

		Inventaris Wob-verzoek W17-07								
			wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.		document NTS 2017813	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1		Aanvraagformulier				x		x	x	
2		NTS			x					
3		NTS aangepast	x							
4		Project proposal				x		x	x	
5		project proposal aangepast				x		x	x	
6		flow chart				x			x	
7		bijlage animal procedure 1				x		x	x	
8		bijlage animal procedure 1 aangepast				x		x	x	
9		bijlage animal procedure 2				x		x	x	
10		bijlage animal procedure 2 aangepast				x		x	x	
11		DEC advies				x		x	x	
12		aanvullende vragen DEC				x		x	x	
13		aanvullende vragen VH				x		x	x	
14		aanvullende informatie				x		x	x	
15		Advies CCD aan bestuur		x						x
16		Beschikking				x		x	x	



12 JAN. 2017

Aanvraag**Projectvergunning Dierproeven**
Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl of in de toelichting op de website.
- Of 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 10500 ☐ Nee > U kunt geen aanvraag doen																
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td colspan="3">Rijksuniversiteit Groningen</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td colspan="3">[REDACTED]</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>1179037</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>A. Deusinglaan 1, [REDACTED]</td><td></td><td>5</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	Rijksuniversiteit Groningen			Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]			KvK-nummer	1179037			Straat en huisnummer	A. Deusinglaan 1, [REDACTED]		5
Naam instelling of organisatie	Rijksuniversiteit Groningen																	
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																	
KvK-nummer	1179037																	
Straat en huisnummer	A. Deusinglaan 1, [REDACTED]		5															
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><tr><td>Postbus</td><td colspan="3"></td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>9713AV</td><td>Groningen</td><td></td></tr><tr><td>IBAN</td><td colspan="3">NL45ABNA0474567206</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td colspan="3">Rijksuniversiteit Groningen</td></tr></table>	Postbus				Postcode en plaats	9713AV	Groningen		IBAN	NL45ABNA0474567206			Tenaamstelling van het rekeningnummer	Rijksuniversiteit Groningen		
Postbus																		
Postcode en plaats	9713AV	Groningen																
IBAN	NL45ABNA0474567206																	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Rijksuniversiteit Groningen																	
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td>☐ Dhr. ☒ Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	☐ Dhr. ☒ Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]		
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	☐ Dhr. ☒ Mw.																
Functie	[REDACTED]																	
Afdeling	[REDACTED]																	
Telefoonnummer	[REDACTED]																	
E-mailadres	[REDACTED]																	
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td>☒ Dhr. ☐ Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	☒ Dhr. ☐ Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]		
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	☒ Dhr. ☐ Mw.																
Functie	[REDACTED]																	
Afdeling	[REDACTED]																	
Telefoonnummer	[REDACTED]																	
E-mailadres	[REDACTED]																	

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|---------------|
| Startdatum | 1 - 2 - 2017 |
| Einddatum | 31 - 1 - 2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Chromatin regulation in pediatric brain cancer
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Chromatine regulatie in kinderhersenkanker
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|--|
| Naam DEC | DEC-RUG |
| Postadres | A. Deusinglaan 1, [REDACTED] 9713 AV Groningen |
| E-mailadres | secredec.umcg@umcg.nl |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- ☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1287 Lege
- ☐ Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- ☐ Via een eenmalige incasso
- ☒ Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

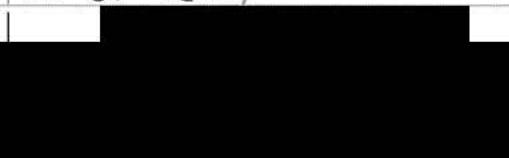
- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
 - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
 - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
 - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
 - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam 

Functie 

Plaats Groningen

Datum 10-01-2017

Handtekening 



Format

Niet-technische samenvatting

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Chromatine regulatie in kinderhersenkanker
1.2 Looptijd van het project	5 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Kinderhersenkanker, epigenetica, chromatine, genexpressie, genoominstabiliteit

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.	☒ Fundamenteel onderzoek
<i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i>	☐ Translationeel of toegepast onderzoek
	☐ Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
	☐ Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid
	☐ Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
	☐ Hoger onderwijs of opleiding
	☐ Forensisch onderzoek
	☐ Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	Hersenkanker is de meest voorkomende kwaadaardige tumor bij kinderen. Bij ongeveer eenderde van de patiënten is deze ziekte fataal. Overlevenden hebben vaak te maken met de levenslange gevolgen, zoals verlies van cognitieve functies, groeiachterstand, onvruchtbaarheid en secundaire kankergroei. Het is dus nodig om betere behandelingen te ontwikkelen. Overigens bestaan er meerdere varianten van hersenkanker die afhankelijk zijn van de locatie en de leeftijd van de patiënt. Het is dus belangrijk om precies de juiste celgroepen en kankermodellen te gebruiken voor onderzoek. Het eerste doel van dit project is dus om modellen te maken die specifiek zijn voor het celtype dat de kanker heeft gevormd, en modellen die zeer representatief zijn voor de bestudeerde vorm van kinderhersenkanker (in ons
---	--

geval medulloblastoom en glioom).

Daarnaast hebben wij als doel om met deze modellen te begrijpen hoe de cel die de tumor heeft gevormd, zich normaliter ontwikkelt (zowel voor als na de geboorte). Hieruit kunnen we vervolgens afleiden wanneer en op welke manier zo'n cel gevoelig is om te transformeren in een tumorcel.

Deze kennis gaan we vervolgens testen in een tumor-muizenmodel om te zien of onze hypothesen standhouden tijdens echte tumorgroei. De nadruk ligt hierbij op de rol van het chromatine (het complex van eiwitten en DNA in de celkern) in genregulatie en behoud van genoomstabiliteit.

3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?

Door dit onderzoek zullen we komen tot:

- een beter begrip hoe een hersencel, die in theorie kan veranderen in een tumorcel, zich normaliter ontwikkelt;
- een beter inzicht in hoe de normale biologische mechanismen misbruikt worden wanneer een cel transformeert in een tumorcel.

De bevindingen worden gevalideerd in zeer specifieke modellen voor zowel de oorspronkelijke cel als de specifieke kankersoort en geven aanknopingspunten voor nieuwe therapieën.

Verder zal dit project leiden tot:

- betere modellen voor kinderhersenkanker, die niet alleen voor ons van nut zullen zijn, maar ook voor andere onderzoekers;
- alternatieven voor dierproeven, omdat we ook weefsel/celkweektechnieken gaan opzetten.

Met de modellen kan niet alleen fundamenteel onderzoek worden gedaan, maar ook translationeel, zoals het testen van nieuwe medicijnen.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

Voor ons onderzoek zullen we gebruik maken van volwassen, pasgeboren en embryonale muizen. Deze zijn zowel afkomstig van transgene als wild type muizenlijnen. In het totaal vragen we 9674 dieren aan. Hiervan zal ongeveer 30% embryo zijn.

3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?

Een deel van de dieren zal licht tot matig ongerief ervaren door kleine ingrepen of injecties/operaties, en een deel van de dieren zal beginnende hersentumoren ontwikkelen.

3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?

Matig. Een klein deel zal licht ongerief hebben door relatief kleine ingrepen (timed matings, tamoxifen injecties, non-invasive imaging, wegen, gezondheidschecks). Ongeveer de helft van de dieren loopt kans op het ontwikkelen van een beginnende hersentumor. Deze dieren zullen matig ongerief ervaren (tumortransplantaties, termineren op basis van humane eindpunten).

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

Euthanasie voor analyse van cellen, weefsel en tumoren.

4 Drie V's

4.1 **Vervanging**
Geef aan waarom het

Proefdieren zijn noodzakelijk om een complexe ziekte als kanker te kunnen begrijpen. Een tumor ondervindt invloeden van een samenspel van

gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.

tumorcellen, gezonde cellen, cellen van de afweer en de extracellulaire ruimte. Deze omstandigheden zijn wel apart te modelleren buiten een dier, maar de totale complexiteit kan alleen worden benaderd in een levend organisme.

Overigens testen we geen enkele hypothese meteen in een proefdier. Eerst worden uitgebreide experimenten gedaan in reeds bestaande cellijnen. Hiermee onderzoeken we eerst alle mogelijke deelaspecten van onze vraagstelling. Pas als de hypothese klopt, gaan we over naar de muismodellen.

4.2 **Vermindering**

Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.

Indien mogelijk zullen we voor elk dierexperiment een statistische berekening uitvoeren om het precies aantal benodigde dieren te bepalen. In andere gevallen zullen we altijd eerst een kleine groep dieren testen om te komen tot de correcte groepsgrootte. Ook houden we ons op de hoogte van het werk van onze collega's om duplicatie van dierexperimenten te voorkomen.

4.3 **Verfijning**

Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.

In de afgelopen jaren zijn zeer veel technieken en methodes ontwikkeld, waardoor kankeronderzoek in muizen op zeer specifieke wijze kan worden gedaan. De muis is het meest gebruikte model voor kankeronderzoek, wat de vergelijking met gepubliceerde resultaten vergemakkelijkt.

Ongerief bij hersentumormodellen wordt beperkt door gebieden van de hersenen te gebruiken die niet direct bij vitale functies zijn betrokken.

Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.

Dieren zullen zeer frequent worden gemonitord om te voorkomen dat een dier ernstig ongerief zal ondervinden. Daarnaast zullen we indien nodig gebruik maken van pijnstilling en verdoving.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



Format

Projectvoorstel dierproeven

- Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in.

2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- ☒ Fundamenteel onderzoek
- ☐ Translationeel of toegepast onderzoek
- ☐ Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- ☐ Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
- ☐ Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- ☐ Hoger onderwijs of opleiding
- ☐ Forensisch onderzoek
- ☐ Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2 aangekruiste categorieën.

- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
- Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
- Geef in geval van 'hoger onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

General introduction

Brain cancer is the main solid tumor in childhood. Every year, more than a hundred children are newly diagnosed with brain cancer in the Netherlands (source: SKION basis registration). Approximately thirty percent of these children cannot be cured. Further, anti-tumor treatment causes brain damage that leads to severe persisting side effects in those children that do survive, including neurocognitive impairments and secondary cancers. Therefore, there is an urgent need for improved therapies that effectively, but also exclusively target the brain tumor cell. To achieve this, thorough knowledge of the origin and biology of the tumor is essential.

Notably, the term brain cancer designates a variety of different tumor types that derive from the central nervous system (Fleming and Chi, *Curr Probl Ped Adolesc Health Care* 2012). Most frequent are malignant glioma (including glioblastoma) and medulloblastoma. The variety in tumor spectrum is probably a reflection of the heterogeneity within the nervous system. Along its anteroposterior and mediolateral axes, there are significant differences at the molecular and cellular level. These differences are established during embryonic development under the influence of morphogenic gradients, but they are maintained during adult life (Kiecker and Lumsden, *Ann Rev Neurosci* 2012).

It seems that hidden in this mixture of cells, there are several different brain tumor cells-of-origin that may be more or less sensitive to specific transforming events depending on developmental stage. Thus, potentially each cell-of-origin can give rise to a specific brain cancer entity during different developmental phases. Here, the cell-of-origin is defined as the normal, non-transformed cell type in which the initial oncogenic transforming event has taken place – this is of relevance since fullblown tumors often maintain the specific features of the cell-of-origin (Baker et al, *Glia* 2016; Liu and Zong, *Curr Opin Neurobiol* 2012). To complicate things further, tumors that appear similar at the histopathological level and have historically been classified as one disease, have recently been shown to differ at the level of gene expression and epigenetic landscape (=genome wide pattern of the different histone and DNA modifications, see also below)(Northcott et al, *Nat Rev Cancer* 2012; Sturm et al, *Nat Rev Cancer* 2014). So knowing all this, we can conclude that it will become essential to apply a personalized medicine approach to pediatric brain cancer patients in order to determine the unique characteristics of their disease.

However, if the ultimate aim is to treat these patients in a targeted manner leaving healthy cells unharmed, we also need to decipher what the driving forces behind each tumor subtype are and how we can target them. Importantly, while doing so we need to keep in mind that unlike an adult, a pediatric patient is in fact a developing organism, in which progenitor cell populations sensitive to oncogenic transformation may be present that do not exist in adults. Or which use different molecular mechanisms for cellular processes such as proliferation, differentiation, maintenance of genomic integrity and cell death compared to adults. The overall mutation rate in pediatric brain cancer can be up to tenfold lower than in adults, but changes in the epigenome predominate in children. And whereas in general, genomic instability is less profound in pediatric cancer, a subset of pediatric brain cancers belong to the most genomically unstable cancers found in humans (Downing et al, *Nat Gen.* 2014; Huether et al, *Nat Comm* 2014). To capture all the child- and disease specific characteristics as accurately as possible in preclinical research, it is vital to employ models that are highly representative of the patient. [REDACTED]

Chromatin structure, gene expression and cell cycle progression

[REDACTED], in pediatric brain cancer. Chromatin consists of the genome (DNA) and its tightly associated proteins, such as the histones. There are many different types of chromatin modifications, and their combined genome-wide expression profiles makes up what we call the epigenome or "epigenetic landscape". For instance, acetylation of certain histone amino acid residues (such as H3K27Ac) leads to weakened interactions between the DNA and the chromatin proteins, and thereby for instance to gene expression. Methylation of histone residues can both effect repressive or active chromatin, depending on the site of the modification. For instance H3K4me3 (trimethylation) is associated with active gene expression, whereas H3K9me3 or H3K27me3 are causing gene silencing. In general, the more tightly the histones are bound to the DNA, the less accessible DNA elements are for other factors (enzymes, structural proteins, DNA repair machinery etc). This is true for DNA elements that control gene expression, like promoters and enhancers, but also for more structural genomic elements such as the centromeric regions and the telomeres.

For normal cellular function, at times significant changes of the chromatin are required. If genes become expressed or silenced, the chromatin needs to be remodeled accordingly (Steffen and Ringrose, *Nat Rev*

Mol Cell Biol 2014). During mitosis, DNA needs to be condensed, which can only happen if the chromatin is properly modified (McKinley and Cheeseman, Nat Rev Mol Cell Biol 2015). Similarly, when there is DNA damage, modification of the chromatin is a prerequisite for repair. Any defect in this system can lead to erroneous gene expression and/or loss of genomic integrity. Evidence that such defects are at the source of human cancer is mounting, as the epigenetic landscape is often very different in cancer as compared to normal tissue and cells (Huether et al, Nat Comm 2014). Importantly, to fully understand the nature of defective signaling in cancer, one also needs to know how that mechanism works under normal, physiological circumstances. Therefore, [REDACTED].

Research interests and methods

Our main interests are 1. [REDACTED]

2. [REDACTED]. An assay that we frequently use to establish the profile of a certain chromatin mark, is the ChIP-seq experiment (=chromatin immunoprecipitation followed by DNA-next generation sequencing). In this assay, we use antibodies to pulldown the studied modified protein (for instance H3K27me3) from a cell or tissue. At the same time, we also pulldown the DNA where the protein was bound to. Using DNA-sequencing we can then identify all the genomic loci where the chromatin modification was present. Using bioinformatics, we can subsequently generate a genome-wide "epigenomic" map from these data. Often, we do this together with measuring protein and mRNA expression, as this allows us to determine what the functional consequence of the presence of a chromatin mark is (or the combination of different marks). This is particularly useful when we expect that the change in the epigenetic landscape primarily affects gene expression. However in certain regions of the genome (such as the telomeres and (peri)centromeres), the chromatin is not so much used for controlling gene expression, but for supporting the structure of the chromatin, for instance for physically connecting the machinery of the cell cycle that separates the chromatids during mitosis. Thus, [REDACTED]

Altogether, it is clear that children are not just little adults, nor are their diseases miniature versions of those found in adults. Unfortunately, pediatric brain cancer has not always been viewed in this way, with the result that current treatment strategies are largely based on the adult situation. Therefore, more research is required to identify the cells-of-origin for the various pediatric brain cancer types, and the (unique) molecular mechanisms that they use to undergo malignant transformation. Combining this knowledge will lead to improved understanding of the characteristics of the various brain tumor types, and ultimately to the development of novel targeted therapies.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

- In het geval het project gericht is op één of meer onderzoeksdoelen: op welke vra(a)g(en) dient dit project antwoord(en) te verschaffen?
- In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

[REDACTED] Therefore, it is necessary to [REDACTED]

Main aim:

**To generate [REDACTED]
with the aim of addressing how [REDACTED]**

Research questions underlying the main aim:

1. Exploring the [redacted] of [redacted] during [redacted] (with emphasis on [redacted]).
2. Exploring the [redacted] of [redacted] / [redacted].
3. Functional analysis/confirmation of the [redacted] of [redacted] / [redacted].

Research question 1:

Exploring the [redacted] of [redacted] / [redacted] during [redacted] (with emphasis on [redacted]).

It is known that for normal (embryonic) development, cells use chromatin modifications to set up specific gene expression patterns. For instance, a neural stem cell requires the expression of a different set of genes than its later descendant, such as the neuron or astrocyte. This is because different cell types have different functions that are performed by specific proteins (i.e., the neural stem cell needs to proliferate and build a tissue, whereas a neuron needs to transmit electrical stimuli). However, all cells have an identical genome, so specificity of gene expression cannot be controlled by the coding sequence itself. The epigenome (or epigenetic landscape) on the other hand, can exist in endless variations and thus provides the blueprint of *how* the genome should be used by a particular cell.

In development, the factor "time" therefore plays an important role, since cells are continuously changing their identity (=epigenome/gene expression profile) on their way to becoming an adult tissue. And this is thus also an important aspect when studying childhood cancer. In children, many transient stem-like cell populations are present. To fully understand the cancer that a child has, one needs to have knowledge of the cell's identity (i.e., gene expression and epigenome) at the precise moment in time when it underwent oncogenic transformation. This allows us to make predictions about how the tumor sustains itself, since the cellular functions of the founder cell (i.e., tumor cell-of-origin) are often preserved or used by the tumor (Marshall et al, Nat Rev Cancer 2014).

This is also the key aspect that we want to investigate in our first research aim: [redacted]. There is consensus on which cell lineage is at the root of the cancers that we are mainly studying ([redacted]). However, what we do not know, is at which exact moment in time these cells transform into cancer. Maybe they can do this [redacted]. This will have an impact on [redacted]. And ultimately, this is what determines [redacted].

Experimentally, we will [redacted]. At each time point, we will establish their epigenome using ChIP, as well as their transcriptome using RNA-next gen sequencing. These data we will integrate to understand the relationship between the changes in the epigenome and transcriptome that are naturally occurring. Then, we will [redacted].

[redacted] From these analyses, [redacted]. At the same time, [redacted].

Research question 2:

Exploring the [redacted] of [redacted] / [redacted].

Next, we test our predictions to be valid in an oncogenic setting. Hereto, we can again use the isolated

cells-of-origin, and genetically engineer them to become [REDACTED]. For instance, we make them [REDACTED]. In addition, we manipulate the genes that we have newly hypothesized [REDACTED]. We can do this either directly (changing the gene), or indirectly by altering the associated chromatin modifications (changing gene regulation). In *in vitro* assays, we then measure if our predicted factors indeed contribute to transformation. Cells might for example respond with increased proliferation, reduced cell death, increased migration etc. Additionally, we will also investigate the effect of [REDACTED]. As mentioned, changes in [REDACTED]. Lastly, in addition to functionally demonstrating that our novel gene is involved in tumorigenesis, we will also try and decipher the molecular mechanism.

Research question 3:

Functional analysis/confirmation of the [REDACTED] of [REDACTED] during [REDACTED].

If research questions 1 and 2 have resulted in a robust identification of [REDACTED], we will finish the project by validating our finding in an *in vivo* model for the [REDACTED]. In essence, [REDACTED]. In addition, we will [REDACTED]. These [REDACTED] will be subjected to [REDACTED]. We will establish [REDACTED]. Hereto, we will study [REDACTED]. We will also address if [REDACTED] to the [REDACTED] or [REDACTED].

Feasibility

We expect the majority of the proposed experiments to be highly feasible. The [REDACTED] are techniques that [REDACTED] have been using for the past years, also in combination with [REDACTED]. Further, we and our collaborators [REDACTED] have ample experience in [REDACTED] technique and generating [REDACTED]. Our preliminary results (mostly done in *in vitro* experiments) suggest our research questions to be relevant and warrant further testing in mouse (-derived) models for [REDACTED].

3.3 Belang

Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelstelling(en).

The primary importance of our proposed research is scientific, i.e. it will address fundamental questions about the biology of pediatric oncology. Our goal to perform our research projects using models that are highly relevant for the patient (and take into account the childhood-specific characteristics of the disease), which will lead to the generation of good quality preclinical data. These results can then be directly used as starting points for the development of new therapies, since accurate disease modeling reduces the chance of drawing incorrect or incomplete conclusions (as compared to using adult-based disease models or long-established cell lines). Also, the behavior of an altered pathway in an oncogenic setting can never be fully understood in a simple *in vitro* model, since the cancer is a complex disease that happens at the intersection between tumor cells, host cells, the immune system, the vascular system etc in 3D surroundings.

Our research questions are in line with the current insights into pediatric cancer biology. It is becoming increasingly clear that deregulation of the epigenome is a cardinal feature of pediatric (brain) cancer. This makes sense when considering the fact that a child is a developing organism, in which transient progenitor populations exist that together work towards the organs found in an adult individual. These cells normally use epigenetics as the key mechanism to orchestrate gene expression programmes appropriate for their differentiation stage. Thus, it is likely that these mechanisms are also targeted by the tumor cells. Furthermore, we have found that changes in the [REDACTED] also cause [REDACTED] in [REDACTED].

[REDACTED], which can lead to [REDACTED]. Importantly, many components in epigenetic pathways are enzymes, which are preferred druggable targets. For many of them, lead compounds have already been developed and these can be quickly moved to translational research or clinical trials. Lastly, a novel tool named CRISPR/Cas9, has shown great promise with respect to the epigenetic editing technique. This technique allows scientists to revert changes in the epigenome in a well-controlled manner. Combining such strategies with knowledge generated by fundamental research will in the nearby future lead to novel ways to treat the pediatric cancer patient. About one in three hundred children will receive the diagnosis cancer during childhood. On average, thirty percent of these children will not survive. Those that do survive often suffer from significant side effects, such as loss of cognitive function, growth retardation, infertility and secondary cancers. This can lead to a (strongly) reduced capacity to participate in society. A child with cancer also has a huge impact on families, so the social effects of this effect reach further than the patient. Altogether, we believe the proposed experiments using experimental animals are justifiable when looking at the benefit for the society.

3.4 Onderzoeksstrategie

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project (strategie).

For a graphic overview of the project, we refer to figure 1.

As can be seen in [REDACTED], the project starts with a “**hypothesis generating**” phase. During this phase, [REDACTED] are obtained from mice (bijlage 1) or human (not part of this CCD application). We will use [REDACTED] since it is [REDACTED].

[REDACTED] We will investigate how these [REDACTED] this is controlled by the [REDACTED] and if/how this impacts on [REDACTED]. We will also integrate these data with data from [REDACTED]. Lastly, we will generate hypotheses on how [REDACTED].

In a **second phase** (“**Hypothesis validation in vitro**”, also bijlage 1), we will validate our hypotheses in *in vitro* experiments. We will use [REDACTED]. In these cells, we will [REDACTED]. In addition, we will [REDACTED] and determine its effect on [REDACTED].

In the **third phase** (“**Hypothesis validation in vivo**” bijlage 2), we will confirm that [REDACTED]. Hereto, we again use the [REDACTED]. This will allow accurate modeling of [REDACTED].

Below is a more detailed description of the types of experiments that will be conducted:

For Phase 1: Screening phase/hypothesis generating phase, we will perform the following experiments (i.e., when they are appropriate for the particular research question. This summary describes the maximum number of experiments that we will perform).

- isolate tissue for histology, genome (PCR/DNA-seq), transcriptome (RNA expression/RNA-seq/qRT-PCR) epigenome (ChIP-PCR/ChIP-seq) and protein expression (Western blot, immunoprecipitation) analysis.
- collect purified cells for transcriptome, (epi)genome and protein expression analysis.
- [REDACTED]
- Generate hypotheses on [REDACTED], and at which [REDACTED].

For Phase 2: *in vitro* hypothesis testing phase, we will perform the following experiments (again, only when appropriate).

- [REDACTED]
- Perform [REDACTED]
- Test the effect of [REDACTED]
- Investigate [REDACTED] what the mechanism is [REDACTED]
- Test if these lesions are equally adequate in causing [REDACTED] during [REDACTED]
- In the latter case, we will investigate [REDACTED].

For Phase 3: *in vivo* testing using intracranial transplantation brain cancer models if a selected gene/factor indeed contributes to oncogenesis.

- After certain candidate genes have been thoroughly validated in *in vitro* tests, we will continue to submit these factors to *in vivo* brain cancer models.
- Cells-of-origin for a particular brain cancer isolated from mouse will be genetically engineered with oncogenic lesions in combination with alterations in the factor that is tested. These cells will be injected into mouse brain (in parallel the appropriate control cells will be injected) and followed for tumor development.
- Alternatively or subsequently, cells of human origin will be employed in a similar fashion to demonstrate reproducibility in a human-based model.
- Mice will be monitored for: changes in tumor incidence and latency.
- Tumors will be harvested and analyzed for microscopic features (histopathologically/grading/tumor type etc), and for biochemical analysis (DNA mutational/CNV analysis and aneuploidy, alterations in gene and protein expression, alterations in the epigenome etc). Tumor bearing mice might receive a BrdU (or analog) injection prior to sacrifice to allow for assessment of the tumor proliferative index.

3.4.2 Geef een overzicht op hoofdlijnen van de verschillende onderdelen van het project en de daarbij gebruikte type(n) dierproef of dierproeven.

Animal experiment/Technique 1 (bijlage 1):

Prospective isolation of pediatric brain cancer cells-of-origin from different regions of the mouse brain for *in vitro* studies and subsequent *in vivo* studies.

- **Used for research aims 1-3.**
- **Used in phase 1 (hypothesis generation), phase 2 (hypothesis validation *in vitro*), and phase 3 (hypothesis validation *in vivo*)**

1a. Using the Cre-Lox system

In order to obtain primary cells that are known to serve as cell-of-origin for pediatric cancer from mice with high specificity, we want to make use of transgenic mouse models carrying the inducible Cre-lox system to facilitate lineage tracing experiments. For instance, CGNPs are known cells-of-origin for medulloblastoma (Yang et al, Cancer Cell 2008). During development, these cells are marked by expression of the Math1 gene (Machold and Fishell, Neuron 2005). Using the [REDACTED]

Further [REDACTED]

Experimentally, transgenic mice will be treated with a single dose of tamoxifen via oral gavaging, and sacrificed at a certain age. Target organs can be dissected at the desired time point, after which FACS can be employed to purify the labeled cells (i.e., cells-of-origin for the respective cancer type). The same

strategy can be employed for in situ immunohistochemistry studies to investigate the cells-of-origin in their native environment. Additionally, we can use these isolated cells as a starting point for modeling a full blown cancer, either in vitro or in vivo (see below at transplantations).

1b. Direct isolation

In some cases, using the Cre-lox system to label target cells may not be necessary (when tissue culture conditions favor outgrowth of the target cell, or when extracellular markers are available for FACS or MACS). For instance, subventricular zone-derived mouse neural stem cells or cortical astrocytes can be directly purified from dissected mouse brain since the culture media is only permissive for outgrowth of these (stem) cells (Doetsch et al, Neuron 2002). In this case, the experiment will involve the termination of mice at certain developmental stages, followed by tissue harvesting and isolation of primary cell cultures. Subsequently, similar in vitro analyses as described under 1a will be done. Likewise, these cells can also be used as starting point for modeling full blown pediatric cancer through transplantation techniques (see below).

Required mouse strains:

The [REDACTED] mice that we use can either be [REDACTED] mice, such as the [REDACTED] line, the [REDACTED] line, or mice [REDACTED]. Importantly, none of these strains has a [REDACTED]).

Animal experiment / Technique 2 (bijlage 2):

Generating transplantation mouse models for pediatric brain cancer.

- Used for research aim 3.
- Used in phase 3 (hypothesis validation *in vivo*)

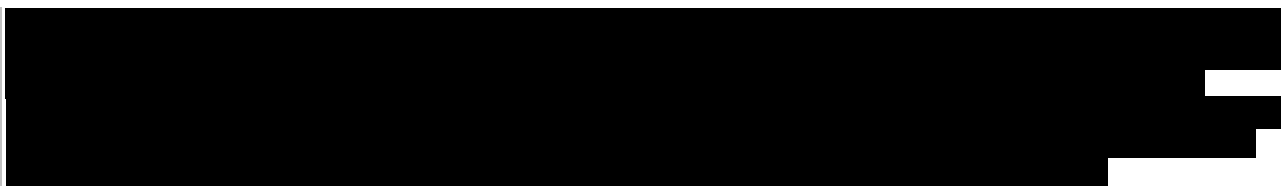
In general, mouse models for human cancer have been very powerful in answering fundamental questions about oncogenesis, such as the identification of driver mutations, the cell-of-origin, the mechanism of infiltrative growth and metastasis; and the application of drug treatments (Janbazian et al, J Neuro Oncol 2014). Transplantation models are based on the hetero- or orthotopic injection of mouse or human (tumor) cells into immune-deficient recipient mice. Advantages are a high tumor incidence with a relatively short latency, as well as the ease of ex vivo tumor cell genetic manipulation. Also, even though the interaction between a human tumor and a mouse environment is not naturally occurring, it is the only way to study the human tumor cell in in vivo surroundings. Another advantage is the option to non-invasively monitor tumor development in vivo, using IVIS imaging or MRI scanning.

2a. Intracranial transplantation of mouse tumor cells (derived under aims 1a and 1b).

Primary [REDACTED] have been frequently used [REDACTED]s [REDACTED]. In essence, a number of tumor cells in a small volume is injected into a particular area of the mouse brain. The stereotact is used to ensure correct localisation of the graft into the target area. After this procedure, the mice generally quickly recover and are followed for tumor development (specifically, for differences in tumor development between control and experimental animals).

It has been demonstrated by [REDACTED]. For most purposes, injection into areas of the brain that are not directly involved in vital functions, such as the striatum or cortex, are sufficient to drive accurate brain tumor growth resembling that observed in the patient (since the requirement of the presence of a neural niche is fulfilled). In a final experiment, it can be useful to demonstrate that observations made in such experiments (striatum/cortex), also hold true in the location in the brain that is native to the tumor type, such as the cerebellum for medulloblastoma or the pons/brain stem for DIPG glioblastoma.

For addressing our research questions, [REDACTED]



Investigated macroscopic parameters are incidence and time of onset. Microscopic analyses include invasion and metastasis, immunohistochemical analysis, and molecular profiling if appropriate (such as transcriptome, proteome, and (epi)genome analysis).

2b. Intracranial transplantation of human tumor cells.

Very similar to sub-aim 2a, human cells can be used in orthotopic intracranial transplantation experiments into immune-deficient mice (such as the NSG mouse). The difference lies in the source of the cells: they are human instead of mouse. For our purposes, we will use either normal human cells (such as neural stem cells) genetically engineered to become oncogenic; or we will use cells directly derived from human pediatric brain tumors (genetically engineered to test the function of a particular gene).

2c. Live imaging of tumor growth

Under certain circumstances, non-invasive techniques will be employed to monitor tumor development. This can be done using luciferase activity in combination with the IVIS camera system, or by performing MRI scanning. This can help us to gain insight into the kinetics of tumor development. Mice might also receive a single injection with BrdU (or an analog) to determine the proliferative index of the tumor.

3.4.3 Beschrijf en benoem de logische samenhang van deze verschillende onderdelen en de eventuele fasering in de uitvoering. Vermeld eventuele mijlpalen en keuzemomenten.

Time line:

As mentioned, experiments will be performed in a similar order as the research questions are asked. This because we are first screening for hypothesis generation (in combination with literature searches and our results from previous work). This phase 1 should take 1-2 years starting immediately.

Only plausible candidate genes will be selected to move to the next phase 2, where we will functionally test the candidates *in vitro*. This will start in year 2 and take 1-3 years, depending on the number of factors that we will test (expect around 2-8 candidate genes).

In vivo validation of candidate genes that have made it through testing in phase 2, will be performed in phase 3. We anticipate this will involve only few candidates, since we will only continue into phase 3 when we have robustly demonstrated their involvement in oncogenesis in *in vitro* experiments. Our aim is to start *in vivo* experiments in the second part of the project.

Go/no go points:

We expect that all or at least most of the proposed techniques will work, since [REDACTED]. Therefore, go/no go points are mainly dictated by the likelihood that a factor indeed plays a role in oncogenesis.

1. The moment we suspect we are not investigating a proper oncogene or tumor suppressor gene, we will not continue our research into the next phase.
2. Additionally, the moment one research line/factor looks very promising, we will focus on this line first.
3. Moreover, whereas we aim to perform our research in excellent models for human pediatric cancer, we will use existing cell lines for pre-work wherever we see if fit, as to reduce the numbers of animals used. Such side-projects might also provide results leading to a go/no go point.
4. Lastly, we will always perform small pilot experiments, especially in phase 3 (*in vivo* brain tumor modeling), before using an entire cohort. Unexpected results here will also give rise to a Go/No go point.

3.4.4 Benoem de typen dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.

Volgnummer	Type dierproef
1	Isolation of cells and tissue from mouse brain

2	Intracranial transplantation of brain tumor cells for modeling and imaging of brain cancer
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Format

Projectvoorstel dierproeven

- Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in.

2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- ☒ Fundamenteel onderzoek
- ☐ Translationeel of toegepast onderzoek
- ☐ Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- ☐ Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
- ☐ Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- ☐ Hoger onderwijs of opleiding
- ☐ Forensisch onderzoek
- ☐ Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2 aangekruiste categorieën.

- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
- Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
- Geef in geval van 'hoger onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

General introduction

Brain cancer is the main solid tumor in childhood. Every year, more than a hundred children are newly diagnosed with brain cancer in the Netherlands (source: SKION basis registration). Approximately thirty percent of these children cannot be cured. Further, anti-tumor treatment causes brain damage that leads to severe persisting side effects in those children that do survive, including neurocognitive impairments and secondary cancers. Therefore, there is an urgent need for improved therapies that effectively, but also exclusively target the brain tumor cell. To achieve this, thorough knowledge of the origin and biology of the tumor is essential.

Notably, the term brain cancer designates a variety of different tumor types that derive from the central nervous system (Fleming and Chi, *Curr Probl Ped Adolesc Health Care* 2012). Most frequent are malignant glioma (including glioblastoma) and medulloblastoma. The variety in tumor spectrum is probably a reflection of the heterogeneity within the nervous system. Along its anteroposterior and mediolateral axes, there are significant differences at the molecular and cellular level. These differences are established during embryonic development under the influence of morphogenic gradients, but they are maintained during adult life (Kiecker and Lumsden, *Ann Rev Neurosci* 2012).

It seems that hidden in this mixture of cells, there are several different brain tumor cells-of-origin that may be more or less sensitive to specific transforming events depending on developmental stage. Thus, potentially each cell-of-origin can give rise to a specific brain cancer entity during different developmental phases. Here, the cell-of-origin is defined as the normal, non-transformed cell type in which the initial oncogenic transforming event has taken place – this is of relevance since fullblown tumors often maintain the specific features of the cell-of-origin (Baker et al, *Glia* 2016; Liu and Zong, *Curr Opin Neurobiol* 2012). To complicate things further, tumors that appear similar at the histopathological level and have historically been classified as one disease, have recently been shown to differ at the level of gene expression and epigenetic landscape (=genome wide pattern of the different histone and DNA modifications, see also below)(Northcott et al, *Nat Rev Cancer* 2012; Sturm et al, *Nat Rev Cancer* 2014). So knowing all this, we can conclude that it will become essential to apply a personalized medicine approach to pediatric brain cancer patients in order to determine the unique characteristics of their disease.

However, if the ultimate aim is to treat these patients in a targeted manner leaving healthy cells unharmed, we also need to decipher what the driving forces behind each tumor subtype are and how we can target them. Importantly, while doing so we need to keep in mind that unlike an adult, a pediatric patient is in fact a developing organism, in which progenitor cell populations sensitive to oncogenic transformation may be present that do not exist in adults. Or which use different molecular mechanisms for cellular processes such as proliferation, differentiation, maintenance of genomic integrity and cell death compared to adults. The overall mutation rate in pediatric brain cancer can be up to tenfold lower than in adults, but changes in the epigenome predominate in children. And whereas in general, genomic instability is less profound in pediatric cancer, a subset of pediatric brain cancers belong to the most genomically unstable cancers found in humans (Downing et al, *Nat Gen.* 2014; Huether et al, *Nat Comm* 2014). To capture all the child- and disease specific characteristics as accurately as possible in preclinical research, it is vital to employ models that are highly representative of the patient. This is

Chromatin structure, gene expression and cell cycle progression

of Chromatin consists of the genome (DNA) and its tightly associated proteins, such as the histones. There are many different types of chromatin modifications, and their combined genome-wide expression profiles makes up what we call the epigenome or "epigenetic landscape". For instance, acetylation of certain histone amino acid residues (such as H3K27Ac) leads to weakened interactions between the DNA and the chromatin proteins, and thereby for instance to gene expression. Methylation of histone residues can both effect repressive or active chromatin, depending on the site of the modification. For instance H3K4me3 (trimethylation) is associated with active gene expression, whereas H3K9me3 or H3K27me3 are causing gene silencing. In general, the more tightly the histones are bound to the DNA, the less accessible DNA elements are for other factors (enzymes, structural proteins, DNA repair machinery etc). This is true for DNA elements that control gene expression, like promoters and enhancers, but also for more structural genomic elements such as the centromeric regions and the telomeres.

For normal cellular function, at times significant changes of the chromatin are required. If genes become expressed or silenced, the chromatin needs to be remodeled accordingly (Steffen and Ringrose, *Nat Rev*

Mol Cell Biol 2014). During mitosis, DNA needs to be condensed, which can only happen if the chromatin is properly modified (McKinley and Cheeseman, Nat Rev Mol Cell Biol 2015). Similarly, when there is DNA damage, modification of the chromatin is a prerequisite for repair. Any defect in this system can lead to erroneous gene expression and/or loss of genomic integrity. Evidence that such defects are at the source of human cancer is mounting, as the epigenetic landscape is often very different in cancer as compared to normal tissue and cells (Huether et al, Nat Comm 2014). Importantly, to fully understand the nature of defective signaling in cancer, one also needs to know how that mechanism works under normal, physiological circumstances. Therefore, [REDACTED].

Research interests and methods

Our main interests are [REDACTED]

2. [REDACTED] An assay that we frequently use to establish the profile of a certain chromatin mark, is the ChIP-seq experiment (=chromatin immunoprecipitation followed by DNA-next generation sequencing). In this assay, we use antibodies to pulldown the studied modified protein (for instance H3K27me3) from a cell or tissue. At the same time, we also pulldown the DNA where the protein was bound to. Using DNA-sequencing we can then identify all the genomic loci where the chromatin modification was present. Using bioinformatics, we can subsequently generate a genome-wide "epigenomic" map from these data. Often, we do this together with measuring protein and mRNA expression, as this allows us to determine what the functional consequence of the presence of a chromatin mark is (or the combination of different marks). This is particularly useful when we expect that the change in the epigenetic landscape primarily affects gene expression. However in certain regions of the genome (such as the telomeres and (peri)centromeres), the chromatin is not so much used for controlling gene expression, but for supporting the structure of the chromatin, for instance for physically connecting the machinery of the cell cycle that separates the chromatids during mitosis. Thus, [REDACTED].

Altogether, it is clear that children are not just little adults, nor are their diseases miniature versions of those found in adults. Unfortunately, pediatric brain cancer has not always been viewed in this way, with the result that current treatment strategies are largely based on the adult situation. Therefore, more research is required to identify the cells-of-origin for the various pediatric brain cancer types, and the (unique) molecular mechanisms that they use to undergo malignant transformation. Combining this knowledge will lead to improved understanding of the characteristics of the various brain tumor types, and ultimately to the development of novel targeted therapies.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

- In het geval het project gericht is op één of meer onderzoeksdoelen: op welke vra(a)g(en) dient dit project antwoord(en) te verschaffen?
- In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

[REDACTED] Therefore, it is necessary to [REDACTED].

Main aim:

To generate [REDACTED],
with the aim of addressing how [REDACTED].

Research questions underlying the main aim:

1. Exploring the [redacted] of [redacted] during [redacted] [redacted] (with emphasis on [redacted]).

2. Exploring the [redacted] of [redacted] [redacted].

3. Functional analysis/confirmation of the role of [redacted].

Research question 1:

Exploring the [redacted] of [redacted] [redacted] (with emphasis on control [redacted]).

It is known that for normal (embryonic) development, cells use chromatin modifications to set up specific gene expression patterns. For instance, a neural stem cell requires the expression of a different set of genes than its later descendant, such as the neuron or astrocyte. This is because different cell types have different functions that are performed by specific proteins (i.e., the neural stem cell needs to proliferate and build a tissue, whereas a neuron needs to transmit electrical stimuli). However, all cells have an identical genome, so specificity of gene expression cannot be controlled by the coding sequence itself. The epigenome (or epigenetic landscape) on the other hand, can exist in endless variations and thus provides the blueprint of *how* the genome should be used by a particular cell.

In development, the factor "time" therefore plays an important role, since cells are continuously changing their identity (=epigenome/gene expression profile) on their way to becoming an adult tissue. And this is thus also an important aspect when studying childhood cancer. In children, many transient stem-like cell populations are present. To fully understand the cancer that a child has, one needs to have knowledge of the cell's identity (i.e., gene expression and epigenome) at the precise moment in time when it underwent oncogenic transformation. This allows us to make predictions about how the tumor sustains itself, since the cellular functions of the founder cell (i.e., tumor cell-of-origin) are often preserved or used by the tumor (Marshall et al, Nat Rev Cancer 2014).

This is also the key aspect that we want to investigate in our first research aim: [redacted]. There is consensus on which cell lineage is at the root of the cancers that we are mainly studying ([redacted]). However, what we do not know, is [redacted]. Maybe they can do this [redacted]. This will have an impact on [redacted]. And ultimately, this is what determines [redacted].

Experimentally, we will [redacted]. At each time point, we will establish their epigenome using ChIP, as well as their transcriptome using RNA-next gen sequencing. These data we will integrate to understand the relationship between the changes in the epigenome and transcriptome that are naturally occurring. Then, we will compare [redacted].

[redacted]. From these analyses, we can [redacted].

[redacted] At the same time, [redacted].

Research question 2:

Exploring the [redacted] of [redacted] i. [redacted].

Next, we test our predictions to be valid in an oncogenic setting. Hereto, we can again use the isolated

cells-of-origin, and genetically engineer them to become [REDACTED]. For instance, we make them [REDACTED]. In addition, we manipulate the genes that we have [REDACTED]. We can do this either directly (changing the gene), or indirectly by altering the associated chromatin modifications (changing gene regulation). In *in vitro* assays, we then measure if our predicted factors indeed contribute to transformation. Cells might for example respond with increased proliferation, reduced cell death, increased migration etc. Additionally, we will also investigate the effect of [REDACTED]. As mentioned, changes [REDACTED]. Lastly, in addition to functionally demonstrating that our novel gene is involved in tumorigenesis, we will also try and decipher the molecular mechanism.

Research question 3:

Functional analysis/confirmation of the [REDACTED] of [REDACTED]

If research questions 1 and 2 have resulted in a robust identification of [REDACTED], we will finish the project by validating our finding in an *in vivo* model for the [REDACTED]. In essence, we will [REDACTED]. In addition, we will [REDACTED]. These [REDACTED] will be [REDACTED]. We will establish if [REDACTED]. Hereto, we will study [REDACTED]. We will also address if [REDACTED].

Feasibility

We expect the majority of the proposed experiments to be highly feasible. [REDACTED] are techniques that [REDACTED] have been using for the past years, also in combination with [REDACTED]. Further, we and our collaborators [REDACTED] have ample experience in [REDACTED]. Our preliminary results (mostly done in *in vitro* experiments) suggest our research questions to be relevant and warrant further testing in mouse (-derived) models for [REDACTED].

3.3 Belang

Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelstelling(en).

The primary importance of our proposed research is scientific, i.e. it will address fundamental questions about the biology of pediatric oncology. Our goal to perform our research projects using models that are highly relevant for the patient (and take into account the childhood-specific characteristics of the disease), which will lead to the generation of good quality preclinical data. These results can then be directly used as starting points for the development of new therapies, since accurate disease modeling reduces the chance of drawing incorrect or incomplete conclusions (as compared to using adult-based disease models or long-established cell lines). Also, the behavior of an altered pathway in an oncogenic setting can never be fully understood in a simple *in vitro* model, since the cancer is a complex disease that happens at the intersection between tumor cells, host cells, the immune system, the vascular system etc in 3D surroundings.

Our research questions are in line with the current insights into pediatric cancer biology. It is becoming increasingly clear that deregulation of the epigenome is a cardinal feature of pediatric (brain) cancer. This makes sense when considering the fact that a child is a developing organism, in which transient progenitor populations exist that together work towards the organs found in an adult individual. These cells normally use epigenetics as the key mechanism to orchestrate gene expression programmes appropriate for their differentiation stage. Thus, it is likely that these mechanisms are also targeted by the tumor cells. Furthermore, we have found that changes in the [REDACTED] also cause [REDACTED] in [REDACTED].

_____ which can lead to _____

Importantly, many components in epigenetic pathways are enzymes, which are preferred druggable targets. For many of them, lead compounds have already been developed and these can be quickly moved to translational research or clinical trials. Lastly, a novel tool named CRISPR/Cas9, has shown great promise with respect to the epigenetic editing technique. This technique allows scientists to revert changes in the epigenome in a well-controlled manner. Combining such strategies with knowledge generated by fundamental research will in the nearby future lead to novel ways to treat the pediatric cancer patient.

About one in three hundred children will receive the diagnosis cancer during childhood. On average, thirty percent of these children will not survive. Those that do survive often suffer from significant side effects, such as loss of cognitive function, growth retardation, infertility and secondary cancers. This can lead to a (strongly) reduced capacity to participate in society. A child with cancer also has a huge impact on families, so the social effects of this effect reach further than the patient. Altogether, we believe the proposed experiments using experimental animals are justifiable when looking at the benefit for the society.

3.4 Onderzoeksstrategie

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project (strategie).

For a graphic overview of the project, we refer to figure 1.

As can be seen in _____, the project starts with a **“hypothesis generating” phase**. During this phase, _____ are obtained from mice (bijlage 1) or human (not part of this CCD application). We will use _____ since it is _____

_____. We will investigate how these _____ this is controlled by the _____ and if/how this impacts on _____. We will also integrate these data with data from _____. Lastly, we will generate hypotheses on how _____.

In a **second phase (“Hypothesis validation in vitro”**, also bijlage 1), we will validate our hypotheses in *in vitro* experiments. We will use _____. In these cells, we will _____. In addition, we will _____ and determine its effect on _____

In the **third phase (“Hypothesis validation in vivo”** bijlage 2), we will confirm that _____. Hereto, we again use the _____. This will allow accurate modeling of _____.

Below is a more detailed description of the types of experiments that will be conducted:

For Phase 1: Screening phase/hypothesis generating phase, we will perform the following experiments (i.e., when they are appropriate for the particular research question. This summary describes the maximum number of experiments that we will perform).

- isolate tissue for histology, genome (PCR/DNA-seq), transcriptome (RNA expression/RNA-seq/qRT-PCR) epigenome (ChIP-PCR/ChIP-seq) and protein expression (Western blot, immunoprecipitation) analysis.
- collect purified cells for transcriptome, (epi)genome and protein expression analysis.
- _____
- Generate hypotheses on _____, and at which _____

For Phase 2: *in vitro* hypothesis testing phase, we will perform the following experiments (again, only when appropriate).

- [REDACTED]
- Perform [REDACTED]
- Test the effect of [REDACTED]
- Investigate [REDACTED]
- Test if these lesions are equally adequate in causing a [REDACTED]
- In the latter case, we will investigate [REDACTED].

For Phase 3: *in vivo* testing using intracranial transplantation brain cancer models if a selected gene/factor indeed contributes to oncogenesis.

- After certain candidate genes have been thoroughly validated in *in vitro* tests, we will continue to submit these factors to *in vivo* brain cancer models.
- Cells-of-origin for a particular brain cancer isolated from mouse will be genetically engineered with oncogenic lesions in combination with alterations in the factor that is tested. These cells will be injected into mouse brain (in parallel the appropriate control cells will be injected) and followed for tumor development.
- Alternatively or subsequently, cells of human origin will be employed in a similar fashion to demonstrate reproducibility in a human-based model.
- Mice will be monitored for: changes in tumor incidence and latency.
- Tumors will be harvested and analyzed for microscopic features (histopathologically/grading/tumor type etc), and for biochemical analysis (DNA mutational/CNV analysis and aneuploidy, alterations in gene and protein expression, alterations in the epigenome etc). Tumor bearing mice might receive a BrdU (or analog) injection prior to sacrifice to allow for assessment of the tumor proliferative index.

3.4.2 Geef een overzicht op hoofdlijnen van de verschillende onderdelen van het project en de daarbij gebruikte type(n) dierproef of dierproeven.

Animal experiment / Technique 1 (bijlage 1):

Prospective isolation of pediatric brain cancer cells-of-origin from different regions of the mouse brain for *in vitro* studies and subsequent *in vivo* studies.

- **Used for research aims 1-3.**
- **Used in phase 1 (hypothesis generation), phase 2 (hypothesis validation *in vitro*), and phase 3 (hypothesis validation *in vivo*)**

1a. Using the Cre-Lox system

In order to obtain primary cells that are known to serve as cell-of-origin for [REDACTED] from mice with high specificity, we want to make use of transgenic mouse models carrying the inducible Cre-lox system to facilitate lineage tracing experiments. For instance, [REDACTED] are known cells-of-origin for [REDACTED]. During development, these cells are marked by expression of the [REDACTED] gene ([REDACTED] Using the [REDACTED]

Further [REDACTED]

Experimentally, transgenic mice will be treated with a single dose of tamoxifen via oral gavaging, and sacrificed at a certain age. Target organs can be dissected at the desired time point, after which FACS can be employed to purify the labeled cells (i.e., cells-of-origin for the respective cancer type). The same

strategy can be employed for in situ immunohistochemistry studies to investigate the cells-of-origin in their native environment. Additionally, we can use these isolated cells as a starting point for modeling a full blown cancer, either in vitro or in vivo (see below at transplantations).

1b. Direct isolation

In some cases, using the Cre-lox system to label target cells may not be necessary (when tissue culture conditions favor outgrowth of the target cell, or when extracellular markers are available for FACS or MACS). For instance, subventricular zone-derived mouse neural stem cells or cortical astrocytes can be directly purified from dissected mouse brain since the culture media is only permissive for outgrowth of these (stem) cells (Doetsch et al, Neuron 2002). In this case, the experiment will involve the termination of mice at certain developmental stages, followed by tissue harvesting and isolation of primary cell cultures. Subsequently, similar in vitro analyses as described under 1a will be done. Likewise, these cells can also be used as starting point for modeling full blown pediatric cancer through transplantation techniques (see below).

Required mouse strains:

The [redacted] mice that we use can either be [redacted] mice, such as the [redacted] line, the [redacted] line, or mice [redacted]). Importantly, none of these strains has a [redacted]

Animal experiment / Technique 2 (bijlage 2):

Generating transplantation mouse models for pediatric brain cancer.

- Used for research aim 3.
- Used in phase 3 (hypothesis validation *in vivo*)

In general, mouse models for human cancer have been very powerful in answering fundamental questions about oncogenesis, such as the identification of driver mutations, the cell-of-origin, the mechanism of infiltrative growth and metastasis; and the application of drug treatments (Janbazian et al, J Neuro Oncol 2014). Transplantation models are based on the hetero- or orthotopic injection of mouse or human (tumor) cells into immune-deficient recipient mice. Advantages are a high tumor incidence with a relatively short latency, as well as the ease of ex vivo tumor cell genetic manipulation. Also, even though the interaction between a human tumor and a mouse environment is not naturally occurring, it is the only way to study the human tumor cell in in vivo surroundings. Another advantage is the option to non-invasively monitor tumor development in vivo, using IVIS imaging or MRI scanning.

2a. Intracranial transplantation of mouse tumor cells (derived under aims 1a and 1b).

Primary [redacted] have been frequently used [redacted]

[redacted] In essence, a number of tumor cells in a small volume is injected into a particular area of the mouse brain. The stereotact is used to ensure correct localisation of the graft into the target area. After this procedure, the mice generally quickly recover and are followed for tumor development (specifically, for differences in tumor development between control and experimental animals).

It has been demonstrated by [redacted]

[redacted] For most purposes, injection into areas of the brain that are not directly involved in vital functions, such as the striatum or cortex, are sufficient to drive accurate brain tumor growth resembling that observed in the patient (since the requirement of the presence of a neural niche is fulfilled). In a final experiment, it can be useful to demonstrate that observations made in such experiments (striatum/cortex), also hold true in the location in the brain that is native to the tumor type, such as the cerebellum for medulloblastoma or the pons/brain stem for DIPG glioblastoma.

For addressing our research questions, [redacted]

Investigated macroscopic parameters are incidence and time of onset. Microscopic analyses include invasion and metastasis, immunohistochemical analysis, and molecular profiling if appropriate (such as transcriptome, proteome, and (epi)genome analysis).

2b. Intracranial transplantation of human tumor cells.

Very similar to sub-aim 2a, human cells can be used in orthotopic intracranial transplantation experiments into immune-deficient mice (such as the NSG mouse). The difference lies in the source of the cells: they are human instead of mouse. For our purposes, we will use either normal human cells (such as neural stem cells) genetically engineered to become oncogenic; or we will use cells directly derived from human pediatric brain tumors (genetically engineered to test the function of a particular gene).

2c. Live imaging of tumor growth

Under certain circumstances, non-invasive techniques will be employed to monitor tumor development. This can be done using luciferase activity in combination with the IVIS camera system, or by performing MRI scanning. This can help us to gain insight into the kinetics of tumor development. Mice might also receive a single injection with BrdU (or an analog) to determine the proliferative index of the tumor.

3.4.3 Beschrijf en benoem de logische samenhang van deze verschillende onderdelen en de eventuele fasering in de uitvoering. Vermeld eventuele mijlpalen en keuzemomenten.

Time line:

As mentioned, experiments will be performed in a similar order as the research questions are asked. This because we are first screening for hypothesis generation (in combination with literature searches and our results from previous work). This phase 1 should take 1-2 years starting immediately.

Only plausible candidate genes will be selected to move to the next phase 2, where we will functionally test the candidates *in vitro*. This will start in year 2 and take 1-3 years, depending on the number of factors that we will test (expect around 2-8 candidate genes).

In vivo validation of candidate genes that have made it through testing in phase 2, will be performed in phase 3. We anticipate this will involve only few candidates, since we will only continue into phase 3 when we have robustly demonstrated their involvement in oncogenesis in *in vitro* experiments. Our aim is to start *in vivo* experiments in the second part of the project.

Go/no go points:

We expect that all or at least most of the proposed techniques will work, since [REDACTED]. Therefore, go/no go points are mainly dictated by the likelihood that a factor indeed plays a role in oncogenesis.

1. The moment we suspect we are not investigating a proper oncogene or tumor suppressor gene, we will not continue our research into the next phase.
2. Additionally, the moment one research line/factor looks very promising, we will focus on this line first.
3. Moreover, whereas we aim to perform our research in excellent models for human pediatric cancer, we will use existing cell lines for pre-work wherever we see if fit, as to reduce the numbers of animals used. Such side-projects might also provide results leading to a go/no go point.
4. Lastly, we will always perform small pilot experiments, especially in phase 3 (*in vivo* brain tumor modeling), before using an entire cohort. Unexpected results here will also give rise to a Go/No go point.

3.4.4 Benoem de typen dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.

Volgnummer	Type dierproef
1	Isolation of cells and tissue from mouse brain

2	Intracranial transplantation of brain tumor cells for modeling and imaging of brain cancer
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

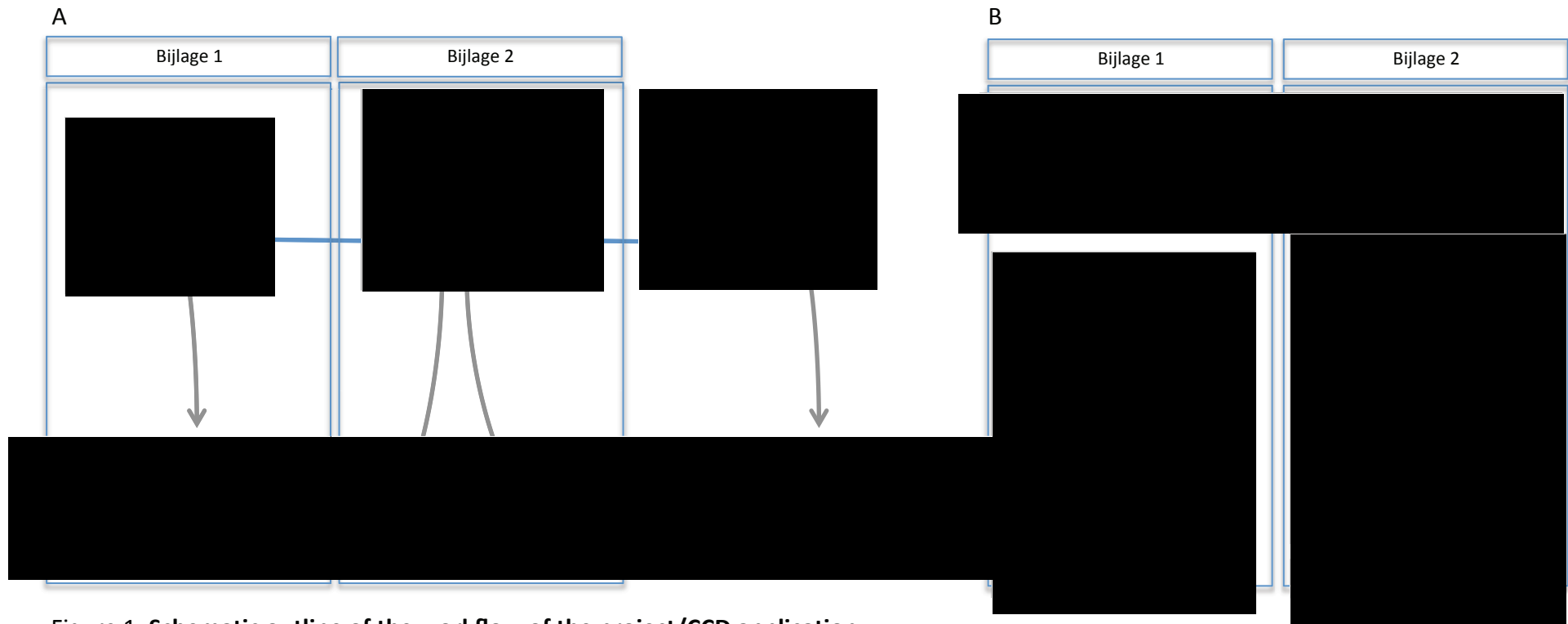


Figure 1. **Schematic outline of the workflow of the project/CCD application.**

A) Bird's eye overview of the CCD application:

These [redacted] at different [redacted] points. In the hypothesis generating phase, these cells will be [redacted] [redacted]. Data integration will lead to the understanding of how [redacted]. This will provide hypotheses as [redacted]. These hypotheses can be tested in *in vitro* experiments.

Upon validation of a hypothesis, it can be tested *in vivo*, using the [redacted] (bijlage 2).

B) Detailed schematic description of the contents of bijlage 1 and 2.

Important Go/No go points are during the hypothesis validation phase (bijlage 1). Whenever a [redacted] [redacted] (bijlage 2). Wherever possible, established cell lines will also be used to generate data supportive of the hypotheses.

Abbreviations: [redacted] Go/No go points indicated with [redacted] Blue arrows: [redacted]. Grey arrows: [redacted].



Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10500	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Rijksuniversiteit Groningen	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		1	Isolation of cells and tissue from mouse

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

The aim of this experiment is to isolate cells from mouse brain.

These cells will serve as [redacted] (to study their biology [redacted]), or as [redacted] (to study their biology [redacted]) both in *in vitro* and *in vivo* settings). The [redacted] that [redacted] are predominantly studying are [redacted]. For both tumors, the putative cells-of-origin are relatively well-described. However, since a [redacted], it is not yet fully clear at [redacted] these cells are targeted by [redacted]. Therefore, we will study them [redacted].

Source/methods:

To obtain these [redacted], and [redacted], we will take two approaches. **The first (A) is to use an inducible Cre-Lox system** to genetically label the target cell. **The second approach (B) is to directly isolate these cells from the mouse brain.**

A.

Prospective isolation of pediatric brain cancer cells-of-origin from different regions of the mouse brain for in vitro studies and subsequent in vivo studies using the inducible Cre-Lox system.

It is possible to genetically label brain tumor cell-of-origin populations with fluorescent proteins using the tamoxifen-inducible Cre-Lox system. This allows for the highly specific labeling and purification of the target population, as well as for developmental lineage-tracing. The advantage of this type of labeling over direct

isolation of cells from tissue, is that the isolated cell fraction is highly pure. This significantly adds to the analysis of for instance changes in the transcriptome or epigenome during development, since contaminating cells from another origin are basically absent and thus do not give noise. This makes this approach highly suitable for screening experiments in which the process of (embryonic) development is under investigation (=hypothesis generation). Additionally, these cells can be employed in cell culture experiments, where they can be subjected to functional experiments to test if a certain hypothesis is true (hypothesis validation and functional analysis).

Recently, [REDACTED] have generated [REDACTED]. This means that [REDACTED]. By treating a mouse [REDACTED], and [REDACTED]. Because this is a [REDACTED]. This means that we can use this mouse model for [REDACTED]. For future research, we could also [REDACTED].

Experiments planned with these cells in the first, hypothesis-generating phase (**phase 1**): We want to use this approach to collect [REDACTED]. This allows us to [REDACTED] that will help us to understand [REDACTED], and also [REDACTED]. Initial experiments include:

- isolate tissue for [REDACTED] analysis.
- collect purified cells for [REDACTED] analysis.
- Integrate all data to generate an overview of [REDACTED].
- Generate hypotheses on [REDACTED] (also based on literature/public databases with [REDACTED]).

Next, we want to move to the *in vitro* hypothesis validation phase (**phase 2**, functional analysis), in which we will perform the following types of experiments:

- isolate cells-of-origin to set up primary cell cultures
- Perform *in vitro* genetic manipulation of these cells to model loss or gain of candidate factors/genes involved in tumorigenesis
- Test the effect of the inflicted mutations in *in vitro* functional cancer assays such as migration/soft agar/colony-sphere formation/proliferation assays etc.
- Investigate biochemically what the mechanism is (such as altered gene expression caused by mutations in epigenetic genes, or genomic instability caused by oncohistone expression).
- Test if these [REDACTED], or if at a certain [REDACTED].
- In the latter case, we will investigate *in vitro* [REDACTED].
- Explore the mechanism.

Lastly, we will use such cells for the third phase (**phase 3**): *in vivo* hypothesis validation using intracranial transplantation brain cancer models to test if a selected gene/factor indeed contributes to oncogenesis.

- After certain candidate genes have been thoroughly validated in *in vitro* tests, we will continue to submit these factors to *in vivo* brain cancer models.
- Cells-of-origin for a particular brain cancer isolated from mouse will be genetically engineered with oncogenic lesions in combination with alterations in the factor that is tested. These cells will be injected into mouse brain (in parallel the appropriate control cells will be injected) and followed for tumor development.
- Alternatively or subsequently, cells of human origin will be employed in a similar fashion to demonstrate reproducibility in a human-based model.
- Mice will be monitored for: changes in tumor incidence, latency, overall survival

- Tumors will be harvested and analyzed for microscopic features (histopathologically/grading/tumor type etc), and for biochemical analysis (DNA mutational/CNV analysis and aneuploidy, alterations in gene and protein expression, alterations in the epigenome etc). Tumor bearing mice receive a BrdU (or similar marker) injection prior to sacrifice to allow for assessment of the tumor proliferative index, when required.

B.

Prospective isolation of pediatric brain cancer cells-of-origin from different regions of the mouse brain for in vitro studies and subsequent in vivo studies using direct isolation.

In certain cases, it is either not necessary or not possible to use transgene-assisted isolation of our target cells. For instance, neural stem cells can be relatively easily harvested directly from the neurogenic brain regions, and specific culture conditions will stimulate the expansion of these NSCs. Therefore, to obtain the

These cells will be subjected to similar experiments as described above under A.

Of note,

Although these cell cultures are

It has been shown that in

particular for

this method is very useful. We therefore favor this approach for the phase 3 experiments (see under A, intracranial transplantation experiments/*in vivo* pediatric brain cancer modeling).

C.

Harvesting surplus tissue and cells.

Occasionally, we require control tissues or cells for instance for setting up new immunolabelings, testing primers, optimizing tests etc. Often, this tissue could be obtained from any mouse regardless of age, genotype and gender (except for MEF cells, which can only be harvested from embryos). As a byproduct of our experiments, we will generate a number of surplus animals and surplus tissues, that would otherwise be discarded. We intend to use these materials for setting up assays, MEF test cultures and testing of reagents. No additional treatments, or mice, will be generated for this purpose, in fact it will reduce the total number of mice as we otherwise would have to breed mice especially for this.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

, and therefore we know that

Also, the

, and are breeding lines without discomfort. We will also use wild type mice, these strains also have no discomfort.

Currently, the is the only strain in which mice are . The other strains will generally only be treated with , and therefore does not cause any discomfort.

A:

For the former (tamoxifen treatment), the following experimental procedure is followed (isolation): Timed matings are set up. Pregnant females are treated once with tamoxifen during their pregnancy by oral gavaging (in some cases, neonates are treated instead, also by a single tamoxifen dose). Of note,

For treating neonates, we have special small feeding needles.

Offspring is harvested from the females at time points that are key in cerebellar development. Either embryos are harvested (in which case the female is terminated), or neonates or older offspring are harvested (in which case the female is left alive). From the isolated cerebella, the cells are purified using

FACS and used in the various experiments as outlined above.

B:

For the latter (direct isolation), the following procedure is performed (direct isolation):
Timed matings are set up. Mice are sacrificed at the desired time points (embryonic and postnatal), after which the brain regions of interest are collected. From this tissue, target cells will be purified.

Of note, in some cases different cell populations can be isolated from one mouse, such as [REDACTED], [REDACTED], which will lead to a reduction of the total number of requested mice.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

This protocol is not used for directly performing experiments with animals, but for the generation of material (cells) that are going to be used in subsequent in vitro and in vivo experiments.

Based on our experience in terms of material yield, we use the following criteria when collecting material:

- To investigate the [REDACTED], we aim at analyzing tissue from at least n=5 different mice (immunohistochemistry)
- We can perform transcriptome and (epi)genome analysis on the cells collected from a few mice, using special adapted protocols for low cell numbers and next-generation sequencing approaches. In the field, at least n=3 biological replicates are required for transcriptome and (epi)genome analysis, therefore we anticipate to use a minimum of approximately n=12 mice per assay.
- For protein expression and interaction studies in [REDACTED] we require the material of at least n=16 mice to obtain sufficient material and signal. This should be done in triplicate, so +/- n=48 mice per time point.
- For setting up cell cultures, it also depends on whether studying [REDACTED] how many mice are required. In general, an observation must be made in at least n=3 mice to be representative. [REDACTED] are seeded at high density and have only limited proliferative capacity. For [REDACTED] a rule of thumb is that at least n=2 mice are required to set up one culture. NSCs on the other hand have a very high proliferative potential. Multiple experiments can be done on primary NSCs isolated from one mouse, and therefore in principle, only limited numbers of mice are required for most experiments. Of note, since we do not prospectively isolate NSCs from mouse brain, these cells will always be subjected to a short culture step to purify them.
- Cell culture experiments include assays to test a hypothesis, such as measuring changes in proliferation, migration, differentiation, soft agar growth, but also retroviral transduction and subsequent intracranial transplantation for setting up in vivo tumor modeling. We estimate that for cell biological experiments in vitro, we will need around n=240 mice (20 x 6 wells plates) for [REDACTED] per time point, while for NSCs, we estimate that we will need n=6 mice per time point.
- Cell culture experiments for setting up intracranial transplantations experiments requires +/- n=2 mice per transplantation for [REDACTED] (as calculated in "bijlage 2"), whereas for NSCs, this number will be far lower as few mice can be the source for many transplantations for similar reasons as outlined above.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

All experiments will be performed on mice derived from in-house breeding lines. The choice for mice is because of the ease of handling, availability of tools for genetic engineering and biochemical assays, and consensus in the field to use mice for these types of experiments. Offspring of both female and male gender can be used.

Estimation of the required numbers of mice:

1.

[REDACTED] isolated using the tamoxifen-inducible Cre-Lox system:

- Experiments will be mostly done at at least n=3 different developmental time points.
- Because of the compound transgenic mouse model, in most cases a maximum of 50% of the offspring can be used (i.e., expresses the [REDACTED] transgene and thus can be used for genetic labeling)
- For timed matings, also parents are needed.

- Tissue will be harvested from +/- n=5 mice per developmental time point, in total this is approx n=15 mice (of the correct genotype).
- Isolated cells will be used for transcriptome and epigenome analyses: +/- n=16 mice per developmental time point, this is a total of approx n=48 mice (of the correct genotype).
- For protein analyses, we will use n=48 mice per developmental time point, therefore we estimate to use a total number of +/- n= 144 mice (of the correct genotype).
- For cell culture experiments for in vitro testing, as outlined above, we estimate to use n=240 mice per developmental time point, so in total about n=720 mice (of the correct genotype)
- For intracranial transplantation experiments, we do not plan to use transgenic [REDACTED] (we intend to use directly isolated wild type [REDACTED])

In total, $n = 15 + 48 + 144 + 720$ mice of the correct genotype are needed. Because a maximum of 50% of the genotypes is suitable, a total number of $n = 1854$ offspring are needed.

To obtain these offspring, breeding pairs are also needed. We expect each breeding pair to produce $n=12$ pups (in several litters). This implicates a requirement for $n=155$ breeding pairs, equals $n=310$ mice.

So for tamoxifen-CreLox assisted [REDACTED] isolation, a total number of $n=2164$

2.

- For intracranial transplantation assays, [REDACTED] will be directly isolated since culture and experimental conditions favor the outgrowth of [REDACTED]
- As outlined in "bijlage 2", a MAXIMUM number of transplantations will be done of $n=1200$ (900 into the cortex/striatum; 300 into the cerebellum). Per transplanted mouse, $n=2$ pups are required leading to a total requirement of $n= 2400$ mice (of three different age groups).
- To obtain these mice, breeding pairs are required $n= 200$ (12 pups per pair); which gives a total of $n=400$ parents

In total: $n=2400 + 400 = 2800$ mice are required.

3.

- Experiments will be done with cells derived from $n=3$ developmental time points
- As mentioned, because of the high proliferative capacity of these cells, $n=10$ mice per genotype (and per developmental time point) are sufficient to generate the material for all biochemical, cell culture and in vivo transplantation assays. This means $n= 30$ mice per genotype.
- Required [REDACTED] this is $n=180$ mice
- To obtain these mice, also breeding pairs are required $n=15$ breeding pairs, this means $n=30$ parents

The total requirement is $n=180 + 30$ mice = $n=210$ mice.

In total, a MAXIMUM of $n=2164 + 2800 + 210 = 5174$ mice are requested.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

☒ Nee

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welk keuzes daarbij zijn gemaakt.

The fact that we are using cell and tissue material to perform various *in vitro* experiments, already reduces the number of mice used as we will not continue to perform intracranial transplantation (for setting up brain tumor models, "bijlage 2") when we do not have reached an evidence-based and solid conclusion/hypothesis (Go/No go strategy). We also try to perform as many *in vitro* tests on the material as possible, thereby preventing the use of excessive numbers of mice. Further, when using neural stem cells, we can amplify the required material by a short tissue culture step, which strongly reduces the need for experimental animals.

The experimental procedure has been optimized to prevent as much discomfort as possible. The majority of the experiments involve only timed matings, followed by the sacrifice of mice without any further manipulations. Only mice receiving tamoxifen are subjected to this additional treatment. We have refined this procedure, since while in the literature 4 mg of tamoxifen is used, we have found that 2 mg of tamoxifen is sufficient to induce activation of the transgene and switching of the reporter. This is of relevance, since higher tamoxifen dosages have a negative impact on pregnancies (late abortions and perinatal death). With our concentration of tamoxifen, this phenotype is strongly reduced and we seldom have females suffering from discomfort due to the manipulation (refinement).

Also, even though we aspire to use primary material highly representative of the patient tumor-cell-of origin for our experiments, we will only do this after we have exhausted all other options to establish a hypothesis. For instance, much prework on mechanisms of cell division and epigenetics-regulated gene expression is done in (immortalized) fibroblast cultures or other immortal cell lines (replacement). We will thus only perform experiments in primary mouse material when other options are not available, or have already been used.

Lastly, for intracranial transplantation experiments with [REDACTED] (for modeling [REDACTED]) we intend to use directly-isolated [REDACTED] rather than [REDACTED]. This is possible because the manipulation and nature of the assay already leads to an enrichment of the [REDACTED] population. This leads to a strong reduction in mice needed, because we are not dependent on the genotype (reducing the number of required offspring already 50%)(reduction), nor do we need to treat animals with tamoxifen (refinement).

It should also be noted that the number of requested animals are an absolute MAXIMUM, because of the various Go/No go points the actual number of performed experiments will be lower.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Most of the experiments involve relatively simple techniques such as setting up timed matings, and subsequent termination of offspring. We do not expect any complications related to these handlings. A small number of mice will receive a single dose of tamoxifen by oral gavaging. It has been reported, that in some cases this can lead to damage of the oral cavity. [REDACTED]

However, we always monitor our mice on the day of injection and the day thereafter, to ensure no damage has been inflicted. If this is the case, the mouse will be sacrificed immediately (until so far, we have never experienced this).

Further, it is known that tamoxifen treatment during pregnancy may cause perinatal problems, such as late abortions and perinatal death. Therefore, we check our pregnant females daily around the day that they are giving birth, and terminate them immediately if we suspect she might have complications during labor. Thus, we are able to prevent discomfort by performing frequent health checks.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

Based on literature searches and communication with (inter)national colleagues at (informal) meetings, it is not likely that these experiments have been performed previously.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

☒ Nee

☐ Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

☐ Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting / humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

☒ Nee > Ga verder met vraag I.

☐ Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

☐ Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Incidentally, mice may get sick due to other reasons, that are not related to the animal experiment. In case of males, sometimes there may be wounding due to bite incidents. In case of signs of any disease or discomfort, mice will be terminated immediately. This should be detected early since we will be doing frequent health checks.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

As mentioned, a mouse can get sick for reasons unrelated to the experiment. Or brothers might incidentally bite each other.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk

te minimaliseren.

As mentioned, there will be very frequent health checks to prevent severe discomfort in the mice. In case of discomfort, mice will be terminated immediately as there is no experimental reason to keep such mice alive

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

X☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

In case of complications due to tamoxifen treatment during pregnancy, females might experience problems giving birth. Usually, no negative impact on the female is observed, however very rarely we have observed females that seemed unable to give birth to her offspring within a day following the expected due date.

Such females are immediately terminated, as we deem this a humane endpoint: not being able to give birth within the expected period that pups should be born.

Other humane endpoints will be reached if animals appear sick due to unrelated causes, as evidenced by lethargy, hunched backs, and weight loss.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

We expect << than 1% of the animals to reach such human endpoints

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

The vast majority of animals will only experience "licht" (mild) discomfort. Only those animals that reach a humane endpoint, will experience moderate discomfort, as do the mice that receive tamoxifen. The cumulative discomfort should therefore be classified as moderate.

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

☐ Nee

X☒ Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

For the harvesting of cells (and tissue), it is necessary to terminate mice.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

X☒ Ja



Bijlage Beschrijving dierproeven

8

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10500	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Rijksuniversiteit Groningen	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		1	Isolation of cells and tissue from mouse

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

The aim of this experiment is to isolate cells from mouse brain.

These cells will serve as [redacted] (to study their biology [redacted]), or as [redacted] (to study their biology [redacted]), both in *in vitro* and *in vivo* settings). The [redacted] that [redacted] are predominantly studying are [redacted]. For both tumors, the putative cells-of-origin are relatively well-described. However, since [redacted], it is not yet fully clear at [redacted] these cells are targeted by [redacted]. Therefore, we will study them [redacted].

Source/methods:

To obtain these [redacted], and [redacted] we will take two approaches. **The first (A) is to use an inducible Cre-Lox system** to genetically label the target cell. **The second approach (B) is to directly isolate these cells from the mouse brain.**

A.

Prospective isolation of pediatric brain cancer cells-of-origin from different regions of the mouse brain for in vitro studies and subsequent in vivo studies using the inducible Cre-Lox system.

It is possible to genetically label brain tumor cell-of-origin populations with fluorescent proteins using the tamoxifen-inducible Cre-Lox system. This allows for the highly specific labeling and purification of the target population, as well as for developmental lineage-tracing. The advantage of this type of labeling over direct

isolation of cells from tissue, is that the isolated cell fraction is highly pure. This significantly adds to the analysis of for instance changes in the transcriptome or epigenome during development, since contaminating cells from another origin are basically absent and thus do not give noise. This makes this approach highly suitable for screening experiments in which the process of (embryonic) development is under investigation (=hypothesis generation). Additionally, these cells can be employed in cell culture experiments, where they can be subjected to functional experiments to test if a certain hypothesis is true (hypothesis validation and functional analysis).

Recently, [REDACTED] have generated [REDACTED]. This means that [REDACTED]. By treating a mouse [REDACTED] and [REDACTED]. Because this is a [REDACTED]. This means that we can use this mouse model for [REDACTED]. For future research, we could also [REDACTED].

Experiments planned with these cells in the first, hypothesis-generating phase (**phase 1**):

We want to use this approach to collect [REDACTED]. This allows us to perform different types of analyses on these [REDACTED] understand how these [REDACTED]. Initial experiments include:

- isolate tissue for [REDACTED] analysis.
- collect purified cells for [REDACTED] analysis.
- Integrate all data to generate an overview of [REDACTED].
- Generate hypotheses on [REDACTED] (also based on literature/public databases with [REDACTED]).

Next, we want to move to the *in vitro* hypothesis validation phase (**phase 2**, functional analysis), in which we will perform the following types of experiments:

- isolate cells-of-origin to set up primary cell cultures
- Perform *in vitro* genetic manipulation of these cells to model loss or gain of candidate factors/genes involved in tumorigenesis
- Test the effect of the inflicted mutations in *in vitro* functional cancer assays such as migration/soft agar/colony-sphere formation/proliferation assays etc.
- Investigate biochemically what the mechanism is (such as altered gene expression caused by mutations in epigenetic genes, or genomic instability caused by oncohistone expression).
- Test if these [REDACTED], or if at a certain [REDACTED].
- In the latter case, we will investigate *in vitro* [REDACTED].
- Explore the mechanism.

Lastly, we will use such cells for the third phase (**phase 3**): *in vivo* hypothesis validation using intracranial transplantation brain cancer models to test if a selected gene/factor indeed contributes to oncogenesis.

- After certain candidate genes have been thoroughly validated in *in vitro* tests, we will continue to submit these factors to *in vivo* brain cancer models.
- Cells-of-origin for a particular brain cancer isolated from mouse will be genetically engineered with oncogenic lesions in combination with alterations in the factor that is tested. These cells will be injected into mouse brain (in parallel the appropriate control cells will be injected) and followed for tumor development.
- Alternatively or subsequently, cells of human origin will be employed in a similar fashion to demonstrate reproducibility in a human-based model.
- Mice will be monitored for: changes in tumor incidence, latency, overall survival

- Tumors will be harvested and analyzed for microscopic features (histopathologically/grading/tumor type etc), and for biochemical analysis (DNA mutational/CNV analysis and aneuploidy, alterations in gene and protein expression, alterations in the epigenome etc). Tumor bearing mice receive a BrdU (or similar marker) injection prior to sacrifice to allow for assessment of the tumor proliferative index, when required.

B.

Prospective isolation of pediatric brain cancer cells-of-origin from different regions of the mouse brain for in vitro studies and subsequent in vivo studies using direct isolation.

In certain cases, it is either not necessary or not possible to use transgene-assisted isolation of our target cells. For instance, neural stem cells can be relatively easily harvested directly from the neurogenic brain regions, and specific culture conditions will stimulate the expansion of these NSCs. Therefore, to obtain the

[REDACTED]. These cells will be subjected to similar experiments as described above under A.

Of note, [REDACTED]

[REDACTED]. Although these cell cultures are

[REDACTED]. It has been shown that in particular for [REDACTED]

[REDACTED]), this method is very useful. We therefore favor this approach for the phase 3 experiments (see under A, intracranial transplantation experiments/*in vivo* pediatric brain cancer modeling).

C.

Harvesting surplus tissue and cells.

Occasionally, we require control tissues or cells for instance for setting up new immunolabelings, testing primers, optimizing tests etc. Often, this tissue could be obtained from any mouse regardless of age, genotype and gender (except for MEF cells, which can only be harvested from embryos). As a byproduct of our experiments, we will generate a number of surplus animals and surplus tissues, that would otherwise be discarded. We intend to use these materials for 1. Histology-setting up immunolabelings and in situ hybridizations: by making paraffin or cryoblocks from surplus tissue we can optimize the hybridization conditions for antibodies and probes. 2. Biochemistry-testing and optimizing the use of PCR primers or antibodies for the detection of RNA and protein. This can be done on lysed tissue or cells. 3. Setting up MEF cultures-for use as control cells for the neural cell cultures (non-neural cells/cells negative for neural markers), and for optimisation of senescence assays. No additional treatments, or mice, will be generated for this purpose, in fact it will reduce the total number of mice as we otherwise would have to breed mice especially for this.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

The [REDACTED]

[REDACTED] and therefore we know that [REDACTED]

[REDACTED]. Also, the [REDACTED]

[REDACTED], and are breeding lines without discomfort. We will also use [REDACTED] these strains also have no discomfort.

Currently, the [REDACTED] is the only strain in which mice are [REDACTED]. The other strains will generally only be treated with [REDACTED], and therefore does not cause any discomfort.

A:

For the former (tamoxifen treatment), the following experimental procedure is followed ([REDACTED] isolation): Timed matings are set up. Pregnant females are treated once with tamoxifen during their pregnancy by oral gavaging (in some cases, neonates are treated instead, also by a single tamoxifen dose). Of note, [REDACTED]

_____ . For treating neonates, we have special small feeding needles.

Offspring is harvested from the females at time points that are key in cerebellar development. Either embryos are harvested (in which case the female is terminated), or neonates or older offspring are harvested (in which case the female is left alive). From the isolated cerebella, the cells are purified using FACS and used in the various experiments as outlined above.

B:

For the latter (direct isolation), the following procedure is performed [redacted] isolation):

Timed matings are set up. Mice are sacrificed at the desired time points (embryonic and postnatal), after which the brain regions of interest are collected. From this tissue, target cells will be purified.

Of note, in some cases different cell populations can be isolated from one mouse, such as [REDACTED], [REDACTED], which will lead to a reduction of the total number of requested mice.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

This protocol is not used for directly performing experiments with animals, but for the generation of material (cells) that are going to be used in subsequent in vitro and in vivo experiments.

Based on our experience in terms of material yield, we use the following criteria when collecting material:

- To investigate the [REDACTED], we aim at analyzing tissue from at least $n=5$ different mice (immunohistochemistry)
- We can perform transcriptome and (epi)genome analysis on the cells collected from a few mice, using special adapted protocols for low cell numbers and next-generation sequencing approaches. In the field, at least $n=3$ biological replicates are required for transcriptome and (epi)genome analysis, therefore we anticipate to use a minimum of approximately $n=12$ mice per assay.
- For protein expression and interaction studies in [REDACTED] we require the material of at least $n=16$ mice to obtain sufficient material and signal. This should be done in triplicate, so $\pm n=48$ mice per time point.
- For setting up cell cultures, it also depends on whether studying [REDACTED] how many mice are required. In general, an observation must be made in at least $n=3$ mice to be representative. [REDACTED] are seeded at high density and have only limited proliferative capacity. For [REDACTED] a rule of thumb is that at least $n=2$ mice are required to set up one culture. NSCs on the other hand have a very high proliferative potential. Multiple experiments can be done on primary NSCs isolated from one mouse, and therefore in principle, only limited numbers of mice are required for most experiments. Of note, since we do not prospectively isolate NSCs from mouse brain, these cells will always be subjected to a short culture step to purify them.
- Cell culture experiments include assays to test a hypothesis, such as measuring changes in proliferation, migration, differentiation, soft agar growth, but also retroviral transduction and subsequent intracranial transplantation for setting up in vivo tumor modeling. We estimate that for cell biological experiments in vitro, we will need around $n=240$ mice (20×6 wells plates) for [REDACTED] per time point, while for NSCs, we estimate that we will need $n=6$ mice per time point.
- Cell culture experiments for setting up intracranial transplantations experiments requires $\pm n=2$ mice per transplantation for [REDACTED] (as calculated in "bijlage 2"), whereas for NSCs, this number will be far lower as few mice can be the source for many transplantations for similar reasons as outlined above.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

All experiments will be performed on mice derived from in-house breeding lines. The choice for mice is because of the ease of handling, availability of tools for genetic engineering and biochemical assays, and consensus in the field to use mice for these types of experiments. Offspring of both female and male gender can be used.

Estimation of the required numbers of mice:

1.

██████ isolated using the tamoxifen-inducible Cre-Lox system:

- Experiments will be mostly done at at least $n=3$ different developmental time points (max 1 embryonic time point).
- Because of the compound transgenic mouse model, in most cases a maximum of 50% of the offspring can be used (i.e., expresses the [REDACTED] transgene and thus can be used for genetic labeling)
- For timed matings, also parents are needed.
- Tissue will be harvested from +/- $n=5$ mice per developmental time point, in total this is approx $n=15$ mice (of the correct genotype).
- Isolated cells will be used for transcriptome and epigenome analyses: +/- $n=16$ mice per developmental time point, this is a total of approx $n=48$ mice (of the correct genotype).
- For protein analyses, we will use $n=48$ mice per developmental time point, therefore we estimate to use a total number of +/- $n=144$ mice (of the correct genotype).
- For cell culture experiments for in vitro testing, as outlined above, we estimate to use $n=240$ mice per developmental time point, so in total about $n=720$ mice (of the correct genotype)
- For intracranial transplantation experiments, we do not plan to use transgenic [REDACTED] (we intend to use directly isolated wild type [REDACTED])

In total, $n=15 + 48 + 144 + 720$ mice of the correct genotype are needed. Because a maximum of 50% of the genotypes is suitable, a total number of $n=1854$ offspring are needed. Max 618 of these are embryos.

To obtain these offspring, breeding pairs are also needed. We expect each breeding pair to produce $n=12$ pups (in several litters). This implicates a requirement for $n=155$ breeding pairs, equals $n=310$ mice.

So for tamoxifen-CreLox assisted [REDACTED] isolation, a total number of $n=2164$

2.

- For intracranial transplantation assays, [REDACTED] will be directly isolated since culture and experimental conditions favor the outgrowth of [REDACTED]
- As outlined in "bijlage 2", a MAXIMUM number of transplantations will be done of $n=1200$ (900 into the cortex/striatum; 300 into the cerebellum). Per transplanted mouse, $n=2$ pups are required leading to a total requirement of $n=2400$ mice (of three different age groups, max number of embryos is 800).
- To obtain these mice, breeding pairs are required $n=200$ (12 pups per pair); which gives a total of $n=400$ parents

In total: $n=2400 + 400 = 2800$ mice are required.

3.

- Experiments will be done with cells derived from $n=3$ developmental time points
- As mentioned, because of the high proliferative capacity of these cells, $n=10$ mice per genotype (and per developmental time point) are sufficient to generate the material for all biochemical, cell culture and in vivo transplantation assays. This means $n=30$ mice per genotype.
- Required [REDACTED] this is $n=180$ mice (max number of embryos is 60)
- To obtain these mice, also breeding pairs are required $n=15$ breeding pairs, this means $n=30$ parents

The total requirement is $n=180 + 30$ mice = $n=210$ mice.

In total, a MAXIMUM of $n=2164 + 2800 + 210 = 5174$ mice are requested.
A maximum of 1478 of these mice are embryos.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt

geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

☒ Nee

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welk keuzes daarbij zijn gemaakt.

The fact that we are using cell and tissue material to perform various *in vitro* experiments, already reduces the number of mice used as we will not continue to perform intracranial transplantation (for setting up brain tumor models, "bijlage 2") when we do not have reached an evidence-based and solid conclusion/hypothesis (Go/No go strategy). We also try to perform as many *in vitro* tests on the material as possible, thereby preventing the use of excessive numbers of mice. Further, when using neural stem cells, we can amplify the required material by a short tissue culture step, which strongly reduces the need for experimental animals.

The experimental procedure has been optimized to prevent as much discomfort as possible. The majority of the experiments involve only timed matings, followed by the sacrifice of mice without any further manipulations. Only mice receiving tamoxifen are subjected to this additional treatment. We have refined this procedure, since while in the literature 4 mg of tamoxifen is used, we have found that 2 mg of tamoxifen is sufficient to induce activation of the transgene and switching of the reporter. This is of relevance, since higher tamoxifen dosages have a negative impact on pregnancies (late abortions and perinatal death). With our concentration of tamoxifen, this phenotype is strongly reduced and we seldom have females suffering from discomfort due to the manipulation (refinement).

Also, even though we aspire to use primary material highly representative of the patient tumor-cell-of origin for our experiments, we will only do this after we have exhausted all other options to establish a hypothesis. For instance, much prework on mechanisms of cell division and epigenetics-regulated gene expression is done in (immortalized) fibroblast cultures or other immortal cell lines (replacement). We will thus only perform experiments in primary mouse material when other options are not available, or have already been used.

Lastly, for intracranial transplantation experiments with [REDACTED] (for modeling [REDACTED] we intend to use directly-isolated [REDACTED] rather than [REDACTED]. This is possible because the manipulation and nature of the assay already leads to an enrichment of the [REDACTED] population. This leads to a strong reduction in mice needed, because we are not dependent on the genotype (reducing the number of required offspring already 50%)(reduction), nor do we need to treat animals with tamoxifen (refinement).

It should also be noted that the number of requested animals are an absolute MAXIMUM, because of the various Go/No go points the actual number of performed experiments will be lower.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Most of the experiments involve relatively simple techniques such as setting up timed matings, and subsequent termination of offspring. We do not expect any complications related to these handlings. A small number of mice will receive a single dose of tamoxifen by oral gavaging. It has been reported, that in some cases this can lead to damage of the oral cavity. [REDACTED]

However, we always monitor our mice on the day of injection and the day thereafter, to ensure no damage has been inflicted. If this is the case, the mouse will be sacrificed immediately (until so far, we have never experienced this).

Further, it is known that tamoxifen treatment during pregnancy may cause perinatal problems, such as late abortions and perinatal death. Therefore, we check our pregnant females daily around the day that they are

giving birth, and terminate them immediately if we suspect she might have complications during labor. Thus, we are able to prevent discomfort by performing frequent health checks.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

Based on literature searches and communication with (inter)national colleagues at (informal) meetings, it is not likely that these experiments have been performed previously.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

☒ Nee

☐ Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder valt?

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

☐ Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting / humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

☒ Nee > Ga verder met vraag I.

☐ Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

☐ Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Incidentally, mice may get sick due to other reasons, that are not related to the animal experiment. In case of males, sometimes there may be wounding due to bite incidents. In case of signs of any disease or discomfort, mice will be terminated immediately. This should be detected early since we will be doing

frequent health checks.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

As mentioned, a mouse can get sick for reasons unrelated to the experiment. Or brothers might incidentally bite each other.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

As mentioned, there will be very frequent health checks to prevent severe discomfort in the mice. In case of discomfort, mice will be terminated immediately as there is no experimental reason to keep such mice alive

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

X☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

In case of complications due to tamoxifen treatment during pregnancy, females might experience problems giving birth. Usually, no negative impact on the female is observed, however very rarely we have observed females that seemed unable to give birth to her offspring within a day following the expected due date. Such females are immediately terminated, as we deem this a humane endpoint: not being able to give birth within the expected period that pups should be born.

Other humane endpoints will be reached if animals appear sick due to unrelated causes, as evidenced by lethargy, hunched backs, and weight loss.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

We expect << than 1% of the animals to reach such human endpoints

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

The vast majority of animals will only experience "licht" (mild) discomfort. Only those animals that reach a humane endpoint, will experience moderate discomfort, as do the mice that receive tamoxifen (<3%). The cumulative discomfort should therefore be classified as moderate.

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

☐ Nee

X☒ Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

For the harvesting of cells (and tissue), it is necessary to terminate mice.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

X☒ Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10500	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Rijksuniversiteit Groningen	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	2	Intracranial transplantation of brain tumor cells for modeling and imaging of brain cancer

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Goal:

In this type of experiment, we will test the role of [redacted] modification in the genesis of [redacted] cancer. We will also address if there is a [redacted]

This latter aspect is particularly important when investigating [redacted]

Source of the material/methods:

We will use either [redacted]

[redacted]). Genetic engineering involves the infliction of tumor-predisposing genetic lesions, in combination with genetic lesions for factors (i.e., candidate genes) that we predict to contribute to tumorigenesis based on our previous research and on literature. Recipient mice need to be immuno-incompetent to prevent the rejection of the grafted cells. Tumor cells will be injected into the mouse brain using a stereotact for guidance.

For further explanation, it is useful to split this experiment up into the main types of brain cancer studied:

a. [redacted] and b. [redacted]

A.

modeling

For the modeling of [REDACTED] (mainly of the [REDACTED] subtype), we will make use of [REDACTED] isolated freshly from mouse [REDACTED] (biotechnical procedure described at bijlage 1). It has been described that medulloblastoma found in infants, young children and young adults differs in terms of mutations and gene expression. To test the [REDACTED] of [REDACTED] we will isolate [REDACTED] from [REDACTED] (we estimate that approx [REDACTED] will suffice in capturing the discrete [REDACTED]). These cells will be kept shortly in cell culture, and (lenti)retrovirally transduced with vectors containing oncogenic lesions. Within a few days, these cells will be transplanted into the mouse brain. Hereto, we will make use of stereotact-assisted injection of cells into a defined area of the brain: for initial experiments into a region commonly used for modeling brain tumors (striatum or frontal cortex, as it is known that these areas are not involved in controlling vital functions), and for a final confirmation experiment into the native area of the tumor: the [REDACTED] (this is a Go/No go point).

Genetic lesions will be (or will closely resemble) the following: [REDACTED]

[REDACTED] . All in conjunction with [REDACTED]
[REDACTED] On top of these [REDACTED]

Initial outcome parameters are tumor incidence and latency (time to onset). Additional parameters are tumor grading, invasion, metastasis, gene and epigenetic expression profiling, mutational analyses (to look for the effect on genomic instability). We might also isolate cell lines from the tumors for follow up *in vitro* studies. Where possible, we will use non-invasive imaging techniques (using the luciferase/IVIS imager or MRI scanning) to follow tumor progression in time.

Further, mice receive an injection of BrdU (or an analog) prior to sacrifice to determine the proliferative index of the tumor, when required. In some cases, mice might be fed Doxycycline through their drinking water or chow to control gene expression in the transplanted cells.

Previous experiments have shown that intracranial transplantation models for brain cancer have a relatively rapid onset of disease, and are fully penetrant. Depending on the strength of the oncogenic lesions, mice might need to be sacrificed from as early as 1 months to an average of 2-3 months following injection. Differences in latency can be few to several weeks. This depends on the oncogenic lesion and in case of novel candidate genes, is difficult to fully predict. Most people use around 25 mice per genotype to arrive at significant conclusions. Since the results are usually very reproducible, large spread within one experimental group (genotype) is uncommon. We therefore intend to always perform a pilot screen of n=5 injected mice per group to determine in what range our results will be. Only when the pilot screen suggests that we will find the expected results, we will continue performing the complete screen with the additional mice (Go/No Go point).

After completing our research using mouse-derived [REDACTED] we might perform a smaller experiment using human tumor cells to demonstrate that our results are also true in humans (this is a Go/No Go point).

B.

modeling

[REDACTED] modeling, we will make use of [REDACTED] cells). We will either model [REDACTED]) or [REDACTED]

[REDACTED] Incidentally, other glial tumors might be included.

It has been described that [REDACTED]
[REDACTED] There seems to be a relationship between [REDACTED]

[REDACTED]. To test the influence of [REDACTED], this is based on literature [REDACTED]. These cells will be shortly kept in cell culture, and (lenti)retrovirally transduced with vectors containing onconic lesions. Within a few days, these cells will be transplanted into the mouse brain. Hereto, we will make use of stereotact-assisted injection of cells into a defined area of the brain: for initial experiments into a region commonly used for modeling brain tumors (striatum or frontal cortex, as it is known that these areas are not involved in controlling vital functions), and for a final confirmation experiment into the native area of the tumor: the [REDACTED] (this is a Go/No go point).

Genetic lesions will be (or will resemble) the following: [REDACTED] which are known lesions in [REDACTED]. All in conjunction with [REDACTED] such as [REDACTED]. On top of these "basic" lesions [REDACTED] also add additional lesions of [REDACTED]. This includes but may not be limited to certain [REDACTED] or genes involved otherwise in [REDACTED].

Outcome parameters are largely similar to those described for [REDACTED] and include karyotyping of tumor(cells) and isolation of cell lines from the tumors. Live imaging might be performed, as well as BrDu or Doxycycline administration, when appropriate. And as described for medulloblastoma, we will always start experiments with a pilot of n=5 animals per group to test the feasibility of the experiment. We will not start injecting cells into the [REDACTED] once we are completely sure that we have a robust phenotype following standard intracranial transplantations (cortex/striatum)(Go/No Go).

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

For the experimental approach, there is no difference whether we are modeling [REDACTED] or [REDACTED]. Also, in this respect there is no [REDACTED] on [REDACTED] (or source: mouse vs human)(exception: when we are using doxycycline-inducible constructs for overexpression of a genetic construct, mice will be fed doxycycline in the chow or drinking water). Therefore, we can describe the experimental procedure for all experiments in one section.

Recipient mice are immuno-incompetent and therefore (group)housed in IVC cages. On the day of the transplantation, mice are anesthetized and receive analgesia. A small hole is drilled in their skull, guided by the stereotact. Mice are subsequently injected with a tumor cell suspension or pellet, in a very small volume, using an electrical pump and needle. After the injection, the skin of the mice is stitched and animals are allowed to recover in heated cages. They are treated with a sugar injection and analgesia. At all times will they be carefully monitored for any signs of stress.

In the following weeks, mice will receive around three health checks per week. We know from experience that weight loss is usually preceding signs of sickness and discomfort. Once alerted by a small weight loss, mice will be monitored daily, and they will be immediately terminated when the weight loss is >15% of their total body weight.

When required, we might follow tumor development non-invasively using luciferase imaging (IVIS camera), or scanning. This involves mild (inhalation) anesthesia, and an intraperitoneal injection of luciferin in the case of IVIS imaging. The frequency will be determined following the pilot intracranial transplantation experiment. We then know how rapid the onset of the disease is, so we know when to start imaging. On average, this might be once per week.

Further, mice receive an injection of BrdU (or an analog) prior to sacrifice to determine the proliferative index of the tumor, when required.

When showing signs of sickness, mice will be immediately sacrificed without hesitation, after which the tumors will be removed for further analysis.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

As mentioned, previous experiments [REDACTED] have shown that [REDACTED], and are usually [REDACTED]. This is also the major advantage of the model, together with the ease of *ex vivo* manipulation of the pre-transplantation cells. Depending on the strength of the oncogenic lesions, mice will need to be sacrificed from as early as 1 months to an estimated average of 2-3 months following injection. Differences in latency can be few to many weeks between groups. This depends on the oncogenic lesion and in case of novel candidate genes, is difficult to fully predict. Fortunately, within one group (i.e., with one combination of genetic lesions), results are usually very reproducible and large spread within one group is very uncommon. This is different when genetic mouse models are used, that often have a very long latency with large spread between animals of a similar group, leading to larger variations in results and loss of mice to unrelated causes.

Overall, most people use around 25 mice per genotype to arrive at significant conclusions (as opposed to the 40-50 animals frequently used in genetic models). We intend to always perform a pilot screen of approx n=5 injected mice per group to determine in what range our results will be. Only when the pilot screen suggests that we will find the expected results and be able to make these results significant, will we continue performing the complete screen with the additional mice (Go/No Go point). We will follow literature and aim for 25 mice per group. Before proceeding to complete the experiment, we will always consult with the animal welfare body and discuss the final numbers of mice required.

Lastly, as already discussed in section A, there are additional Go/No Go points that we apply to prevent unnecessary use of animals (see section A).

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

All experiments will be performed on adult immunocompetent mice (for instance, NSG mice). Both males and females can be used, as we do not expect strong differences between the two groups. We will obtain mice from our local breeding lines, or alternatively obtain them for commercial parties (Harlan, Jackson labs, Charles River etc). The choice for mice is the ease of handling, the availability of tools for the genetic engineering of the tumor cells, and the consensus in the scientific literature for using mice as model of choice.

Estimation of the required numbers of mice:

A. [REDACTED] modeling:

[REDACTED]-based:

- [REDACTED] from [REDACTED]
 - approx. [REDACTED], [REDACTED])
 - [REDACTED]
- will be tested in these conditions

This leads to a MAXIMUM total number of conditions or groups to be tested of n=36

Assuming we will use n=25 mice for the transplantation experiment of 1 group gives a total of n=900 mice

Repeating final experiments by injection into the [REDACTED] [REDACTED] of cortex/striatum (assume that 30% of our hypotheses were of good quality to warrant additional confirmation): estimated n=300 mice

Human cells based:

For [REDACTED] we will only use brain cancer patient-derived cells since the cells-of-origin ([REDACTED]) are not available from humans.

We follow the same reasoning as used for the confirmation experiments by injecting into the [REDACTED]. 30% of our findings will be re-tested using human cells, which leads to a total of n=300 mice

This leads to a MAXIMUM number $n=6$ conditions/groups to test
Assuming we will use $n=25$ mice per group gives a total of $n=150$ mice

B. [REDACTED] modeling

[REDACTED]-based:

- [REDACTED] from [REDACTED]

- approx [REDACTED]

[REDACTED] in combination with [REDACTED]

- [REDACTED]

This leads to a maximum number of groups of $n=72$ to test

Assuming we will use $n=25$ mice per group, this leads to a theoretical MAXIMUM number of $n=1800$ mice

Repeating final experiments by injection into the [REDACTED] instead of cortex/striatum (assuming 30% of our experiments will be repeated): estimated $n=600$ mice

Human cells based:

For [REDACTED] we can use both [REDACTED] cells, and [REDACTED] human [REDACTED]

Also here, we assume that around 30% of our original findings warrant confirmation using human cells:
 $n=600$ mice.

In total, this leads to $n=4500$ mice

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

☐ Nee

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welk keuzes daarbij zijn gemaakt.

Whenever possible, we are doing our experiments in cell culture and other in vitro types of experiments (replacement). In fact, before moving to intracranial transplantations, we have done a huge amount of research into testing our hypothesis without using live animals. During this process, we have established a number of Go/No go points where it should be decided if moving to animal experiments is in fact worthwhile, and justifiable.

However, cancer is a very complex disease that forms at the intersection of tumor cells, stromal cells, the extracellular space, the immune system etc. This is something that cannot be fully modeled in a culture system. The brain is particularly special, as its environment is unlike anywhere else in the body. A subcutaneous tumor assay for instance would not preserve nor sustain the typical growth of a brain tumor.

We are also first performing pilot experiments with small cohorts of animals, which provides another Go/No go point to decide if proceeding is justified (reduction). In this light, it is important to stress that the numbers of animals that we have proposed to use, are theoretical maximums. We expect that in reality we will use far less mice, as not all initial *in vitro* leads will reach the *in vivo* phase. Also, we will inject into

relatively receptive areas of the brain, where tumor development is known to not directly cause strong discomfort to the mice (refinement).

Further, where possible we will use non-invasive imaging to allow for early detection of tumor development. This together with the very frequent checking of the mice, should prevent the occurrence of major discomfort.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

During follow up, we check the mice at least three times per week for signs of discomfort (tremors, hunched back, lack of activity) and in particular for weight loss. In our experience, any weight loss that is greater than a few grams (>15% total weight) is almost hundred percent predictive of the presence of a tumor: therefore, we will use this as a major indicator that mice should be terminated immediately, to prevent reaching a humane end point.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

Based on literature searches and communication with (inter)national colleagues at meetings, it is not likely that these experiments have been performed previously.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

☒ Nee

☐ Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

☐ Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting / humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

☒ Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

☒ Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

Mice are anesthetized using Hypnorm/Dormicum in a quiet surroundings, and left on a warm surface until fully anesthetized (as checked with foot reflex). Mice will then receive a Rimadyl injection for pre-op analgesics. Lidocain cream will be used as local analgesia. Post-op, mice will receive a Buprenorfine/glucose/salt injection as analgesia. They will be left in a heated cage overnight. Buprenorfine injections might be repeated every 12 hours for the first day, when mice are showing signs of discomfort. These procedures are done according to standard operating procedures (SOPs), established by our

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

In extreme cases (for instance due to extremely strong oncogenic genetic lesions), and especially when cells are injected into the (regions of the brain involved in controlling vital functions), tumor growth may give discomfort faster than when injecting into the cortex/striatum. When we expect this, we will increase the frequency of health checks to once or more per day. Also, in case of any unexpected severe discomfort, mice will be terminated immediately without hesitation. Brain tumors generally do not metastasize, so this should not give any unforeseen discomfort. Mice may also get sick due to other reasons (recipient mice are immuno-compromised). In case of signs of any disease, mice will be terminated immediately. This should be detected early since we will be doing frequent health checks.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

As mentioned, tumor growth may influence brain functions required for body function. Accidental infections with pathogens can lead to experiment-unrelated disease.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

As mentioned, there will be very frequent health checks to prevent severe discomfort in the mice. In case of discomfort, mice will be terminated immediately, and without any restriction.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Yes, as mentioned above, tumor growth may become relatively quickly lethal for the mice. However, by very frequent health checks and especially weight checks, in the majority of cases this can be prevented. A humane end point is reached when a mouse is moribund, has neurological problems, weight loss of more than 15%, is lethargic, shows other signs of distress such as a hunched back, dull fur, or has been fighting with other mice etc. Tumor size is not a parameter, since this is difficult to determine given the intracranial location.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

We aim at keeping the number of mice that reach humane end points as low as possible. In our experience, 5-10% of the mice might reach this stage. Again, very frequent monitoring of mice has proven to be highly effective in preventing severe discomfort.

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

The intracranial transplantation procedure gives moderate discomfort to the animals. In case of tumor imaging, this gives mild discomfort to the animals. 5-10% of all animals are expected to reach a humane end point, some of these mice might experience severe discomfort. The cumulative levels of discomfort should be classified as moderate.

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

☐ Nee

X ☐ Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

We need to harvest the tumors for further analysis, this is an essential part of the experiment. Furthermore, mice with brain tumors cannot be kept alive. Control animals will be terminated at the end of the experiment.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

X ☐ Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10500	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Rijksuniversiteit Groningen	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	2	Intracranial transplantation of brain tumor cells for modeling and imaging of brain cancer

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Goal:

In this type of experiment, we will test the role of [redacted] modification in the genesis of [redacted] cancer. We will also address if there is a [redacted]

This latter aspect is particularly important when investigating [redacted]

Source of the material/methods:

We will use either [redacted]

[redacted]. Genetic engineering involves the infliction of tumor-predisposing genetic lesions, in combination with genetic lesions for factors (i.e., candidate genes) that we predict to contribute to tumorigenesis based on our previous research and on literature. Recipient mice need to be immuno-incompetent to prevent the rejection of the grafted cells. Tumor cells will be injected into the mouse brain using a stereotact for guidance.

For further explanation, it is useful to split this experiment up into the main types of brain cancer studied:

a. [redacted] and b. [redacted]

A.

modeling

For the modeling of [REDACTED] (mainly of the [REDACTED] subtype), we will make use of [REDACTED] isolated freshly from mouse [REDACTED] (biotechnical procedure described at bijlage 1). It has been described that medulloblastoma found in infants, young children and young adults differs in terms of mutations and gene expression. To test the [REDACTED] of the [REDACTED], we will isolate [REDACTED] from [REDACTED] (we estimate that approx [REDACTED] will suffice in capturing the discrete [REDACTED]). These cells will be kept shortly in cell culture, and (lenti)retrovirally transduced with vectors containing oncogenic lesions. Within a few days, these cells will be transplanted into the mouse brain. Hereto, we will make use of stereotact-assisted injection of cells into a defined area of the brain: for initial experiments into a region commonly used for modeling brain tumors (striatum or frontal cortex, as it is known that these areas are not involved in controlling vital functions), and for a final confirmation experiment into the native area of the tumor: the [REDACTED] (this is a Go/No go point).

Genetic lesions will be (or will closely resemble) the following: [REDACTED]

[REDACTED] . All in conjunction with [REDACTED] of [REDACTED]
On top of these [REDACTED]

Initial outcome parameters are tumor incidence and latency (time to onset). Additional parameters are tumor grading, invasion, metastasis, gene and epigenetic expression profiling, mutational analyses (to look for the effect on genomic instability). We might also isolate cell lines from the tumors for follow up *in vitro* studies. Where possible, we will use non-invasive imaging techniques (using the luciferase/IVIS imager or MRI scanning) to follow tumor progression in time.

Further, mice receive an injection of BrdU (or an analog) prior to sacrifice to determine the proliferative index of the tumor, when required. In some cases, mice might be fed Doxycycline through their drinking water or chow to control gene expression in the transplanted cells.

Previous experiments have shown that intracranial transplantation models for brain cancer have a relatively rapid onset of disease, and are fully penetrant. Depending on the strength of the oncogenic lesions, mice might need to be sacrificed from as early as 1 months to an average of 2-3 months following injection. Differences in latency can be few to several weeks. This depends on the oncogenic lesion and in case of novel candidate genes, is difficult to fully predict. Most people use around 25 mice per genotype to arrive at significant conclusions. Since the results are usually very reproducible, large spread within one experimental group (genotype) is uncommon. We therefore intend to always perform a pilot screen of n=5 injected mice per group to determine in what range our results will be. Only when the pilot screen suggests that we will find the expected results, we will continue performing the complete screen with the additional mice (Go/No Go point).

After completing our research using mouse-derived [REDACTED] we might perform a smaller experiment using human tumor cells to demonstrate that our results are also true in humans (this is a Go/No Go point).

B.

modeling

[REDACTED] modeling, we will make use of [REDACTED] cells). We will either model [REDACTED]) or [REDACTED]

[REDACTED] Incidentally, other glial tumors might be included.

It has been described that [REDACTED]
[REDACTED] There seems to be a relationship between the [REDACTED]

[REDACTED]. To test the influence of the [REDACTED]
[REDACTED]
this is based on literature [REDACTED]). These cells will be shortly kept in cell culture, and (lenti)retrovirally transduced with vectors containing onconic lesions. Within a few days, these cells will be transplanted into the mouse brain. Hereto, we will make use of stereotact-assisted injection of cells into a defined area of the brain: for initial experiments into a region commonly used for modeling brain tumors (striatum or frontal cortex, as it is known that these areas are not involved in controlling vital functions), and for a final confirmation experiment into the native area of the tumor: the [REDACTED] (this is a Go/No go point).

Genetic lesions will be (or will resemble) the following: [REDACTED]
[REDACTED],
which are known lesions in [REDACTED]. All in conjunction with [REDACTED],
such as [REDACTED]. On top of these "basic" lesions [REDACTED],
also add additional lesions of [REDACTED]. This includes but may not
be limited to certain [REDACTED], or genes involved
otherwise in [REDACTED].

Outcome parameters are largely similar to those described for [REDACTED] and include karyotyping of tumor(cells) and isolation of cell lines from the tumors. Live imaging might be performed, as well as BrDu or Doxycycline administration, when appropriate. And as described for medulloblastoma, we will always start experiments with a pilot of n=5 animals per group to test the feasibility of the experiment. We will not start injecting cells into the [REDACTED] once we are completely sure that we have a robust phenotype following standard intracranial transplantations (cortex/striatum)(Go/No Go).

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

For the experimental approach, there is no difference whether we are modeling [REDACTED] or [REDACTED]. Also, in this respect there is no [REDACTED] on [REDACTED] (or source: mouse vs human)(exception: when we are using doxycycline-inducible constructs for overexpression of a genetic construct, mice will be fed doxycycline in the chow or drinking water). Therefore, we can describe the experimental procedure for all experiments in one section.

Recipient mice are immuno-incompetent and therefore (group)housed in IVC cages. On the day of the transplantation, mice are anesthetized and receive analgesia. A small hole is drilled in their skull, guided by the stereotact. Mice are subsequently injected with a tumor cell suspension or pellet, in a very small volume, using an electrical pump and needle. After the injection, the skin of the mice is stitched and animals are allowed to recover in heated cages. They are treated with a sugar injection and analgesia. At all times will they be carefully monitored for any signs of stress.

In the following weeks, mice will receive around three health checks per week. We know from experience that weight loss is usually preceding signs of sickness and discomfort. Once alerted by a small weight loss, mice will be monitored daily, and they will be immediately terminated when the weight loss is >15% of their total body weight.

When required, we might follow tumor development non-invasively using luciferase imaging (IVIS camera), or scanning. This involves mild (inhalation) anesthesia, and an intraperitoneal injection of luciferin in the case of IVIS imaging. The frequency will be determined following the pilot intracranial transplantation experiment. We then know how rapid the onset of the disease is, so we know when to start imaging. On average, this might be once per week.

Further, mice receive an injection of BrdU (or an analog) prior to sacrifice to determine the proliferative index of the tumor, when required.

When showing signs of sickness, mice will be immediately sacrificed without hesitation, after which the tumors will be removed for further analysis.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

As mentioned, previous experiments [REDACTED], have shown that [REDACTED], and are usually [REDACTED]

[REDACTED] This is also the major advantage of the model, together with the ease of *ex vivo* manipulation of the pre-transplantation cells. Depending on the strength of the oncogenic lesions, mice will need to be sacrificed from as early as 1 months to an estimated average of 2-3 months following injection. Differences in latency can be few to many weeks between groups. This depends on the oncogenic lesion and in case of novel candidate genes, is difficult to fully predict. Fortunately, within one group (i.e., with one combination of genetic lesions), results are usually very reproducible and large spread within one group is very uncommon. This is different when genetic mouse models are used, that often have a very long latency with large spread between animals of a similar group, leading to larger variations in results and loss of mice to unrelated causes.

Overall, most people use around 25 mice per genotype to arrive at significant conclusions (as opposed to the 40-50 animals frequently used in genetic models). We intend to always perform a pilot screen of approx n=5 injected mice per group to determine in what range our results will be. Only when the pilot screen suggests that we will find the expected results and be able to make these results significant, will we continue performing the complete screen with the additional mice (Go/No Go point). We will follow literature and aim for 25 mice per group. Before proceeding to complete the experiment, we will always consult with the animal welfare body and discuss the final numbers of mice required.

Lastly, as already discussed in section A, there are additional Go/No Go points that we apply to prevent unnecessary use of animals (see section A).

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

All experiments will be performed on adult immunocompetent mice (for instance, NSG mice). Both males and females can be used, as we do not expect strong differences between the two groups. We will obtain mice from our local breeding lines, or alternatively obtain them for commercial parties (Harlan, Jackson labs, Charles River etc). The choice for mice is the ease of handling, the availability of tools for the genetic engineering of the tumor cells, and the consensus in the scientific literature for using mice as model of choice.

Estimation of the required numbers of mice:

A. [REDACTED] modeling:

[REDACTED]-based:

- [REDACTED] from [REDACTED]
 - approx. [REDACTED], [REDACTED])
 - [REDACTED])
- will be tested in these conditions

This leads to a MAXIMUM total number of conditions or groups to be tested of n=36

Assuming we will use n=25 mice for the transplantation experiment of 1 group gives a total of n=900 mice

Repeating final experiments by injection into the [REDACTED] [REDACTED] of cortex/striatum (assume that 30% of our hypotheses were of good quality to warrant additional confirmation): estimated n=300 mice

Human cells based:

For [REDACTED] we will only use brain cancer patient-derived cells since the cells-of-origin ([REDACTED]) are not available from humans.

We follow the same reasoning as used for the confirmation experiments by injecting into the [REDACTED] 30% of our findings will be re-tested using human cells, which leads to a total of n=300 mice

This leads to a MAXIMUM number $n=6$ conditions/groups to test
Assuming we will use $n=25$ mice per group gives a total of $n=150$ mice

B. [REDACTED] modeling

[REDACTED]-based:

- [REDACTED] from [REDACTED]

- approx [REDACTED]

[REDACTED], in combination with [REDACTED]

This leads to a maximum number of groups of $n=72$ to test

Assuming we will use $n=25$ mice per group, this leads to a theoretical MAXIMUM number of $n=1800$ mice

Repeating final experiments by injection into the [REDACTED] instead of cortex/striatum (assuming 30% of our experiments will be repeated): estimated $n=600$ mice

Human cells based:

For [REDACTED] we can use both [REDACTED] cells, and [REDACTED] human [REDACTED]

Also here, we assume that around 30% of our original findings warrant confirmation using human cells:
 $n=600$ mice.

In total, this leads to $n=4500$ mice

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

☐ Nee

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welk keuzes daarbij zijn gemaakt.

Whenever possible, we are doing our experiments in cell culture and other in vitro types of experiments (replacement). In fact, before moving to intracranial transplantations, we have done a huge amount of research into testing our hypothesis without using live animals. During this process, we have established a number of Go/No go points where it should be decided if moving to animal experiments is in fact worthwhile, and justifiable.

However, cancer is a very complex disease that forms at the intersection of tumor cells, stromal cells, the extracellular space, the immune system etc. This is something that cannot be fully modeled in a culture system. The brain is particularly special, as its environment is unlike anywhere else in the body. A subcutaneous tumor assay for instance would not preserve nor sustain the typical growth of a brain tumor.

We are also first performing pilot experiments with small cohorts of animals, which provides another Go/No go point to decide if proceeding is justified (reduction). In this light, it is important to stress that the numbers of animals that we have proposed to use, are theoretical maximums. We expect that in reality we will use far less mice, as not all initial *in vitro* leads will reach the *in vivo* phase. Also, we will inject into

relatively receptive areas of the brain, where tumor development is known to not directly cause strong discomfort to the mice (refinement).

Further, where possible we will use non-invasive imaging to allow for early detection of tumor development. This together with the very frequent checking of the mice, should prevent the occurrence of major discomfort.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

During follow up, we check the mice at least three times per week for signs of discomfort (tremors, hunched back, lack of activity) and in particular for weight loss. In our experience, any weight loss that is greater than a few grams (>15% total weight) is almost hundred percent predictive of the presence of a tumor: therefore, we will use this as a major indicator that mice should be terminated immediately, to prevent reaching a humane end point.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

Based on literature searches and communication with (inter)national colleagues at meetings, it is not likely that these experiments have been performed previously.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

☒ Nee

☐ Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

☐ Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting / humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

☒ Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

☒ Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

Mice are anesthetized using Hypnorm/Dormicum in a quiet surroundings, and left on a warm surface until fully anesthetized (as checked with foot reflex). Mice will then receive a Rimadyl injection for pre-op analgesics. Lidocain cream will be used as local analgesia. Post-op, mice will receive a Buprenorfine/glucose/salt injection as analgesia. They will be left in a heated cage overnight. Buprenorfine injections might be repeated every 12 hours for the first day, when mice are showing signs of discomfort. These procedures are done according to standard operating procedures (SOPs), established by our [REDACTED]

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

In extreme cases (for instance due to extremely strong oncogenic genetic lesions), and especially when cells are injected into the [REDACTED] (regions of the brain involved in controlling vital functions), tumor growth may give discomfort faster than when injecting into the cortex/striatum. When we expect this, we will increase the frequency of health checks to once or more per day. Also, in case of any unexpected severe discomfort, mice will be terminated immediately without hesitation. Brain tumors generally do not metastasize, so this should not give any unforeseen discomfort. Mice may also get sick due to other reasons (recipient mice are immuno-compromised). In case of signs of any disease, mice will be terminated immediately. This should be detected early since we will be doing frequent health checks.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

As mentioned, tumor growth may influence brain functions required for body function. Accidental infections with pathogens can lead to experiment-unrelated disease.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

As mentioned, there will be very frequent health checks to prevent severe discomfort in the mice. In case of discomfort, mice will be terminated immediately, and without any restriction.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Yes, as mentioned above, tumor growth may become relatively quickly lethal for the mice. However, by very frequent health checks and especially weight checks, in the majority of cases this can be prevented. A humane end point is reached when a mouse is moribund, has neurological problems, weight loss of more than 15%, is lethargic, shows other signs of distress such as a hunched back, dull fur, or has been fighting with other mice etc. Tumor size is not a parameter, since this is difficult to determine given the intracranial location.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

The majority of mice will reach a humane endpoint. In our experience, due to early detection of weight loss before the appearance of other symptoms, discomfort is still mild at that stage. 5-10% of the mice might experience increased discomfort when reaching the human endpoint. Again, very frequent monitoring of mice has proven to be highly effective in preventing severe discomfort.

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

The intracranial transplantation procedure gives moderate discomfort to the animals. In case of tumor imaging, this gives mild discomfort to the animals. The majority of the animals will reach a humane endpoint. Due to early detection of weight loss, around 90% of these mice will experience mild discomfort at

that stage. 5-10% will experience moderate discomfort from tumor growth at that stage. << 5% will experience severe discomfort at that stage. The cumulative levels of discomfort should be classified as moderate.

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

☐ Nee

X☐ Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

We need to harvest the tumors for further analysis, this is an essential part of the experiment. Furthermore, mice with brain tumors cannot be kept alive. Control animals will be terminated at the end of the experiment.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

X☐ Ja

Format DEC-advies

Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de Praktische Handreiking: Ethisch Toetsingskader voor proefdiergebruik. Voor voorbeelden, zie bijlage I.

Herhaling van antwoorden is niet nodig. Indien van toepassing kan verwezen worden naar een bij een eerdere vraag verstrekt antwoord.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: Interne RUG code **8077**
2. Titel van het project: **Chromatin regulation in pediatric brain cancer**
3. Titel van de NTS: **Chromatine regulatie in kinderhersenkanker**
4. Type aanvraag:
 - ☐ **nieuwe aanvraag projectvergunning**
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: **DEC-RUG**
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ☐ ontvangen door DEC: **07-12-2016**
 - ☐ aanvraag compleet: **07-12-2016**
 - ☐ in vergadering besproken: **15-12-2016**
 - ☐ anderszins behandeld: **29-12-2016**
 - ☐ termijnonderbreking(en) van / tot: **16-12-2016 tot 19-12-2016**
 - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: **n.v.t.**
 - ☐ aanpassing aanvraag: **19-12-2016**
 - ☐ advies aan CCD: **09-01-2017**
7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.
De IvD heeft aangegeven dat de aanvraag met de IvD is afgestemd.

Bij de punten 8 t/m 10 kan worden volstaan met 'n.v.t.' wanneer de betreffende acties niet aan de orde zijn geweest.

8. Eventueel horen van aanvrager: **n.v.t.**
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Gestelde vraag / vragen
 - Verstrekt(e) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag
9. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: **16-12-2016**
 - Gestelde vraag/vragen:**

1/ Er is een discrepantie in ongerief inschaling in de NTS en bijlage 2. Kunt u dit corrigeren?

2/ Er is sprake van veel redundantie in de tekst van de aanvraag. Een redactionele suggestie zou zijn om het geheel compacter op te schrijven en herhalingen eruit te halen teneinde een beter leesbare aanvraag te krijgen.

- Datum antwoord: **19-12-2016**
- Verstrekt(e) antwoord(en):
 - 1/Ik heb dit verkeerd beschreven in de NTS, dit is nu aangepast en volgens mij klopt het nu wel.
 - 2/Ik heb de gehele aanvraag en de bijlagen opnieuw doorgenomen en gekeken waar naar mijn idee stukken tekst kunnen verwijderd/ingekort. Hierbij wil ik de opmerking maken dat ik het moeilijk vind om in te schatten wanneer iets "superfluous" is, omdat ik niet weet welke achtergrond kennis de reviewers precies hebben. Mijn oplossing is in zo'n geval om dan maar zo veel mogelijk informatie te geven, zodat de informatie in ieder geval beschikbaar is, maar dit komt de leesbaarheid niet perse ten goede.
 - Het is niet handig om hier alle passages die ik heb gewijzigd op te schrijven. Wat ik daarom heb gedaan is twee documenten van elk bestand gemaakt: het bestand met het achtervoegsel "Marked" heeft in geel gemarkeerd de plaatsen waar de wijzigingen zijn gemaakt. Het andere bestand is het gewijzigde, definitieve bestand dat naar de CCD kan worden gestuurd. Hier en daar heb ik ook nog een paar typfouten veranderd.

- **De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag**

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

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? **Ja**
2. Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is.
Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.
3. De aanvraag betreft een **nieuwe aanvraag**
4. Is de DEC competent om hierover te adviseren? **Ja**
5. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies.
Indien van toepassing, licht toe waarom. **n.v.t.**

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft (*Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld*).

Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. Immers, de verschillende subdoelen zijn zowel tijdsafhankelijk als uitkomstafhankelijk van elkaar. Deze subdoelen zijn allemaal

noodzakelijk om de doelstelling te behalen. Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft zowel binnen de doelstellingen als tussen de doelstellingen criteria beschreven op basis van welke criteria deze zal besluiten het project wel of niet te continueren. De DEC vertrouwt erop 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. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Flora- en faunawet).

Niet tot de taken van de DEC behorend, overeenkomstig de WoD.

3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel. **De doelcategorie sluit aan bij de hoofddoelstelling.**

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Het directe doel is het opzetten van kinder-specifieke modellen voor kinder hersen kanker en de cellen waaruit deze ontwikkelden en daarmee te onderzoeken hoe

. Het uiteindelijke doel is om betere behandelingen voor kinder hersen kanker te ontwikkelen.

Er is geen directe en reële relatie tussen het directe en uiteindelijke doel. Het uiteindelijke doel zal waarschijnlijk binnen de looptijd van het project niet gehaald worden. Het project is gericht op fundamenteel onderzoek m.b.t. de hierboven beschreven (directe) doel. Deze mechanismen zijn tot op heden niet (voldoende) opgehelderd, en ook de waarde van het interveniëren in deze mechanismen als behandeling voor kinder hersen kanker is onvoldoende geëxploreerd. De aanvrager heeft duidelijk gemaakt wat dit project kan bijdragen aan het onderzoeksveld en het directe doel is dus gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld*)

De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamentele/translationele project, wat gericht is op het onderzoek naar mechanismen in chromatine controle van hersen kanker zijn de proefdieren, en de doelgroep/patiënt en diens naasten.

Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: de integriteit van de dieren zal worden aangetast, de dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress

ondervinden en ongerief ondergaan.

Waarden die voor patiënten bevorderd kunnen worden: de gezondheid van patiënten kan hierdoor verbeterd worden. Hierdoor kan de kwaliteit van leven verbeterd worden van patiënten en van hun naasten.

6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten. Zo ja, benoem deze, leg uit waarom daar sprake van kan zijn en geef aan of deze effecten afgedekt worden door specifieke wet- en regelgeving op het gebied van het omgaan met voor het milieu risicovolle stoffen of organismen.

Niet tot de taken van de DEC behorend overeenkomstig de WoD.

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe. *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C5).* **Voor zover de DEC kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat gezien de wetenschappelijke output alsmede de aandacht voor de drie V's**
8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe. *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6).* **De DEC is er van overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling in het kader van het project.**

Welzijn dieren

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en of de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de Dierproeven (Wod). voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw beoordeling toe *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C1; zie bijlage I voor toelichting en voorbeelden).* **N.v.t.**

- ☐ 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. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. **De DEC heeft zich ervan verzekerd dat zulks het geval is.**

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). **De DEC vertrouwt erop dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen.**
12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). (*zie bijlage I voor voorbeeld*). **De integriteit van het dier wordt aangetast door genetische verandering, intracraniale transplantatie, BrdU injectie en opoffering.**
13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

Naar de mening van de DEC zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven en is de inschatting van het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken eveneens zorgvuldig aangegeven in de projectaanvraag.

3V's

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*). **De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De complexe omstandigheden voor tumor ontwikkeling in de hersenen zijn in vitro niet na te bootsen.**
15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).
- Naar de mening van de DEC is het aantal te gebruiken dieren realistisch ingeschat en wel zodanig dat niet meer dan nodig, maar ook niet minder dan nodig dieren worden gebruikt voor het behalen van een betrouwbaar wetenschappelijke resultaat zulks mede gebaseerd op de door de aanvrager aangeleverde literatuur referenties.**
16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).
- De DEC heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen. Hierbij heeft de DEC onder andere de pijnbestrijding en huisvesting in haar beoordeling betrokken.**
17. Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over

voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Licht uw beoordeling toe.

Voor zover de DEC kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat en mede gezien het daartoe strekkende antwoord van de aanvrager in de projectaanvraag heeft de DEC reden aan te nemen dat onnodige duplicatie achterwege blijft.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3; zie bijlage I voor voorbeeld*).

In onderhavige projectaanvraag worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt. De onderzoeker heeft naar de mening van de DEC deze keuze in de projectaanvraag voldoende onderbouwd. Alhoewel de DEC-RUG vermindering van proefdieren in voorraad gedood toejuicht is zij overigens van mening dat dit aspect met name met de centrale dienst proefdieren en de aanvrager kortgesloten dient te worden daar de DEC niet betrokken is bij de fok en aankoop van proefdieren.

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geef ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

Naar de mening van de DEC is dit genoegzaam beschreven in de projectaanvraag door de aanvrager.

20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is. **N.v.t.**

NTS

21. Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd?

Naar de mening van de DEC is zulks het geval.

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.A*).

Rechtvaardigen de doelstellingen van het project “Chromatin regulation in pediatric brain cancer”, dat gericht is op een beter begrip van de onderliggende

mechanismen van het ontstaan van hersenkanker bij kinderen het lichte-matige ongerief, dat de muizen wordt aangedaan in het onderhavige project?

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.B; zie bijlage I voor voorbeelden).

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: matig ongerief.

Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: dit aspect is voor de weging door de DEC-RuG niet relevant.

Waarden die voor de doelgroep bevorderd worden: mogelijk groot voordeel voor patiënten.

Algemeen: vergroting van medische kennis met betrekking tot het ontstaan van hersenkanker bij kinderen, een ziekte met desastreuze consequenties, en een bijdrage aan verbeterde gezondheidszorg.

De DEC-RuG is van mening dat de belangen van de samenleving in het algemeen en de patiënten en hun naasten in het bijzonder binnen het project "Chromatin regulation in pediatric brain cancer?" zwaarder wegen dan de belangen / waarden van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven, na licht-matig ongerief, tot de dood. Zij worden door de experimenten in hun welzijn geschaad. Ten gevolge van de proeven zullen de dieren stress ondervinden. De integriteit van de dieren zal worden aangetast door het toedienen van tamoxifen via gavage of intracraniale transplantaties van tumor(voorloper)cellen, BrdU injectie en de opoffering aan het eind van de proeven.

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project echter kunnen leiden tot een relevante uitbreiding van medisch-wetenschappelijke kennis over het ontstaan van hersenkanker bij kinderen. Dit is een zeer ernstige aandoening waar een deel aan overlijdt en de overlevenden ernstige complicaties aan kunnen over houden. Een beter begrip van het ontstaan van pediatrische hersentumoren is van maatschappelijk belang, alsmede voor de kinderen zelf en hun naasten.

Vandaar dat de DEC-RuG het onderhavige onderzoek, zowel vanuit wetenschappelijk als vanuit maatschappelijk oogpunt, van reëel belang acht. Het is aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. De onderzoekers zullen zoveel mogelijk trachten het welzijn van de dieren te bevorderen, waardoor het werkelijke ongerief van de dieren beperkt blijft in relatie tot het te behalen voordeel.

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2). Onderbouw hoe al deze elementen zijn meegewogen bij de beantwoording van de centrale morele vraag, zodanig dat het navolgbaar is zonder gedetailleerde kennis te hebben van het projectvoorstel (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.C; zie bijlage I voor voorbeeld).

De DEC-RuG beantwoordt de centrale morele vraag: *Rechtvaardigt de doelstelling van het project “Chromatin regulation in pediatric brain cancer”, dat gericht is op een verbeterd inzicht in het ontstaan van hersenkanker bij kinderen, de opoffering en het lichte-matige ongerief, dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project* bevestigend.

Hoewel de DEC-RuG de intrinsieke waarde van het dier onderschrijft en oog heeft voor het te ondergaan ongerief van de proefdieren, weegt het reële belang van dit project naar haar mening zwaarder.

De DEC-RuG is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De onderzoekers beschikken over de benodigde kennis en technische expertise. Er is geen sprake van duplicatie.

In de gekozen strategie wordt op bevredigende wijze tegemoet gekomen aan de vereisten van vervanging, vermindering en verfijning. De DEC-RuG is er van overtuigd dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren als het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. De DEC-RuG is ervan overtuigd dat er geen alternatieven zijn, waardoor deze dierproef met minder ongerief of met minder, dan wel zonder levende dieren zou kunnen worden uitgevoerd.

Op grond van deze overwegingen beschouwt de DEC-RuG de voorgestelde dierproeven in het projectvoorstel “Chromatin regulation in pediatric brain cancer” als ethisch gerechtvaardigd en voorziet derhalve het onderhavige projectvoorstel van een positief advies.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

☐ **De DEC adviseert de vergunning te verlenen.**

2. Het uitgebrachte advies is kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificieer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.A; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.B*).

N.v.t. De DEC is overigens niet gewoon projectaanvragen buiten de context c.q. haar verantwoordelijkheid en competentie te beoordelen.

Van: [REDACTED]
 Verzonden: donderdag 26 januari 2017 14:21
 Aan: [REDACTED]
 Onderwerp: Aanvraag AVD105002017813

Geachte DEC,

Wij hebben een aanvraag in behandeling waarover u advies heeft gegeven, te weten AVD105002017813.

U heeft de vragen C2 en C6 niet beantwoord. Tijdens het voorzittersoverleg is gesproken over vragen C2 en C6. Wij verzoeken u deze vragen in toekomstige adviezen te beantwoorden in lijn met datgene dat is afgesproken tijdens dat overleg.

Verder willen wij u informeren dat wij de aanvrager vandaag nog een aantal vragen hebben gesteld:

Uit uw aanvraag blijkt dat embryo's gebruikt zullen worden. In de NTS heeft u aangegeven dat ongeveer 30% van de dieren embryo's zullen zijn. Dit blijkt echter niet uit de aanvraag zelf. Aangezien wij in een eventuele vergunning het aantal embryo's moeten specificeren, verzoeken wij u per bijlage aan te geven hoeveel embryo's er gebruikt gaan worden.

-U geeft aan dat in bijlage 3.4.4.1. ook weefsel en cellen geïsoleerd zullen worden voor het opzetten en optimaliseren van nieuwe assays etc. U heeft hierbij ruimte opengelaten de dieren voor nog andere doeleinden te gebruiken. Het is echter niet toegestaan dieren te gebruiken voor andere dan in de aanvraag beschreven doeleinden. U wordt verzocht verder in te kaderen voor welke doeleinden u weefsels en cellen gaat isoleren.

-In bijlage 3.4.4.2 geeft u aan dat 5-10% van de dieren een humaan eindpunt zullen bereiken. U vermeldt ook dat een deel van de dieren waarschijnlijk ernstig ongerief zullen ondergaan. In de ongeriefsclassificatie wordt echter alleen over matig ongerief gesproken. U wordt verzocht dit te verhelderen en aan te geven hoeveel dieren er naar verwachting ernstig ongerief zullen ondergaan. Indien noodzakelijk wordt u ook verzocht de NTS daarop aan te passen.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl (Let op: nieuw e-mail adres)

Van: Info-zbo
Verzonden: donderdag 26 januari 2017 14:07
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: Aanvullende informatie AVD105002017813

Geachte [REDACTED]

Op 9 januari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Chromatin regulation in pediatric brain cancer' met aanvraagnummer AVD105002017813. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden.

-Uit uw aanvraag blijkt dat embryo's gebruikt zullen worden. In de NTS heeft u aangegeven dat ongeveer 30% van de dieren embryo's zullen zijn. Dit blijkt echter niet uit de aanvraag zelf. Aangezien wij in een eventuele vergunning het aantal embryo's moeten specificeren, verzoeken wij u per bijlage aan te geven hoeveel embryo's er gebruikt gaan worden.

-U geeft aan dat in bijlage 3.4.4.1. ook weefsel en cellen geïsoleerd zullen worden voor het opzetten en optimaliseren van nieuwe assays etc. U heeft hierbij ruimte opengelaten de dieren voor nog andere doeleinden te gebruiken. Het is echter niet toegestaan dieren te gebruiken voor andere dan in de aanvraag beschreven doeleinden. U wordt verzocht verder in te kaderen voor welke doeleinden u weefsels en cellen gaat isoleren.

-In bijlage 3.4.4.2 geeft u aan dat 5-10% van de dieren een humaan eindpunt zullen bereiken. U vermeldt ook dat een deel van de dieren waarschijnlijk ernstig ongerief zullen ondergaan. In de ongeriefsclassificatie wordt echter alleen over matig ongerief gesproken. U wordt verzocht dit te verhelderen en aan te geven hoeveel dieren er naar verwachting ernstig ongerief zullen ondergaan. Indien noodzakelijk wordt u ook verzocht de NTS daarop aan te passen.

-Tot slot, willen wij u er op wijzen dat de NTS een aantal termen bevat die voor een leek niet te begrijpen zijn. Wij raden u daarom aan de NTS aan te passen.

Opsturen binnen veertien dagen

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

Wanneer een beslissing

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

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl (Let op: nieuw e-mail adres)

Groningen, 6 feb 2017

Dear members of the CCD,

Hereby, I address the issues raised by the CCD concerning our CCD application "Chromatin regulation in pediatric brain cancer" AVD105002017813. Please find my responses below each question.

Question 1:

Uit uw aanvraag blijkt dat embryo's gebruikt zullen worden. In de NTS heeft u aangegeven dat ongeveer 30% van de dieren embryo's zullen zijn. Dit blijkt echter niet uit de aanvraag zelf. Aangezien wij in een eventuele vergunning het aantal embryo's moeten specificeren, verzoeken wij u per bijlage aan te geven hoeveel embryo's er gebruikt gaan worden.

Answer:

Indeed, the percentage mentioned in the NTS is not correct. In bijlage 1, we plan to isolate cells at three different time points. A maximum of one of these three time points will be during embryonic development. Therefore, in the NTS I wrote that 30% of the animals used will be embryos. But of course, the total number of animals used in the entire CCD is larger and also concerns experiments that have nothing to do (directly) with embryos, such as setting up timed matings and performing intracranial transplantations.

A maximum of 1478 embryos will be used in bijlage 1.

No embryos will be used in bijlage 2.

The total number of requested animals is 9674.

Thus, the percentage of embryos maximally used is 15%

I have clarified this in bijlage 1, as well as corrected this in the NTS.

Question 2:

U geeft aan dat in bijlage 3.4.4.1. ook weefsel en cellen geïsoleerd zullen worden voor het opzetten en optimaliseren van nieuwe assays etc. U heeft hierbij ruimte opengelaten de dieren voor nog andere doeleinden te gebruiken. Het is echter niet toegestaan dieren te gebruiken voor andere dan in de aanvraag beschreven doeleinden. U wordt verzocht verder in te kaderen voor welke doeleinden u weefsels en cellen gaat isoleren.

Answer:

The text in bijlage 1 referring to surplus tissue has been specified into:

We intend to use these materials for 1. Histology-setting up immunolabelings and in situ hybridizations: by making parafin or cryoblocks from surplus tissue we can optimize the hybridization conditions for antibodies and probes. 2.

Biochemistry-testing and optimizing the use of PCR primers or antibodies for the detection of RNA and protein. This can be done on lysed tissue or cells. 3. Setting up MEF cultures-for use as control cells for the neural cell cultures (non-neural cells/cells negative for neural markers), and for optimisation of senescence assays. No additional treatments, or mice, will be generated for this purpose, in fact it will reduce the total number of mice as we otherwise would have to breed mice especially for this.

Question 3:

In bijlage 3.4.4.2 geeft u aan dat 5-10% van de dieren een humaan eindpunt zullen bereiken. U vermeldt ook dat een deel van de dieren waarschijnlijk ernstig ongerief zullen ondergaan. In de ongeriefsclassificatie wordt echter alleen over matig ongerief gesproken. U wordt verzocht dit te verhelderen en aan te geven hoeveel dieren er naar verwachting ernstig ongerief zullen ondergaan. Indien noodzakelijk wordt u ook verzocht de NTS daarop aan te passen.

For bijlage 1, the total discomfort is classified as moderate. However, most animals will experience mild discomfort. Only the females that receive tamoxifen (3% of the total number of mice from bijlage 1), plus << 1% of mice that experience moderate discomfort due to reasons unrelated to the experiment, experience moderate discomfort.

For bijlage 2, the total discomfort is classified as moderate.

- All animals will experience moderate discomfort from the intracranial injection.
- Tumor imaging, when applied, will give mild discomfort.
- Tumor growth will give discomfort that will mostly be mild but in some cases moderate, and rarely severe.

For the third point (discomfort due to tumor development), I confused reaching a humane endpoint with experiencing moderate (or severe) discomfort due to tumor development. But this is not the same.

Basically all mice will reach the humane endpoint as experimental and humane endpoints are reached at the same time (except the controls, which will not develop tumors). This is because one definition of the humane endpoint is when a mouse exhibits weight loss. In our experience, in almost all cases weight loss precedes the appearance of other signs of discomfort. Thus, discomfort is still mild at that stage. 5-10% of the mice might however experience at least moderate discomfort from tumor growth, which is when they show other signs of discomfort (neurological changes) before weight loss has become apparent. Less than 5% might experience severe discomfort. Moderate and severe discomfort can occur when the tumor has rapidly reached a part of the brain harboring vital functions. Overall, bijlage 2 has a moderate level of discomfort.

For the total project, since the expected percentage of mice experience severe discomfort is much lower (<2.5%) than the total number of mice (experiencing mild or moderate discomfort), we believe the project has an overall rating of moderate.

I have addressed this in bijlage 2J and K. I have also corrected this in the NTS.

Question 4:

Tot slot, willen wij u er op wijzen dat de NTS een aantal termen bevat die voor een leek niet te begrijpen zijn. Wij raden u daarom aan de NTS aan te passen.

This has been done, please see the NTS.

Sincerely,

A solid black rectangular box used to redact a signature.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1

9713 AV GRONINGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

16 FEB. 2017

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD105002017813

Bijlagen

1

Datum 15 februari 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 9 januari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Chromatin regulation in pediatric brain cancer" met aanvraagnummer AVD105002017813. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 08 februari 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Wij hebben u om aanvullende informatie gevraagd over het aantal embryo's en de ongeriefsclassificatie. Daarnaast hebben wij u gevraagd de aanvraag verder in te kaderen en de NTS aan te passen.

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.

Met het oog op artikel 10a, lid 1, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

U kunt met uw project "Chromatin regulation in pediatric brain cancer" starten. De vergunning wordt afgegeven van 15 februari 2017 tot en met 31 januari 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1, lid 1d en lid 3, in de wet. Meer informatie over de eisen bij een beoordeling achteraf vindt u in de bijlage.
ernstig ongerief

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-RUG gevoegd. Dit advies is opgesteld op 9 januari 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:

15 februari 2017

Aanvraagnummer:

AVD105002017813

Bezwaar

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

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisend belang.

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

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

Meer informatie

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

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



Ir. G. de Peute
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

Datum:
15 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD105002017813



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan
Naam: Rijksuniversiteit Groningen
Adres: A. Deusinglaan 1
Postcode en plaats: 9713 AV GRONINGEN
Deelnemersnummer: 10500

deze projectvergunning voor het tijdvak 15 februari 2017 tot en met 31 januari 2022, voor het project "Chromatin regulation in pediatric brain cancer" met aanvraagnummer AVD105002017813, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-RUG. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]. De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 9 januari 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 8 februari 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 8 februari 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 9 januari 2017, ontvangen op 9 januari 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 08 februari 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1. Isolation of cells and tissue from mouse				Aantal embryo's: 1478
	Muizen (Mus musculus) /	5.174	100% Matig	
3.4.4.2. Intracranial transplantation of brain tumor cells for modeling and imaging of brain cancer				
	Muizen (Mus musculus) /	4.500	5% Ernstig 95% Matig	

Voorwaarden

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

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk januari 2023 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast

Aanvraagnummer:

AVD105002017813

wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst de dierproeven conform de vergunning waren.

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:

AVD105002017813

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:

AVD105002017813

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

Einde van een dierproef

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

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

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

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

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

Beoordeling achteraf

Volgens artikel 10a1, lid 1d en lid 3 van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld worden.