into the mammary gland of Balb/c mice or nude mice, to monitor subsequent invasion and metastasis. The cells will be genetically modified to express an shRNA against [REDACTED] have a [REDACTED] knock-out or express only one specific [REDACTED]. We will use two complementary strategies, in order to cover the metastatic cascade:

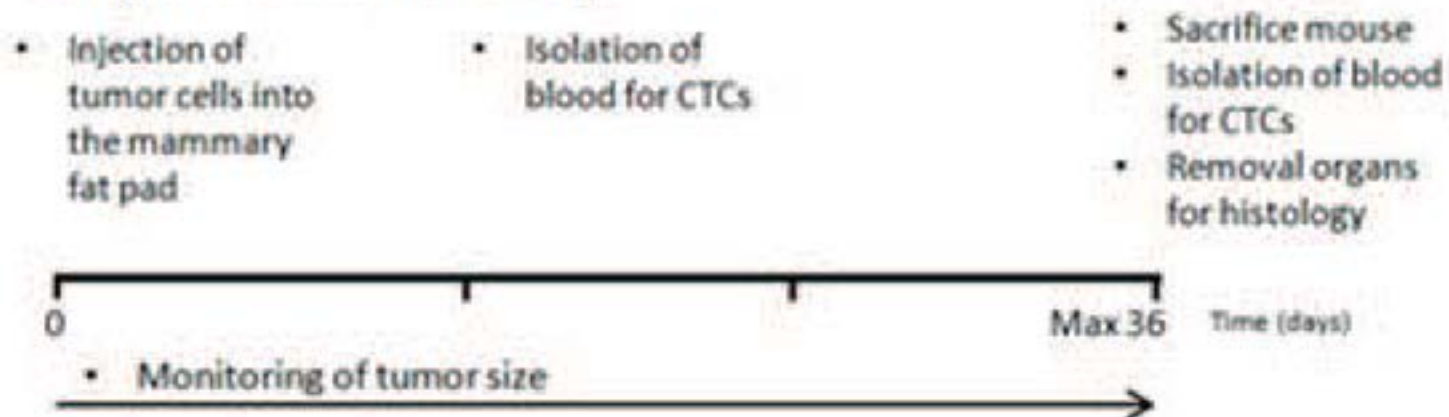
1) in a longitudinal experiment the presence of circulating tumor cells (CTCs) and the formation of metastases will be monitored for up to 36 days. The following parameters will be measured: CTCs; the absolute CTC amount/ml blood and change over time, their [REDACTED] state (individual

or clustered), the growth of primary and secondary tumors, including tumor growth rates, the number, size and location of metastases (including counts for single, dormant cells), the [REDACTED] state (staining of [REDACTED]), the frequency of proliferating cells (geminin staining), neo-vascularization (fluorescence detection of blood vessels) and the response of the tumor microenvironment (collagen deposition, immune cell infiltration). This will provide us with information on the growth of the primary tumor, interaction with its local microenvironment, survival of tumor cells in the bloodstream, and colonization of secondary sites.

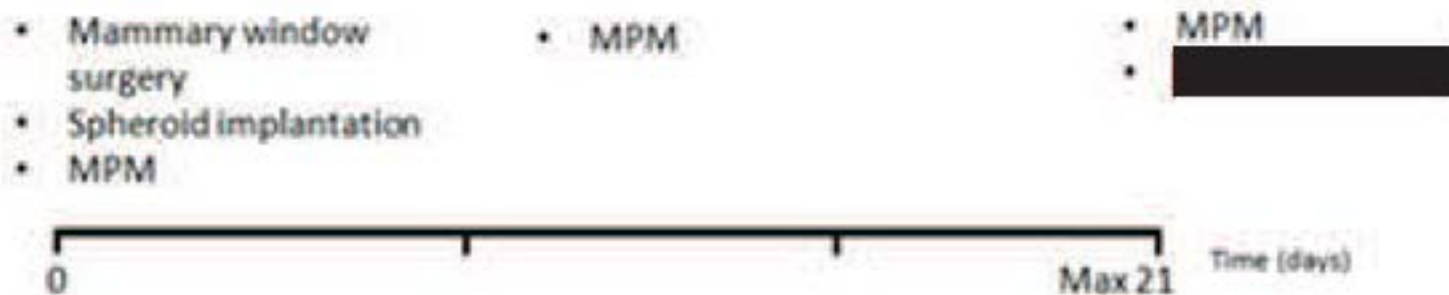
2) The mammary imaging window will be used for intravital microscopy on orthotopic tumors. The mammary window/ multiphoton microscopy (MPM) approach will be used to study mode of migration, route of migration (tissue tracks), speed of migration, cluster dynamics and interaction with the local microenvironment. Using intravital MPM, we will visualize cancer cell invasion into different types of tissue (e.g. fibrous tissue, adipocytes, striated muscle, nerves) by fluorescence and label-free imaging. Additionally, perfused blood vessels will be labeled *in vivo* using fluorescent dextran. All this is imaged in parallel to the fluorescent tumor cells, providing detailed high resolution information on the migration of tumor cells in their pathophysiological environment. [REDACTED] will allow access to regions of the tumor otherwise microscopically inaccessible, and will allow real-time monitoring of intravasation. This will give us information on the dynamics of local invasion and interaction with the microenvironment, and intravasation.

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.

Longitudinal metastasis study



Invasion study



The longitudinal metastasis study will involve injection of fluorescent tumor cells into the mammary fat pad. The growth of the tumor will be monitored using whole body fluorescent imaging or caliper measurements. For CTC detection, blood will be drawn from the submandibular vein on day 0 just before tumor cell injection and on other timepoints separated by at least 7 days. At the end of the experiment, under terminal anesthesia [REDACTED], and commonly colonized organs including the mammary glands, lungs, liver, spleen and tibia will be removed for subsequent histology. The invasion study (max. 21 days) will involve mammary window surgery, spheroid implantation and epifluorescence overview imaging on day 0. The tumor will be repeatedly imaged with (time-lapse) multiphoton microscopy to monitor the dynamics of tumor cell invasion into the breast tissue, with a minimum recovery period of 24h between microscopy sessions. [REDACTED] will be performed only under terminal anesthesia.

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

Metastasis is a sequence of events, which can only be understood by monitoring each key step, including (1) local tumor growth, (2) tumor cell mobility / invasion of the local stroma, (3) intravasation into blood vessels of the tumor core or the peri-tumor stroma, (4) survival in the circulation, (5) colonization of distant organs (i.e. lung and liver) and (6) metastatic outgrowth. We use two complementary experimental paths to cover the entire range of steps from the metastatic cascade mentioned above. These strategies will aid in defining the rate-limiting step(s) of the molecular pathway and identify possibilities for therapeutic intervention.

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	Longitudinal metastasis study of breast cancer cells after orthotopic implantation
2	Intravital imaging of breast cancer invasion

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.zbo-ccd.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. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 1	Type of animal procedure Longitudinal metastasis study of breast cancer cells after orthotopic implantation

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.

Metastasis results from reciprocal interactions between tumor cells and different tissue microenvironments, and therefore we use a longitudinal metastasis assay to study multiple steps of the metastatic cascade and end-point colonization of distant tissues and metastatic outgrowth. To study tumor cell migration in its physiological context, we will orthotopically inject tumor cells in the mammary fat pad. We will use two syngenic cell lines, the [REDACTED] and [REDACTED] cell lines, which are derived from the same tumor and are both highly invasive but differ in their [REDACTED]. Additionally, we will use the low-invasive human mammary cancer cell line MCF7. The use of cell lines will allow us to genetically modify them to downregulate [REDACTED] or express single fluorescently tagged [REDACTED], in addition to fluorescent nuclear labels, allowing *in vivo* monitoring of invasion.

As the study of local invasion using a mammary imaging window does not allow monitoring of metastasis over long time frames, we will perform a longitudinal metastasis study to study local growth and invasion, survival in the bloodstream, colonization of distant tissue and ultimate metastatic outgrowth. Growth of the primary tumor and metastatic outgrowth of colonies will be studied by epifluorescent whole-tumor measurement. *Ex vivo* histology will provide additional information about tumor morphology survival and proliferation (e.g. Ki67 proliferation marker and caspase-3 for apoptosis), [REDACTED] expression, the stromal reaction (e.g. by scoring the number and location of fibroblasts and immune cells) and vascularization. As our preliminary study shows that loss of [REDACTED] and retention of [REDACTED] expression in invasive regions correlates with poor prognosis, we expect to see more survival, vascularization and invasion of tumors expressing [REDACTED]. Additionally, we expect to see diminished metastasis after [REDACTED] knock down. Survival in the bloodstream will be monitored by the isolation and quantitative analysis of circulating tumor cells (CTCs). Additionally, microscopic analysis will provide information on the aggregation status, viability and expression levels of [REDACTED] molecules. We expect that expression of [REDACTED] and [REDACTED] will have an effect on the number of CTCs, their aggregation status and viability.

Technique	Primary outcome parameter
Tumor measurement with caliper	• Tumor size • Growth rates
Monitoring of metastasis	• Number • Size • Location
Histology	• Tumor architecture of primary tumor and metastases • Routes of invasion • Extent of invasion • Length of invasion strands • [REDACTED] • Vascularization • Immune infiltration • Proliferation state
CTC isolation	• Amount of CTCs in blood at different time points • Aggregation state of CTCs • [REDACTED]

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

In the **longitudinal metastasis study** (max 36 days), mammary tumor cells ([REDACTED], number dependent on growth characteristics of the cell line) will be injected into the lower right mammary gland of 6- to 24-wk-old mice. Tumor growth and regression is a main parameter to evaluate tumor aggressiveness. Therefore, the tumor volume will be regularly monitored by caliper measurements.

Circulating tumor cells (CTCs) are an early predictive marker for metastasis formation. Therefore, blood will be collected for **isolation of circulating tumor cells** to investigate the number, aggregation state, viability and [REDACTED] protein expression of the CTCs. Blood will be collected in [REDACTED] µl samples ([REDACTED] [REDACTED] by puncture of the [REDACTED] with a minimum recovery period of 1 week in-between collections, or using [REDACTED] at the experimental end point under terminal anesthesia.

Under terminal anesthesia, the mouse will be sacrificed by cervical dislocation without the animal regaining consciousness and organs and tumor tissue will be excised for further immunohistochemical analysis (e.g. screening for micrometastases). To visualize hypoxic tumor regions, the anesthetized mouse will receive pimonidazole (60 mg/kg, i.v.) and Hoechst (20 mg/kg, i.v.) as perfusion control in the terminal imaging session. While Hoechst labels the nuclei of all cells, pimonidazole is selectively reduced in viable but hypoxic cells and can therefore be used as highly specific hypoxia marker by subsequent immunohistochemical staining. Under terminal anaesthesia we will further occasionally test new fluorescent imaging agents to visualize cells of the microenvironment, blood vessels or other tissue structures and their metabolic condition. For some experiments **perfusion fixation** will be applied to optimally preserve the nanotopography of tissue structures.

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

Estimated numbers:

For this project, we expect to use a maximum of 267 mice in 5 years. This estimation is based on the following considerations.

Cell and subvariants:

We will have 3 cell lines, the [REDACTED] and [REDACTED] mammary cancer cell lines, and the human [REDACTED] cell line. 6 subvariants for the [REDACTED] and [REDACTED] cell lines: wild- type control, [REDACTED] (two shRNAs), [REDACTED]. The [REDACTED] cell line does not express [REDACTED] and therefore no [REDACTED] will be performed.

Calculation of animal numbers:

Our primary outcome parameter of the longitudinal metastasis studies will be number of (micro)metastases. The means of the groups will be compared using independent two-tailed student's t-tests (Wilcoxon-Mann-Whitney), which will be corrected for multiple comparisons. In previous experiments, the effect size was 1.1 for [REDACTED] cells. We expect similar effects for [REDACTED] cells. Using Gpower 3 statistical software, the groups size was calculated to be 15 mice per condition with a power set at 0.05 and 0.8, respectively.

Longitudinal metastasis assay ((2 (cell lines) * 6 (subvariants) + 1 (cell line) * 4 (subvariants)) * 15 (group size)) = 240

A dropout rate of 10% is taken into account. This dropout rate may be caused by failed tumor growth, or mice presenting with too much clinical adversity. Correction for dropout rate is done with the following formula: $N = \text{animal} / (1 - \text{dropout rate})$

This places the total number of mice at 267

Considerations for minimization of the number of animals:

Histology and multiple CTC analyses over a longer period of time are compatible with each other and therefore are performed on the same animal.

B. The animals

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

Species. To be able to extrapolate the results of this research to invasion and metastasis in humans, it is necessary that the tumor microenvironment of the model animal is comparable to the mammalian system. While specific mechanistic questions may be answered in models using lower species such as zebrafish, we here aim to study the complex interactions between migrating tumor cells and the host microenvironment which result in metastasis. These processes are further metabolically critical and the cells require 37°C as tissue temperature. Therefore the mouse is used as the lowest possible organism with a tumor microenvironment comparable to humans.

Mouse strains.

In their native microenvironment, migrating tumor cells can encounter immune cells, which potentially shape the microenvironment and affect migration. Therefore, it is preferable to use immunocompetent mouse strains wherever possible. However, previous studies show that immune responses can be raised against cell lines expressing GFP over the course of several weeks¹. In our lab, small tumors of certain cell lines expressing two independent fluorophores for visualization were rejected after 1 week. Due to the preferability of the presence of immune cells, we will start experiments on [REDACTED] and [REDACTED] tumors with immunocompetent mice. Tumor growth will be carefully monitored, and if tumor remission is detected, we will switch to immunodeficient mouse strains.

The [REDACTED] and [REDACTED] tumor cell lines are derived from Balb/c mice and thus, Balb/c mice will be used in these studies to avoid rejection by the endogenous immune system. For the [REDACTED] shRNA studies, [REDACTED] and human [REDACTED] cells are used. To avoid rejection of the human [REDACTED], Balb/c nude mice will be used for these experiments. In case of tumor rejection, [REDACTED] and [REDACTED] cells will be implanted in nude mice, and SCID mice will be used for the [REDACTED].

Since female breast cancer cells are studied we will use female mice. To ensure that the pubertal development of the mammary gland is completed, we will only use mice older than 6 weeks. The maximum age of the mice will be 24 weeks.

Animal numbers. We expect to use a maximum of 267 mice in 5 years. The considerations that led to these numbers can be found in section A3.

References:

1. Bosiljcic *et al.*, Myeloid Suppressor Cells Regulate the Lung Environment - Letter, *Cancer Res*; 71(14) (2011)

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
mus musculus	Balb/c, Balb/c nude, SCID. From commercial supplier	267	6-24 weeks

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: In parallel to the intravital imaging models we have established organotypic assays to study tumor cell migration. This collagen-based migration assay mimics the 3D environment of a solid tumor and supports medium-throughput automated imaging to address the impact of multiple microenvironmental parameters on migration (e.g. collagen density). Additionally, immunofluorescence of tissue sections from human breast tumors were used for hypothesis validation. While we continuously use these models for functional studies, the complexity of reciprocal interactions between microenvironment and tumor cells cannot be mimicked entirely *in vitro* and thus these complementary *in vivo* studies are necessary.

Reduction: Preceding each experiment we routinely perform literature studies to avoid unnecessary repetition of experiments. We design the experiment in such a way that we generate novel data although, sometimes repetition is necessary to obtain up-to-date control data sets to exclude biological drift behavior of the source cells or to confirm hypotheses in our specific model setup and cell lines. In addition, we perform power calculations based on data from previous similar experiments or, if unavailable, based on *in vitro* data, to determine the minimum amount of animals needed. We also consider drop out of animals during the experiment due to experimental procedures, for example surgery, tumor growth or complications with the complex imaging setup. The methods used in this project are all well-established in the group and we can rely on multiple datasets with more than 5 years of experience to calculate or at least estimate group sizes of our experiments.

As a general policy, we design the experimental setup for maximal readout efficiency per mouse without compromising data quality. In the longitudinal experiment group, combining the drawing of blood for CTC detection and histology on organs of the same animal at the end of the experiment reduces the number of animals required. Furthermore, in the local invasion group, the use of the imaging window combined with MPM allows for intravital imaging at multiple time-points to obtain the time-course of tumor development, and using the same animal for [REDACTED] reduces the number of animals needed.

Refinement: In an extensive pilot-phase the discomfort level imposed on the animals carrying a chamber was assessed and resulted in the finding that significant discomfort to the animals is only imposed by the surgical procedure and concomitant injection anesthesia but 48 h after recovery from surgery, all mice showed normal nest building behavior as well as normal grooming and food uptake until the end of the experiment. The MIW was found to be compatible with group housing and the presence of an enriched environment. Moreover, the discomfort for the animals is further minimized by the application of anesthetics, analgesics and diligent care and attention to any sign of discomfort in the animal (described below and in section H.).

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

In order to prevent unnecessary discomfort or stress the general health of the animals will be checked daily by the researchers or the biotechnicians. We provide a detailed experimental setup scheme and welfare forms for each individual mouse in the experiment so that the biotechnicians can easily see in which stage of the experiment the animal is in. If necessary, anesthesia and analgesics will be applied to reduce discomfort. In case animals reach a humane end point the responsible researcher will be contacted and the mouse will be sacrificed on the same day. To keep track of food and water uptake as parameter of wellbeing, the mice will be weighed before the start of the experiment and at least twice per week during the experiment. Weighing frequency will be adjusted to the overall condition of the mice.

The methods applied in this project are well-established in our group and only well-trained researchers will perform the procedures. There are no probable adverse effects on the environment. Lentiviral transduction of cell lines is performed in an ML-II environment with 3rd generation vectors, to make sure that there is no chance of virus replication.

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.

Our intravital imaging platform in combination with the window model and our tumor models, optical reporters and application to study tumor cell migration as well as the biomedical questions addressed are rather unique worldwide. Nevertheless, naturally, we routinely perform literature research and constantly implement new knowledge in our planning of experiments. While aspects of an experiment will overlap with experiments performed in the literature, the aim and uniqueness of our strategy is to add in-depth information on mechanisms of metastasis which cannot be achieved by end-point histology or whole-body imaging of small animals commonly applied in other studies.

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.

Injection of tumor cells will be performed under short-term isoflurane anesthesia

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The most frequently occurring types of discomfort are:

- Stress (code 02, 100 %)- Tumor injections (code 02, 100 %)

- Recovery from short-term isoflurane anesthesia (code 02, 100 %)
- Tumor growth (code 03, 15 %)
- Repeated collection of blood samples <10% TBV (code 02, 100 %)
- Euthanasia (code 02, 100%)

Explain why these effects may emerge.

Stress can be caused by the handling of the animals and injections. In addition, the animals may experience stress from the recovery from anesthesia or tumor growth.

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

Recovery from anesthesia causes discomfort to the animal. However, this is required for cancer cell injection. Anesthesia duration will be minimized. The tumor growth can cause discomfort, especially in case of large tumors or ulcerating tumors. The mice will be checked daily by the researcher or biotechnician and if the tumor causes discomfort, the animal will be taken out of the experiment according to the humane endpoints. Mice will be kept for up to 36 days. Since metastases in lungs or brain can cause discomfort, the mice will be weighed regularly (2x /week). Experiments will be terminated before humane endpoints are reached.

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.

In accordance with the Code of practice - Animal experiments in cancer research by the Netherlands Inspectorate for Health Protection, Commodities and Veterinary Public Health, the animals will be sacrificed upon indications that one of the following conditions will be reached shortly:

1. Animal stopped eating and drinking.
2. Loss of body weight:
 - > 15% in 2 days
 - > 20% in total
3. Animal has difficulties breathing, or circulation problems occur.
4. Behavior and movement of the animal is aberrant.
5. Tumor and/or treatment cause clinical discomfort.
6. Tumor grows too large, $\geq 10\%$ of body weight or a maximum of 2 cm³.
7. Ulceration of the tumor.
8. Animal is expected to die on short term.
9. The endpoint of the experiment is reached.

Indicate the likely incidence.

The most likely humane end points to be reached are clinical discomfort due to the tumor growing too large, or large metastases being established. If these grow too large, it may impede the animal's mobility or cause difficulties in breathing. From previous experience, the likelihood of dropping out is 10%.

K. Classification of severity of procedures

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

We expect that 15% of the mice will experience moderate discomfort due to tumor growth, and 85% will experience mild discomfort due to handling and procedures during the experiment.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

At the end of the study we will collect tumor tissue, blood and organs for metastasis analysis, CTC detection or immunohistochemistry.

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

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

☒ Yes

Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website www.zbo-ccd.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. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 2	Type of animal procedure Intravital imaging of breast cancer invasion

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.

Metastasis results from reciprocal interactions between tumor cells and different tissue microenvironments, and therefore we will perform a local invasion study with intravital microscopy to study the dynamics of local tumor growth, invasion, tissue interaction and extravasation.

To study tumor cell migration in its physiological context, we will orthotopically inject tumor cells in the mammary fat pad. We will use two syngenic cell lines, the [REDACTED] and [REDACTED] cell lines, which are derived from the same tumor and are both highly invasive but differ in their [REDACTED]. Additionally, we will use the low-invasive human mammary cancer cell line MCF7. The use of cell lines will allow us to genetically modify them to downregulate [REDACTED] and [REDACTED] or express single fluorescently tagged [REDACTED], in addition to fluorescent nuclear labels, allowing *in vivo* monitoring of invasion.

Although tumor histology will provide us with valuable end-point information, metastasis is a dynamic process. Therefore, it is important to visualize these dynamic events. To this end, we will employ intravital multiphoton microscopy (MPM). MPM allows us to visualize surrounding tissue structures like muscle fibers and adipocytes using second and third harmonic generation. Based on *in vitro* findings we expect that downregulation of [REDACTED] will result in the switch from collective to individual-cell dissemination. However, in dense matrix collective invasion will persist, irrespective of [REDACTED] status, because tumor cells are pressed together ("jammed"). We expect that [REDACTED] expression has an effect on tumor cluster cohesiveness, shape, plasticity, mode and speed of migration, and will change the physical and cellular composition of the tumor microenvironment. These parameters will be monitored by MPM of tumor cells transduced with a nuclear label and fluorescent [REDACTED], and the detection of the stroma by fluorescent reporters and higher harmonic signal detection. We also expect [REDACTED] and [REDACTED] expression to affect intravasation, as the tumor cells have to [REDACTED] and squeeze through the endothelial layer of the blood vessel during this process which involves a phase of [REDACTED] with the vessel wall. Therefore, we use a [REDACTED] approach which uniquely allows us to monitor intravasation into the neovessels located in deeper regions of the tumor which are not accessible by conventional multiphoton microscopy.

Technique	Primary outcome parameter
MPM	• Speed of migration • Mode of migration • Extent of migration • Morphology of invading strands • Cluster dynamics (movement of tumor cells relative to one another) • Route of invasion/ 3D local microenvironment • Blood vessel perfusion
	• 3D architecture of microscopically inaccessible regions • Real-time imaging of intravasation

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

Mammary imaging windows (MIWs) will be transplanted onto 6- to 12-wk-old mice. The MIW consists of a titanium ring on top of which a glass coverslip is glued. The implantation of MIW includes surgical incision of the skin overlaying the lower right mammary gland; the ring is placed into the incision and fixed by placing the skin within a groove on the side of the ring and further sutured which ensures its fixation. 5-7 spheroids each containing [REDACTED] cells are implanted in the mammary gland at least 2 mm from each other (injecting more spheroids or closer together may lead to spheroid fusion and interfere with the experiment).

The tumor volume will be regularly monitored by caliper measurements or **epifluorescence overview imaging**. Epifluorescence imaging frequencies will be adjusted to the growth/regression rate of the tumor; usually, epifluorescence overviews are taken 1x to 3x / week.

Further, the tumor will be repeatedly imaged with (time-lapse) **multiphoton microscopy (MPM)** to monitor the dynamics of tumor cluster migration and interaction with the local microenvironment at subcellular resolution. Imaging sessions will not exceed 4 h (except under terminal anesthesia), and are performed max. 3 times per week with a minimum recovery period of 24 h. Outcome parameters include sub-regional tumor cell mobility as single cells or clusters, along with analysis of the 3D microenvironment such as adipose tissue, fibrous tissue and striated muscle. In a parallel project (RU-DEC 2014-031) we are currently developing a [REDACTED] which can be [REDACTED] into the tumor and allows multiphoton image acquisition in the tumor core at depths of up to 1 cm. Once this technique is established we will apply it in this project to monitor intravasation and migration in microscopically inaccessible regions in the terminal imaging session. [REDACTED] is only performed under terminal anesthesia.

Further, we are constantly generating and evaluating **molecular optical reporters** for single-cell readout of e.g. tumor cell viability and environmental conditions, such as pH or hypoxia, to enhance the information we acquire during imaging or to address specific microenvironmental targets which we identified in *in vitro* studies. These optical reporters are extensively studied in our *in vitro* models and once successful stable cell lines are generated they will be implemented in the intravital imaging routines. During multiphoton imaging, **fluorescent contrast agents** will be applied by i.d., i.p., i.v. or r.o. injection, including fluorescent high-molecular weight dextran for visualizing blood vessels, low-molecular-weight-dextran for assessing vascular leakage, optical protease probes, and/or fluorescent antibodies or lectins to label specific structures or cells. The appropriate optical imaging agent will be selected for the specific experiment and research question and maximal injection volumes and concentrations will be used according to the datasheet and the animal welfare guidelines. The area of optical reporter development is a fast-moving field and we will constantly review literature and integrate new, improved reporters to enhance the quality and biomedical depth of our experiments. Circulating tumor cells (CTCs) are an early predictive marker for metastasis formation. Therefore, in a subset of mice, blood will be collected for **isolation of circulating tumor cells** to investigate the number and aggregation state of the CTCs. Blood will be collected in [REDACTED] samples [REDACTED] TBV) by puncture of the [REDACTED] with a minimum recovery period of 1 week in-between collections, or using puncture of the heart at the experimental end point under terminal anesthesia.

Under **terminal anesthesia**, the mouse will be sacrificed by cervical dislocation without the animal regaining consciousness and organs and tumor tissue will be excised for further immunohistochemical analysis (e.g. screening for micrometastases). To visualize hypoxic tumor regions, the anesthetized mouse will receive pimonidazole (60 mg/kg, i.v.) and Hoechst (20 mg/kg, i.v.) as perfusion control in the terminal imaging session. While Hoechst labels the nuclei of all cells, pimonidazole is selectively reduced in viable but hypoxic cells and can therefore be used as highly specific hypoxia marker by subsequent immunohistochemical staining. In the terminal imaging session we will further occasionally test new fluorescent imaging agents to visualize cells of the microenvironment, blood vessels or other tissue structures and their metabolic condition. For some experiments **perfusion fixation** will be applied to optimally preserve the nanotopography of tissue structures.

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

Estimated numbers:

For this project, we expect to use a maximum of 275 mice in 5 years. This estimation is based on the following considerations

Cell and subvariants:

We will have 3 cell lines, the [REDACTED] and [REDACTED] mammary cancer cell lines, and the human [REDACTED] cell line. 6 subvariants for the [REDACTED] and [REDACTED] cell lines: wild- type control, [REDACTED] (two shRNAs), [REDACTED]. The [REDACTED] cell line does not express [REDACTED] and therefore no [REDACTED] will be performed.

Calculation of animal numbers:

For the dynamic invasion studies, the primary outcome parameter will be speed of movement and morphology criteria of invasive cancer strands. The groups will be compared using independent two-tailed student's t-tests and post-hoc correction for multiple comparisons. As the local microenvironment is highly heterogeneous, we expect an effect size of 0.6, yielding a total of 47 invasive strands per group. As we expect to be able to image 3-4 invasive regions per mice, the group size will be 13 mice.

Local invasion assay ((2 (cell lines) * 6 (subvariants) + 1 (cell line) * 4 (subvariants)) * 13 (group size)) = 208

A 20% dropout rate is taken into account. This dropout rate is caused by biological and technical factors, such as failure of tumor growth and invasion, but also inflammation of the mammary window or difficulties with imaging.

Correction for dropout rate is done with the following formula: $N = \text{animal} / (1 - \text{dropout rate})$

Accounting for the dropout rate and a group of 15 mice for MIW technique training makes a total of 275 mice.

Considerations for minimization of the number of animals:

The use of the MIW with MPM allows dynamic imaging at multiple time-points in the same mouse, which increases the richness of depth and reduces the number of animals required. As insertion of the [REDACTED] during [REDACTED] damages the tumor tissue (microtrauma) and might change its behavior thereafter, it will be carried out after the final MPM session.

B. The animals

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

Species.

To be able to extrapolate the results of this research to invasion and metastasis in humans, it is necessary that the tumor microenvironment of the model animal is comparable to the mammalian system. While specific mechanistic questions may be answered in models using lower species such as zebrafish, we here aim to study the complex interactions between migrating tumor cells and the host microenvironment which result in metastasis. These processes are further metabolically critical and the cells require 37°C as tissue temperature. Therefore the mouse is used as the lowest possible organism with a tumor microenvironment comparable to humans.

Mouse strains.

In their native microenvironment, migrating tumor cells can encounter immune cells, which potentially shape the microenvironment and affect migration. Therefore, it is preferable to use immunocompetent mouse strains wherever possible. However, previous studies show that immune responses can be raised against cell lines expressing GFP over the course of several weeks¹. In our lab, small tumors of certain cell lines expressing two independent fluorophores for visualization were rejected after 1 week. Due to the preferability of the presence of immune cells, we will start experiments on [REDACTED] and [REDACTED] tumors with immunocompetent mice. Tumor growth will be carefully monitored, and if tumor remission is detected, we will switch to immunodeficient mouse strains.

The [REDACTED] and [REDACTED] tumor cell lines are derived from Balb/c mice and thus, Balb/c mice will be used in these studies to avoid rejection by the endogenous immune system. For the [REDACTED] shRNA studies, [REDACTED] and human [REDACTED] cells are used. To avoid rejection of the human [REDACTED], Balb/c nude mice will be used for these experiments. In case of tumor rejection, [REDACTED] and [REDACTED] cells will be implanted in nude mice, and SCID mice will be used for the [REDACTED]

Since female breast cancer cells are studied we will use female mice. To ensure that the pubertal development of the mammary gland is completed, we will only use mice older than 6 weeks. The maximum age of the mice will be 24 weeks.

Animal numbers.

We expect to use a maximum of 275 mice in 5 years. The considerations that led to these numbers can be found in section A3.

References:

1. Bosiljcic et al., Myeloid Suppressor Cells Regulate the Lung Environment - Letter, Cancer Res; 71(14) (2011)

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
mus musculus	Balb/c, Balb/c nude, SCID From commercial supplier	275	6-24 weeks

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: In parallel to the intravital imaging models we have established organotypic assays to study tumor cell migration. This collagen-based migration assay mimics the 3D environment of a solid tumor and supports medium-throughput automated imaging to address the impact of multiple microenvironmental parameters on migration (e.g. collagen density). Additionally, immunofluorescence of tissue sections from human breast tumors were used for hypothesis validation. While we continuously use these models for functional studies, the complexity of reciprocal interactions between microenvironment and tumor cells cannot be mimicked entirely *in vitro* and thus these complementary *in vivo* studies are necessary.

Reduction: Preceding each experiment we routinely perform literature studies to avoid unnecessary repetition of experiments. We design the experiment in such a way that we generate novel data although, sometimes repetition is necessary to obtain up-to-date control data sets to exclude biological drift behavior of the source cells or to confirm hypotheses in our specific model setup and cell lines. In addition, we perform power calculations based on data from previous similar experiments or, if unavailable, based on *in vitro* data, to determine the minimum amount of animals needed. We also consider drop out of animals during the experiment due to experimental procedures, for example surgery, tumor growth or complications with the complex imaging setup. The methods used in this project are all well-established in the group and we can rely on multiple datasets with more than 5 years of experience to calculate or at least estimate group sizes of our experiments.

As a general policy, we design the experimental setup for maximal readout efficiency per mouse without compromising data quality. In the longitudinal experiment group, combining the drawing of blood for CTC detection and histology on organs of the same animal at the end of the experiment reduces the number of animals required. Furthermore, in the local invasion group, the use of the imaging window combined with MPM allows for intravital imaging at multiple time-points to obtain the time-course of tumor development, and using the same animal for [REDACTED] reduces the number of animals needed.

Refinement: The MIW was found to be compatible with group housing and the presence of an enriched environment. Moreover, the discomfort for the animals is further minimized by the application of anesthetics, analgesics and diligent care and attention to any sign of discomfort in the animal (described below and in section H.).

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

In order to prevent unnecessary discomfort or stress the general health of the animals will be checked daily by the researchers or the biotechnicians. We provide a detailed experimental setup scheme and welfare forms for each individual mouse in the experiment so that the biotechnicians can easily see in which stage of the experiment the animal is in. If necessary, anesthesia and analgesics will be applied to reduce discomfort. In case animals reach a humane end point the responsible researcher will be contacted and the mouse will be sacrificed on the same day.

To keep track of food and water uptake as parameter of wellbeing, the mice will be weighed before the start of the experiment and at least twice per week during the experiment. Weighing frequency will be adjusted to the overall condition of the mice and increased e.g. after surgery or during therapy and imaging periods.

The mice will receive Carprofen (5 mg/kg), as s.c. injection 30 min before the surgery and after 24h During anesthesia (surgery and imaging) the mice will be placed on a warm plate to prevent heat loss and will receive NaCl injections to avoid dehydration. Following the application of the imaging window, the mice will be housed in groups in a cage with ample nesting material. To

minimize discomfort to the animal each imaging session will not exceed 4 h per mouse and a minimum recovery period of 24 h is maintained between imaging sessions. The mice will be imaged at a maximum 3x / week. Only in the terminal imaging session, in which the mouse will be sacrificed under anesthesia without regaining consciousness, imaging time might exceed 4 h. Thereby the possibility to acquire more imaging fields and longer timelapse series will strengthen the results. During anesthesia mice will receive subcutaneous normal saline injections to prevent dehydration and to reduce trauma.

The methods applied in this project are well-established in our group and only well-trained researchers will perform the procedures.

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.

Our intravital imaging platform in combination with the window model and our tumor models, optical reporters and application to study tumor cell migration as well as the biomedical questions addressed are rather unique worldwide. Nevertheless, naturally, we routinely perform literature research and constantly implement new knowledge in our planning of experiments. While aspects of an experiment will overlap with experiments performed in the literature, the aim and uniqueness of our strategy is to add in-depth information on mechanisms of metastasis which cannot be achieved by end-point histology or whole-body imaging of small animals commonly applied in other studies.

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.

The mice will receive Carprofen, as s.c. injection 30 min before the surgery and 24h thereafter. During anesthesia (surgery and imaging) the mice will be placed on a warm plate to prevent heat loss and will receive NaCl injections to avoid dehydration.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

- Stress (code 02, 100 %)- Repeated recovery from anesthesia (following surgery and imaging) (code 03, 100 %)
- Injections (code 02, 100 %)
- Recovery from surgery for mammary window application (code 03, 100 %)
- Repeated collection of blood samples <10% TBV (code 02, 100 %)
- Tumor growth (code 03, 15 %)
- Euthanasia (code 02, 100%)

Explain why these effects may emerge.

Stress can be caused by the handling of the animals and injections. In addition, the animals will experience stress from the recovery from anesthesia after surgery and the imaging procedure. Experience of pain will be related to injections of imaging agents and the surgical procedure for application of the MIW.

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

Recovery from anesthesia causes discomfort to the animal. However, this is required for imaging and surgery. Anesthesia duration will be minimized and whenever possible multiple biotechnical procedures will be combined (e.g. injection optical contrast agents, overview epifluorescence and multiphoton imaging). In order to minimize discomfort, the maximum number of times an animal recovers from long-term anesthesia is 3x / week, and after the last imaging session the animal will be euthanized without recovering from anesthesia. During anesthesia the animal will be placed on a warm plate to prevent heat loss and will receive regular NaCl injections to compensate for loss of fluids.

The tumor growth can cause discomfort, especially in case of large tumors or ulcerating tumors. In most cases of intravital imaging of invasion, we only need small tumors (1-4 mm in diameter). Therefore, the average tumor burden and related discomfort is low in most experiments. In this case, the mice will be checked daily by the researcher or biotechnician and if the tumor causes discomfort, the animal will be taken out of the experiment according to the humane endpoints. Mice will be kept for up to 21 days. Since metastases in lungs or brain can cause discomfort, the mice will be weighted regularly (2x /week). Experiments will be terminated before humane endpoints are reached.

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.

1. Animal stopped eating and drinking.
2. Loss of body weight: > 15% in 2 days or >20% from starting weight
3. Animal has difficulties breathing, or circulation problems occur.
4. Behavior and movement of the animal is aberrant.
5. Tumor and/or treatment cause clinical discomfort.
6. Tumor grows too large, $\geq 10\%$ of body weight or a maximum of 2 cm³.
7. Ulceration of the tumor.
8. Animal is expected to die on short term.
9. The endpoint of the experiment is reached.

Experiment- / model-specific humane endpoints:

1. Inflammation or bleedings within the imaging window at levels which usually do not appear to cause discomfort of the mouse but preclude imaging.

Indicate the likely incidence.

The most likely premature end point to be met in these studies is inflammation in the imaging window (low discomfort for the animal but precludes imaging and perturbs meaningful biology). Inflammation usually becomes apparent shortly after surgery of the imaging window and causes an early drop-out rate (10 %) which however imposes only low discomfort to the animal due to the immediate termination of the experiment.

K. Classification of severity of procedures

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

We expect that mice in experiments will experience moderate discomfort due to repeated recovery from anesthesia necessary for MIW application and imaging and associated injections.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

At the end of the study we will collect tumor tissue, blood and organs for metastasis analysis, CTC detection or immunohistochemistry.

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

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

☒ Yes

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: 2017-0005
2. Titel van het project: Dynamic intravital imaging to study the role of [REDACTED] in breast cancer cell invasion and metastasis
3. Titel van de NTS: De invloed van cel-cel adhesie eiwitten op het uitzaaiingsproces van borstkanker
4. Type aanvraag:
 - ☒ nieuwe aanvraag projectvergunning
 - ☐ wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: RUDEC
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED], bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ☒ ontvangen door DEC: 22-02-2017
 - ☐ aanvraag compleet
 - ☒ in vergadering besproken: 07-03-2017
 - ☐ anderszins behandeld
 - ☒ termijnonderbreking(en) van 13-03-2017 tot 10-05-2017
 - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - ☒ aanpassing aanvraag: 10-05-2017
 - ☒ advies aan CCD: 01-06-2017
7. De inhoud van dit project is afgestemd met de IvD en deze heeft geen bezwaren tegen de uitvoering van het project binnen deze instelling.
8. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
9. Correspondentie met de aanvrager:
 - Datum vragen: 13-03-2017
 - Datum antwoorden: 10-05-2017
 - Gestelde vragen en antwoorden:

Project Proposal:

-1.3:De titel is erg algemeen gesteld en past beter bij een onderzoeksprogramma. Het doel van dit onderzoek is niet de imaging, maar het achterhalen van de rol van [REDACTED] en [REDACTED] in het metastaseringsproces. De commissie raadt de aanvragers aan een andere titel te kiezen.

Antwoord: The title was changed to 'Dynamic intravital imaging to study the role of [REDACTED] in breast cancer cell invasion and metastasis'

-3.1: Het is niet duidelijk hoe de inleiding aansluit op de gekozen doelstelling. Een afsluitende alinea waaruit blijkt welke hypothesen de aanvragers willen onderzoeken ontbreekt.

Antwoord: An extra paragraph has been added to conclude the introduction. In addition, see the reply below for preliminary data leading up to the hypotheses.

-3.1: Aan het slot van de derde alinea worden twee onderzoeksvragen geformuleerd. Hoe zullen de onderzoekers vraag 1 adresseren? Dit komt niet heel duidelijk naar voren in de aanvraag.

Antwoord: Based on preliminary data from the previous project studying the role of [REDACTED] in local invasion and metastasis (RU-DEC 2011-039), an unexpected function of [REDACTED] in supporting collective invasion and, in one cell model, enhanced metastasis was found. After orthotopic implantation of non-metastatic [REDACTED] cells, tumors grew more rapidly but did not gain the ability to metastasize. In [REDACTED] tumors, invasion was largely undiminished after [REDACTED] knockdown, but metastatic ability impaired. As we found out after the experiments were completed, the analysis of circulating tumor cells (CTCs) was unfortunately inconclusive, for technical reasons. The [REDACTED] to obtain peripheral blood resulted in contamination with epidermal cells, which stained cytokeratin positive and imposed as false-positive events confounding circulating breast cancer cell counts. Therefore, this dataset needs to be repeated with a more reliable puncture route ([REDACTED]).

These combined preliminary data strongly suggest a metastasis-enhancing role of cell-cell cooperation, mediated by [REDACTED], and conflicts with published work on [REDACTED] as a cancer suppressor gene.

Based on these results, we pursue the new hypothesis that [REDACTED] support the metastatic cascade. Using a dual strategy, we first aim to verify the preliminary results on the function of [REDACTED] by additional experiments and improved CTC analysis strategy. In addition to [REDACTED], we aim to validate the function of [REDACTED] in metastasis, by targeting [REDACTED] as a non-redundant [REDACTED] protein.

This in-depth analysis on the role of [REDACTED] in metastasis will provide definitive proof and mechanistic insight into how [REDACTED] support metastatic progression.

-3.1: Is er niet al veel voorwerk gedaan (onder andere door deze groep) naar het effect van [REDACTED]? De commissie mist de beschrijving daarvan.

Antwoord: This has been described in the reply above, and has also been added to the documents.

-3.2: Er worden drie technieken genoemd waarmee het effect van [REDACTED] op metastasering onderzocht zal worden. Het toepassen van een techniek is een middel om een doel te bereiken.

Kunnen de onderzoekers dit herformuleren als 'objectives'? Op die manier wordt ook duidelijker welke 'objectives' de aanvragers bedoelen in de eerste zin van de volgende paragraaf.

Antwoord: The section has been rewritten in order to clarify what the main objective is, and how the used techniques fit into this objective.

-3.4.2: De tumorgroei in de dieren in de invasie studie wordt meerdere keren per week gedurende meerdere weken gevolgd, waarvoor het dier telkens langdurig onder anesthesie gaat. De commissie kan zich voorstellen dat de stresshormonen die hierdoor vrijkomen en de

anesthesiemiddelen zelf een effect op de tumorgroei zullen hebben. Zijn de onderzoekers van plan om stresshormonen te meten? Is een extra controlegroep, die niet steeds onder anesthesie gaat, niet noodzakelijk om te controleren voor het effect van de herhaalde langdurige anesthesie?

Antwoord: We have addressed this point in a pilot study at the CDL in Nijmegen in 2010. We compared tumor growth in mice with and without repeated imaging (3x per week) and found no difference between the two groups. Furthermore, the mice in all the conditions will be subjected to precisely the same regime of anaesthetics and will experience the same levels of stress.

-3.4.2: Er worden twee studies gedaan: Een metastase studie van maximaal 36 dagen en een invasie studie van maximaal 21 dagen. Naar de mening van de commissie ligt het meer voor de hand om elke studie in een aparte DAP te beschrijven. Dit zou de navolgbaarheid van de bijlage(n) met dierproeven ten goede komen. (zie ook de algemene opmerking over de bijlage waarin de dierproeven zijn beschreven).

Antwoord: The two experimental strategies have now been described separately in section 3.4.4 under the following titles: 1) Longitudinal metastasis study of breast cancer cells after orthotopic implantation and 2) Intravital imaging of breast cancer invasion.

-3.4.2: Bloedafname via de [REDACTED] is bij knaagdieren niet gebruikelijk. Waarom willen de onderzoekers dit bloedvat gebruiken?

Antwoord: This was a mistake. It has been changed to only the [REDACTED].

Description of Animal Procedures:

-Algemene opmerking: de commissie adviseert u twee bijlagen te maken, omdat het twee verschillende diermodellen / studies betreft.

Antwoord: The comment has been implemented.

-A2: Toediening van contrastmiddel kan op meerdere manieren plaatsvinden. Waarom willen de onderzoekers het mogelijk retro-orbitaal toedienen als zij het ook i.v. kunnen toedienen?

Antwoord: In order to administer contrast agents intravenously, the mice need to be placed in a warm chamber to dilate the blood vessels in the tail vein. Some contrast agents need to be administered during imaging, which precludes extra warming of the mice, and makes intravenous injections difficult. Retro-orbital injection is possible during imaging, and therefore some contrast agents need to be administered retro-orbitally.

-A: Is 20% failure rate niet wat hoog, en waar wordt deze door veroorzaakt? Is deze voor beide studies even groot? De gehanteerde berekening om te compenseren voor 20% uitval is niet adequaat.

Antwoord: The 20 % failure rate is based on extensive previous experience with the imaging window and intravital imaging experiments. It accounts for dropout rates commonly associated with tumor studies, such as e.g. bad tumor growth/failed tumor injection, but on top accounts for experiment-specific risks such as little or no invasion of the tumor, inflammation of the imaging window, failure due to the complex imaging setup (image shifts during time lapse recordings, failure of the lasers/optical setup). In the past years, due to continuous optimization of all aspects of these kinds of experiments, we already reduced the dropout rate from 30 % to 20 %. The dropout rate of the longitudinal metastasis study is 10

% . The difference in dropout rates has been made clearer by the separation of the animal procedures into two separate descriptions.

-B: Bij de berekening van de aantallen muizen worden alle tumormodellen en modificaties daarin meegeteld, uit de tekst blijkt dat dit niet voor alle experimenten geldt.

Antwoord: Indeed the [REDACTED] are [REDACTED], and thus no [REDACTED] knock down will be performed in this cell line. The inclusion of this group in the calculations was an error, and has been corrected.

-B: De herkomst van de dieren is niet juist ingevuld.

Antwoord: The animals will be obtained from a commercial supplier or from own breedings in the CDL.

-D2: Onderdeel 2 van de vraag is niet beantwoord.

Antwoord: A section has been added about the possible impact on the environment.

-H: Is deze aanpak haalbaar bij groepshuisvesting? Hoe wordt dan geborgd dat elke muis afdoende pijnbestrijding krijgt?

Antwoord: Indeed, it is difficult to guarantee that every mouse eats sufficient Medigel in group housing. Therefore, we 'll administer an extra dose of carprofen 24h after surgery, instead of supplying Medigel.

-I: De herhaalde bloedafnames ontbreken. Injecties en operaties graag apart vermelden als bron van ongerief: een injectie zal niet leiden tot matig ongerief.

Antwoord: They have been listed as separated causes of discomfort.

-J: Is meer dan 20% gewichtsafname gedurende de studie geen humaan eindpunt in dit onderzoek?

Antwoord: It has been added as an independent humane end point..

-K: De dieren ondergaan langdurige anesthesie, driemaal per week gedurende 3-5 weken. Is dit matig of ernstig ongerief voor de dieren en waaruit blijkt dat?

Antwoord: Indeed, in the local invasion study the mice will undergo imaging sessions max. 3 times per week for max. 3 weeks. The cumulative discomfort for the animals is moderate. In 2010, before starting these kinds of experiments, we performed a pilot study to address the impact on the animals wellbeing and the imposed discomfort level. We monitored and quantified weight gain rates, nest building behavior and performed objective phenotypic studies to quantify curiosity behavior, day/night rhythm and mobility by comparing mice without a chamber and mice in an experiment. We found the initial surgery for window application to be the most stress inducing factor which was accompanied by a significant weight loss right after surgery. 24 h following surgery however, the mice started to regain weight at rates comparable to the control group and we found no significant impact on behavior, nest building and mobility throughout the experiment.

The mentioned frequency of imaging represents the maximum of imaging/anesthesia the mice may be subjected to. This frequency will be limited to the required minimum as soon as we obtain the first pilot data and are able to judge which frequency will be necessary. Commonly, in other comparable, however not identical experiments, we image the mice either 3x per week for only 1 week or once or twice per week for longer periods.

Niet-technische samenvatting:

-3.1: Deze inleiding is geen goede weerspiegeling van het project. [REDACTED] en [REDACTED] staan centraal in het project, maar worden hier niet genoemd. De onderzoekers worden verzocht dit in overeenstemming te brengen.

Antwoord: The introduction was rewritten to include [REDACTED] and [REDACTED]. Additionally, the title was reworked to reflect the focus on [REDACTED].

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er is geen betrokkenheid van DEC-leden bij deze projectaanvraag, waardoor onafhankelijkheid en onpartijdigheid zijn gewaarborgd.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een eenvoudig project. De opzet komt het best overeen met voorbeeld 1 uit de handreiking 'Wat is een project'. Beide studies (longitudinale metastase studie en invasie studie) zijn noodzakelijk om de doelstelling te behalen. De samenhang tussen beide studies is evident. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.
2. Voor zover de DEC weet is er geen "tegenstrijdige" wetgeving die het uitvoeren van de experimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van dit basaal wetenschappelijke project is het ophelderen van de rollen van [REDACTED] (via [REDACTED]) en van [REDACTED] in de verschillende stappen van invasie en metastasering van borstkankercellen in diermodellen. Het uiteindelijke doel is om de vorming van uitzaaiingen bij (borst)kankerpatiënten te voorkomen of af te remmen. Verschillende stappen van het uitzaaiingsproces worden onderzocht met tumorcellen waarin de expressie van [REDACTED] of verschillende [REDACTED] is geblokkeerd. Er zijn geen dierexperimenten gepland waarin een therapie op basis van de verkregen inzichten wordt getest. Er is binnen dit project dan ook geen directe relatie tussen het doel van deze projectaanvraag en het

uiteindelijke doel. De DEC acht het niet waarschijnlijk dat het uiteindelijke doel behaald zal worden binnen de duur van dit project. De aanvrager heeft duidelijk gemaakt wat de status van het onderzoeksveld is en wat de bijdrage van dit project daaraan zal zijn. Uit de aanvraag blijkt dat de kennis van de verschillende onderdelen van het metastaseproces op dit moment zeer beperkt is, dat deze kennis noodzakelijk is voor het ontwikkelen van nieuwe behandelmogelijkheden en dat er behoefte is aan nieuwe behandelmogelijkheden. Naar de mening van de DEC is het doel van deze projectaanvraag daarom gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld.

5. De belangrijkste belanghebbenden in deze projectaanvraag zijn de proefdieren, de onderzoekers en de doelgroep/patiënten.
Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast. De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan. Uiteindelijk zullen ze in het kader van het onderzoek gedood worden. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven.
Voor de onderzoekers geldt dat het publiceren van belangrijke nieuwe wetenschappelijke inzichten resulteert in een goede wetenschappelijke reputatie, hetgeen vaak de sleutel is voor het verkrijgen van nieuwe onderzoeksmiddelen en mogelijkheden. Dit kan door de onderzoeker zelf van belang geacht worden, maar dient naar de mening van de DEC geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren. Het gaat uiteindelijk om de vraag of dit onderzoek belangrijke maatschappelijke en wetenschappelijke doelen dient (gezondheid, kennis).
Voor patiënten is dit onderzoek op de lange termijn van belang, omdat het kan bijdragen aan een verbetering van hun gezondheid en kwaliteit van leven. Gerichtte behandeling op basis van mechanistisch inzicht kan bijdragen aan een betere diagnostiek en behandeling met minder bijwerkingen. Dit kan er toe leiden dat de patiënt langer ziektevrij kan overleven omdat uitzaaiingen kunnen worden voorkomen, dan wel een betere kwaliteit van leven heeft. Kunnen beschikken over adequate behandelingen voor ernstige ziekten, zoals uitzaaiende kanker, is van groot belang voor de samenleving.
6. Er is geen aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager, zoals blijkt uit de in de aanvraag vermelde publicaties van deze onderzoeksgroep. De aanvragers beschikken over voldoende kennis en kunde om te kunnen voldoen aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent het verrichten van dierproeven.
8. De doelstellingen van het project zijn realistisch en de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten hier logisch bij aan. Bovendien heeft deze groep veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De DEC is dan ook van mening dat het project goed is opgezet, en dat deze strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren,

omstandigheden of behandeling van de dieren:

- ☐ Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
- ☐ Niet-menselijke primaten (10e)
- ☐ Dieren in/uit het wild (10f)
- ☐ Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
- ☐ Zwerfdieren (10h)
- ☐ Hergebruik (1e lid 2)
- ☐ Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
- ☐ Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
- ☐ Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c lid 3)

10. De huisvesting en verzorging van de dieren zijn conform de eisen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd.
12. De integriteit van dieren wordt aangetast door het aanbrengen van een raamwerk op het lichaam van de muis waardoor het weefsel daarbinnen makkelijker bereikbaar is voor imaging. De dieren hebben hier in de praktijk weinig hinder van. Er zullen mogelijk naakte muizen gebruikt worden, omdat humane tumorcellen en tumorcellijnen waarin GFP tot expressie komt in deze dieren kunnen groeien. De integriteit van deze dieren is aangetast omdat zij geen vacht hebben.
13. De criteria voor humane eindpunten zijn voldoende specifiek gedefinieerd en toegesneden op het experiment. Het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken is op basis van ervaring met deze diersmodellen ingeschat. De commissie is het eens met deze inschatting en de gehanteerde humane eindpunten.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De onderdelen van het onderzoek die met in vitro modellen kunnen worden uitgevoerd zijn al afgerond. Voor het beantwoorden van de resterende onderzoeksvragen zijn dierproeven noodzakelijk. De wederzijdse interacties tussen tumorcellen en omringende weefsels tijdens de verschillende stadia van metastasering kunnen niet goed nagebootst worden zonder proefdiermodellen.
15. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en is proportioneel ten opzichte van de gekozen onderzoekopzet en de looptijd. De onderzoekers hanteren een goede strategie om ervoor te zorgen dat er met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een wetenschappelijk betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Waar mogelijk worden meerdere procedures bij hetzelfde dier uitgevoerd. Door gebruik te maken van niet-invasieve metingen (ondermeer met behulp van het raamwerk) kan het gedrag van tumorcellen op meerdere tijdstippen in hetzelfde dier bepaald worden. Deze proefopzet draagt bij aan een vermindering van het aantal benodigde dieren.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven. Het tumor micromilieu in muizen komt voldoende overeen met de humane situatie, en er zijn voldoende research tools beschikbaar voor deze diersoort. De aanvragers zullen adequate pijnbestrijding toepassen voor de handelingen waarvoor dit vereist is. De DEC is ervan overtuigd dat de

beschreven proefopzet de meest verfijnde is en dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.

17. Het betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. De aanvrager zal in het project alleen gebruik maken van vrouwelijke dieren. De aanvrager geeft hiervoor de volgende onderbouwing: 'Aangezien er vrouwelijke borstkankercellen onderzocht worden, zullen we vrouwelijke muizen gebruiken. Om ervoor te zorgen dat de ontwikkeling van de borstklier is voltooid zullen we alleen muizen ouder dan zes weken gebruiken.' De DEC is van mening dat de aanvrager in voldoende mate heeft onderbouwd dat het om de doelstellingen met zo min mogelijk dieren te bereiken noodzakelijk is om de proeven met alleen vrouwelijke dieren uit te voeren.
19. De dieren zullen in het kader van het project gedood worden. Dit is noodzakelijk om verschillende weefsels te kunnen onderzoeken voor het beantwoorden van bepaalde onderzoeksvragen. De gebruikte dodingsmethode staat vermeld in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.
20. Er worden in deze projectaanvraag geen landbouwhuisdieren, honden, katten of niet-humane primaten gebruikt (en dus ook niet gedood om niet-wetenschappelijke redenen).

NTS

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

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt het belang van de doelstelling van het project het ongerief dat de dieren wordt aangedaan, en is aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan?
2. Er vindt een lichte of matige aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats (beschreven in C9 tot C20). De doelstellingen kunnen niet zonder dieren behaald worden. De onderzoekers doen al het mogelijke om het lijden van de dieren en het aantal dieren te beperken.

Voor de vooruitgang in dit onderzoeksveld is dit onderzoek van belang, omdat het er toe zou kunnen bijdragen dat de moleculaire mechanismen die betrokken zijn bij de verschillende stappen van het uitzaaiingsproces worden opgehelderd. De DEC kent daar veel gewicht aan toe om de volgende redenen. Sterfte aan borstkanker en andere carcinomen wordt veroorzaakt door uitzaaiingen van de primaire tumor. Er is nog geen therapie beschikbaar om de vorming van metastasen te verminderen. Wanneer de moleculaire mechanismen die betrokken zijn bij de verschillende stappen van het uitzaaiingsproces zijn opgehelderd, zou dit kunnen bijdragen aan het ontwikkelen van een therapie om de vorming van metastasen te verminderen of te voorkomen. Het is aannemelijk dat de kennis die dit project oplevert op termijn kan bijdragen aan het ontwikkelen van zo'n therapie. De commissie acht het voorkomen of verminderen van uitzaaiingen van carcinomen van substantieel belang.

3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: het ophelderen van de rollen van [REDACTED] en van [REDACTED] in de verschillende stappen van invasie en metastasering van borstkankercellen in diermodellen. Het uiteindelijke doel is om de vorming van uitzaaiingen bij (borst)kankerpatiënten te voorkomen of af te remmen. De DEC is van mening dat de belangen van de patiënten voldoende zwaar wegen om het schaden van de belangen van de proefdieren (om gevrijwaard te blijven van een aantasting van hun welzijn en integriteit) te rechtvaardigen. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De DEC is van mening dat het project goed is opgezet, en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat zij zal kunnen voorkomen dat mens, dier en het milieu onbedoelde negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven.
- De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

☒ De DEC adviseert de vergunning te verlenen

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

- Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
- Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
- Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...

☐ De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

- De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
- De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
- De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. Er zijn geen knelpunten of dilemma's geconstateerd – zowel binnen als buiten de context van het project - die de verantwoordelijkheid en competentie van de DEC overstijgen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Dhr. Instantie voor dierenwelzijn
Postbus 9101, [REDACTED]
6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD1030020172004

Bijlagen

2

Datum 2 juni 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer Instantie voor dierenwelzijn,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 1 juni 2017. Het gaat om uw project "Dynamic intravital imaging of breast cancer cell invasion and metastasis". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1030020172004. 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).

Datum:

2 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD1030020172004

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
2 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020172004

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

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

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Functie: Instantievoor Dierenwelzijn

Afdeling: [REDACTED]

Telefoonnummer: [REDACTED]

E-mailadres: [REDACTED]

Datum:

2 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD1030020172004

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 juli 2017

Geplande einddatum: 1 juli 2022

Titel project: Dynamic intravital imaging of breast cancer cell invasion and metastasis

Titel niet-technische samenvatting: De invloed van cel-cel adhesie eiwitten op het uitzaaiingsproces van borstkanker

Naam DEC: RU DEC

Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED]

E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.287,-

De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

☒ Projectvoorstel

☒ Beschrijving Dierproeven

☒ Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

☒ DEC-advies

Ondertekening

Naam: [REDACTED]

Functie: Instantie voor dierenwelzijn

Plaats: Nijmegen

Datum: 1 juni 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Instantie voor dierenwelzijn

Postbus 9101, [REDACTED]

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD1030020172004

Bijlagen

2

Datum 2 juni 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 2 juni 2017

Vervaldatum: 2 juli 2017

Factuurnummer: 172004

Ordernummer: 040823-461220 /2017-0005 / [REDACTED]

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1030020172004	€ 1.287,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL29INGB 070.500.1512 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Dhr. Instantie voor dierenwelzijn
Postbus 9101, [REDACTED]
6500 HB NIJMEGEN



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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1030020172004

Datum 19 juni 2017
Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer Instantie voor dierenwelzijn,

Op 1 juni 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Dynamic intravital imaging of breast cancer cell invasion and metastasis" met aanvraagnummer AVD1030020172004. 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 Bijlage Dierproeven 3.4.4.1 heeft u niet aangegeven hoeveel dieren naar verwachting een humaan eindpunt zullen halen. Kunt u een nieuwe Bijlage Dierproeven sturen waarin dit is aangegeven? Kunt u hierin ook aanpassen hoeveel dieren welke ongeriefsclassificatie zullen ondergaan?

Onder I staat voor Bijlage Dierproeven 3.4.4.1 en 3.4.4.2 dezelfde tekst, terwijl in Bijlage Dierproeven 3.4.4.1 de dieren niet meerdere keren onder narcose gaan. Kunt u dit uitleggen, of aanpassen in de Bijlage Dierproeven?

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.

Datum:

19 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD1030020172004

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).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Aan de CCD
Geachte mw/hr,

In reactie op uw brief van 19 juni (referentie Aanvraagnummer AVD1030020172004) sturen we hierbij de antwoorden op de gestelde vragen en de aangepaste DAPs op.

Vragen/ antwoorden

In Bijlage Dierproeven 3.4.4.1 heeft u niet aangegeven hoeveel dieren naar verwachting een humaan eindpunt zullen halen. Kunt u een nieuwe Bijlage Dierproeven sturen waarin dit is aangegeven? Kunt u hierin ook aanpassen hoeveel dieren welke ongeriefsclassificatie zullen ondergaan?

De gevraagde informatie is toegevoegd aan Bijlage Dierproeven 3.4.4.1, onder J.

Onder I staat voor Bijlage Dierproeven 3.4.4.1 en 3.4.4.2 dezelfde tekst, terwijl in Bijlage Dierproeven 3.4.4.1 de dieren niet meerdere keren onder narcose gaan. Kunt u dit uitleggen, of aanpassen in de Bijlage Dierproeven? Per ongeluk was dezelfde tekst gezet in 3.4.4.1 I en 3.4.4.2 I. Dit is aangepast.

Vriendelijke groet,

De onderzoeker:

[redacted] MSc

PhD-student [redacted]

[redacted]
Visiting address: [redacted], Nijmegen

Postal address: P.O. Box 9101, 6500 HB Nijmegen

The Netherlands

Phone: [redacted]

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
T.a.v. Instantie voor Dierenwelzijn
Postbus 9101
6500 HB NIJMEGEN

**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
Info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1030020172004
Bijlagen
1

04 JUL 2017

Datum 3 juli 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 1 juni 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Dynamic intravital imaging of breast cancer cell invasion and metastasis" met aanvraagnummer AVD1030020172004. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 29 juni 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Dit betrof het aantal dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal halen, het aantal dieren per ongeriefsclassificatie in Bijlage Dierproeven 3.4.4.1 en de tekst betreffende overige welzijnsaantasting.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.

De algemene voorwaarde(n) zijn opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

U kunt met uw project "Dynamic intravital imaging of breast cancer cell invasion and metastasis" starten. De vergunning wordt afgegeven van 3 juli 2017 tot en met 1 juli 2022.

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 1 juni 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de

wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld. Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Datum:
3 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020172004

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

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: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Adres: Postbus 9101, [REDACTED]

Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN

Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 3 juli 2017 tot en met 1 juli 2022, voor het project "Dynamic intravital imaging of breast cancer cell invasion and metastasis" met aanvraagnummer AVD1030020172004, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is PhD-student. Voor de uitvoering van het project is Instantie voor Dierenwelzijn verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 1 juni 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 1 juni 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 1 juni 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 1 juni 2017, ontvangen op 1 juni 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 29 juni 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Longitudinal metastasis study of breast cancer cells after orthotopic implantation				
	Muizen (Mus musculus) /	267	15% Matig 85% Licht	
3.4.4.2 Intravital imaging of breast cancer invasion				
	Muizen (Mus musculus) /	275	Matig	

Voorwaarden

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

Aanvraagnummer:
AVD1030020172004

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

In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.



Aanvraagnummer:
AVD1030020172004

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

Aanvraagnummer:

AVD1030020172004

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

Einde van een dierproef

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

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

Uit artikel 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.