

<b>Inventaris Wob-verzoek W17-07</b>										
		<b>wordt verstrekt</b>				<b>weigeringsgronden</b>				
<b>nr.</b>	<b>document NTS 2017825</b>	<b>reeds openbaar</b>	<b>niet</b>	<b>geheel</b>	<b>deels</b>	<b>10.1.c</b>	<b>10.2.e</b>	<b>10.2.g</b>	<b>11.1</b>	
1	Aanvraagformulier				x		x	x		
2	NTS	x								
3	Projectvoorstel			x						
4	Bijlage animal procedure 1			x						
5	Bijlage animal procedure 2			x						
6	Bijlage animal procedure 5			x						
7	Ontvangstbevestiging				x		x	x		
8	DEC advies				x		x	x		
9	Advies CCD		x						x	
10	Beschikking en vergunning				x		x	x		



18 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](http://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>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in	10700
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Maastricht Universiteit
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	50169181
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>	Straat en huisnummer	Minderbroedersberg 4-6
		Postbus	616
		Postcode en plaats	6200MD Maastricht
		IBAN	NL04 INGB 0679 5101 68
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Maastricht University
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[REDACTED]
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> 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 - 3 - 2017
- Einddatum 1 - 3 - 2022
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- The role of serotonin in post-traumatic stress disorder
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Het belang van de neurotransmitter serotonine bij posttraumatische stress stoornis (PTSS).
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC DEC-UM
- Postadres Postbus 616, 6200 MD Maastricht
- E-mailadres

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1441 Lege  
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  
*Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*  
 Via een eenmalige incasso  
 Na ontvangst van de factuur

## 5 Checklist bijlagen

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

## 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 ondertekende 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 Maastricht   
 Datum 16 - 1 - 2017  
 Handtekening 



## Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see our website ([www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 Provide the title of the project.

### 2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.
- Basic research
- Translational or applied research
- Regulatory use or routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or
- Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- Higher education or training
- Forensic enquiries
- Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

### 3 General description of the project

#### 3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

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

#### **Post-traumatic stress disorder (PTSD)**

Experiencing intense terror as during combat situations or sexual violation can have devastating effects on a person's mental sanity. Flashbacks, often expressed in nightmares, confront the person with the

traumatic event otherwise avoided as much as possible in both actions and thoughts. A general hyperarousal debilitates the person and seriously constrains the outlook on the future. The combined symptomatology is referred to as post-traumatic stress disorder (PTSD), which has a lifetime prevalence of 5-8% globally (Kessler et al., 1995) and up to 35% in post-war countries (Priebe et al., 2010). Although not everybody experiencing the same traumatic event will eventually develop PTSD, conversely interpersonal differences in perceiving the level of the trauma make it considerably hard to study PTSD in experimentally reduced settings.

### **Faulty pattern separation processing**

The mechanism of learned fear allows animals to generate adaptive responses to situations that threaten their safety on the basis of previous experiences. These responses take place, depending on time scale at the neurochemical (e.g. serotonin, catecholamines etc.), neuroendocrine (e.g. HPA-axis releasing corticotropin releasing hormones) and/or neuroanatomical level (e.g. hippocampus, amygdala etc.) (Sherin & Nemeroff, 2011). Based on simple classical conditioning principles, neutral stimuli repeatedly presented in close space-time association with the adverse event will eventually suffice in eliciting a conditioned fear response. New, non-identical but similar stimuli will not trigger the conditioned response in healthy subjects, but do so in subjects suffering from PTSD (Pitman et al., 2012). It is believed that faulty pattern separation processes, resulting in over-generalizing (Kheirbek et al., 2012) lay at the root of this pathological reaction. In such a scenario e.g. the smell of a summer BBQ is not distinguished anymore from the smell of burning human flesh during combat hence triggering the same aberrant behavior.

### **How to study faulty pattern separation processing in PTSD?**

Using generalization gradient techniques this process can be studied at the behavioral level (Honig and Urcuoli, 1981). Responses to stimuli parametrically varied in similarity to an aversively conditioned stimulus (CS+) are compared and typically a gradient is observed, i.e. less fear response with more dissimilar stimuli. This process of pattern separation correlates with activity in the human hippocampal dentate gyrus (DG) and cornu ammonis (CA3) region, as revealed by fMRI (Bakker et al., 2008; Lissek et al., 2014). Hippocampal DG is known for its characteristic encoding of experiences in memory engrams, i.e. configurations of cells within a microcircuit representing specific memories (Liu et al., 2012; Redondo et al., 2014). Together with the olfactory bulb, the hippocampus retains the remarkable capacity of generating new neurons and implementing them into existing neural circuitry. This phenomenon, called adult neurogenesis, results from the presence of a specific neurogenic zone, i.e. the sub-granular zone of the dentate gyrus (van Praag et al., 2002). Ablation of adult hippocampal neurogenesis leads to impaired pattern separation in rodents respectively (Tronel et al., 2010) while increasing neurogenesis results in improved discriminability between two highly similar contexts (Sahay et al., 2011). Analysis of immunostained hippocampal tissue for neural progenitor cells (NPC) from patients with major depressive disorder (MDD) either treated with antidepressants or left untreated clearly showed a marked increase in the amount of NPC in the former group (Boldrini et al., 2009). This thus demonstrates a potential involvement of the serotonergic neuromodulatory system in mediating neurogenesis and hence the capacity to separate patterns (stimuli) adequately.

### **The role of the serotonergic system further explored**

The serotonergic system originates from the dorsal raphe nucleus (DRN) and innervates a multitude of subcortical and cortical structures (Lesch and Waider, 2012) with prominent connectivity to the prefrontal cortex in the latter group (Raghanti et al., 2008). Selective activation of this serotonergic pathway in a transgene mouse (ePet1Cre) using optical stimulation of cells in the DRN genetically transfected with a light-sensitive cation channel ChannelRhodopsin2 (ChR2) dramatically improved sensory discrimination performance in an olfactory Go/No Go task (Liu et al., 2014). Besides projections from the DRN to prefrontal cortex, other prominent projections are from the DRN to the hippocampus (dentate gyrus - DG) and to primary auditory cortex (A1). Within the auditory system, associative fear memories can be supported by a merely neocortical microcircuit of disinhibition at the primary auditory cortex, A1 (Letzkus et al., 2011). Using light to activate specific cell types these researchers were able to completely abolish conditioned fear memory.

### **Research hypothesis**

The relationship between deficits in pattern separation as a behavioral and experimental operationalization to study PTSD and the serotonergic system has not been explored previously. We aim to study the function of serotonergic neurons projecting from the DRN to other brain regions, more specifically to the hippocampus (dentate gyrus), prefrontal cortex and primary auditory cortex whilst our experimental subjects, i.e. mice, are engaged in a behavioral task probing pattern separation processing as a model to study PTSD.

---

### **3.2 Purpose**

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

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

### **General goal**

We speculate that the release of serotonin by the DRN increases hippocampal neurogenesis, allowing for better pattern separation between the original stimulus eliciting the fear responses and neutral stimuli, similar but not identical to this original stimulus. This would result in less over-generalization and reduced PTSD symptomatology. Providing the transient character of memory storage from subcortical to cortical structures (Arruda-Carvalho et al., 2014; Vangeneugden et al., 2015), together with the evidence of cortical microcircuits in encoding fear memories (Letzkus et al., 2011), we will also investigate the involvement of auditory cortex over time to the process of pattern separation and potential modulation of this microcircuit by serotonin. Finally we will also scrutinize the function of known anatomical projections from the DRN to the prefrontal cortex.

Building forth on the idea that faulty pattern separation is at the root of PTSD our goal is to utilize a three-pronged approach in order to dissect the underlying neural circuitry and formulate clinically relevant intervention strategies. We are particularly interested in the role of serotonin and the DRN in mediating the functional properties of this network. Due to considerable flexibility in experimentation and previously acquired knowledge we will use the auditory system of transgene mice (ePet1Cre) as the sensory modality of choice.

### **Specific goals**

#### **(1) Goal #1: Validation of behavioral paradigm**

Develop and validate a new behavioral contextual fear conditioning task in mice allowing measurement of the level of generalization between similar but not identical auditory stimuli by measuring freezing response. This will be studied in 60 ePet1Cre mice, both males and females.

#### **(2) Goal #2: Determine structural connectivity**

Document the vast connectivity between the DRN and other brain regions, of subcortical and cortical origin, using tracer injections and post-hoc fluorescence histology. For this purpose we will re-use animals (N = 20; male and female) randomly selected from the behavioral experiment of goal #1.

#### **(3) Goal #3: Functional connectivity determined by optogenetic neuromodulation**

Investigating the behavioral relevance of the anatomical connections found under Goal #2 by manipulating the neural network in-vivo in awake and behaving mice engaged in the tasks validated under Goal #1, using gene targeting with artificial cation channels activated by light stimulation, i.e. optogenetic neuromodulation. We will further correlate observed behavioral changes in the fear conditioning tasks due to optogenetic neuromodulation with electrophysiological patterns, i.e. action potentials. Here we will also specifically examine the role of serotonin in fear conditioning during either the acquisition phase, the retrieval phase or both phases. A total of 220 ePet1Cre mice (male and female) will be engaged in these optogenetic experiments.

A table is presented here (Table 1) to clarify the goals of this project proposal more clearly. Components of the table will be explained here (in this general outline), but also more specifically in the adhering Appendices.

---

	Short description	Mice	Extra information
<b>Goal #1: Validation of behavioral paradigm</b>	Using auditory fear conditioning paradigm to obtain freezing tuning curves.	#60 males + females ePet1Cre line	
<b>Goal #2: Determine structural connectivity</b>	Using post-mortem fluorescence histology to determine most prominent target projection areas from dorsal raphe nucleus (DRN).	#20 males + females ePet1Cre line (re-used from Goal #1)	
<b>Goal #3: Functional connectivity determined by optogenetic neuromodulation</b>	Using optogenetic neuromodulation to selectively increase serotonin release, separately for the different target projection areas (dentate gyrus - DG, prefrontal cortex (PFC) and primary auditory cortex (A1)), and observe effect on freezing tuning curves.	#220 males + females ePet1Cre line	All experiments: Cre-dependent viral vector Chr2 + #10 sham-injections Cre-independent virus  <b>Subgoal #1:</b> General excitation of neural activity in DRN using pan-neural promoter (CaMKII) in #40 mice. [#30 actual experiment + #10 pilot] <b>Subgoal #2:</b> General excitation of serotonin neurons in DRN using Cre-dependent promoter (EF1.DIO) with light fiber stimulation over DRN in #70 mice, during acquisition phase, retrieval phase or both phases [#20 acquisition, #20 retrieval, #20 both, #10 control] <b>Subgoal #3:</b> Target specific excitation of serotonin neurons separately for DRN-DG, DRN-PFC and DRN-A1 projections, in #20 mice each. Similar as subgoal #2 but now placement of light fiber over different target areas. [#70 mice in total] <b>Subgoal #4:</b> Electrophysiological recording from target area with the most promising behavioral outcome, i.e. largest effect on freezing tuning curve. [#40 mice in total].

**Table 1** | Different goals of project proposal with a short description and mice engaged in the experiments. More information can be found in the separate Appendices.

### 3.3 Relevance

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

PTSD, the most prevalent anxiety disorder, was for long conceptualized merely in psychological terms, i.e. as a blend of intrusive memories of a traumatic event, avoidance of reminders of it, emotional numbing and hyper arousal (Pitman et al., 2012). Gradually more research and insight into the underlying neurobiological mechanisms in PTSD have emerged, however these studies mainly focused on prefrontal cortex, amygdala and dorsal anterior cingulate cortex. More recently, evidence for the involvement of the hippocampus with its remarkable capacity to generate new neurons, functionally relevant in separating between highly similar events has been postulated (Kheirbek et al., 2012).

Observational studies have demonstrated that the serotonergic system impinges on hippocampal neurogenesis (Dranovsky and Hen, 2006; Boldrini et al., 2009) however how this may relate to altered pattern separation is still a matter of debate. Moreover the exact location of stored fear memories, being the hippocampus, prefrontal cortex and/or auditory cortex, and the influence of the serotonergic system onto this memory representation, is largely unknown. In this project we wish to elucidate the role of the serotonergic system on hippocampal neurogenesis, pattern separation and the potential involvement of other brain structures influenced by serotonin release, such as the prefrontal and auditory cortices, in the development of PTSD.

These results could potentially yield improvement in the therapy of PTSD in human patients, by combining more cognitive psychotherapeutic interventions, inspired to increase pattern separation, with a pharmacological tailored level of serotonin, using SSRIs, medication mainly used to treat major depressive disorders.



### 3.4 Research strategy

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

In order to examine the role of serotonin in PTSD we will apply a number of state-of-the-art neuromodulatory interventions (Goal #3) at different nodes within the underlying neural circuitry (Goal #2) whilst meticulously observing behavioral changes using auditory fear conditioning protocols (Goal #1).

After validating our behavioral assay as good a proxy for studying PTSD in a mouse model, we will use genetic interventions to upregulate serotonin release within the circuitry. In order to know where to impinge in the circuitry we will also perform structural connectivity mapping. Once we have determined the key players within the circuit and have provided evidence for their behavioral involvement in PTSD symptomatology, we will use optogenetic interventions to intervene in a more acute manner in the serotonergic system. These behavioral observations will be supplemented with electrophysiological recordings of action potentials from different nodes in awake behaving mice.

For all our experiments we will use transgene ePet1Cre mice, expressing cre-recombinase in all serotonergic cells. Injecting these mice with a Cre-dependent virus will only express virus in serotonergic cells.

#### **Goal #1: Behavior**

The behavioral task will be based on an existing human protocol (Lissek et al., 2014), but adapted for the mouse. We will associate a tone of a particular frequency at either side of a range of frequencies (5 – 15 kHz) with a mild electric shock (1 sec, .6 mA; cf. previously published fear conditioning studies, e.g. Letzkus et al., 2011) (see Goal #1. *Validation of behavioral paradigm*). The other tones will not be associated with the shock. As an operant for fear/anxiety we will use freezing behavior, again cf. previous studies (Letzkus et al., 2011; Wolff et al., 2014). Prey animals (mice) that experience fear will resort to feigning being death as a final escape mechanism. The amount of freezing to other non-associated tones will provide a measurement for generalization/separation.

#### **Goal #2: Projections**

The exact projections from the DRN to other brain regions will be determined in a separate group of ePet1Cre mice injected with a Cre-dependent tracer virus in the DRN. Fluorescence imaging of the acquired post-mortem slices will specifically instruct us which projection areas to target (see Goal #2. *Determine structural connectivity*).

#### **Goal #3: Function**

Optogenetically, we will target the DRN and the projections of the DRN to other structures, such as dentate gyrus (DG), prefrontal (PFC) and primary auditory (A1) cortices, using ChannelRhodopsin2 (ChR2), an artificial light-gated cation channel ('genetics') that pumps sodium into the cell when illuminated by blue light ('optics'). This then causes depolarization of the cell's membrane and gives rise to action potentials.

We will monitor these neural manipulations on both behavior and electrophysiological signatures (see 3. *Functional connectivity determined by optogenetic neuromodulation*). As the DRN contains multiple cell types and consensus over the functional properties of these different cell populations and their microcircuitry has not yet been reached (Liu et al., 2014; McDevitt et al., 2014) we will first apply a general approach, targeting all DRN cells and all projections to the abovementioned brain areas (ChR2-CaMKII virus in transgene ePet1Cre mice).

In a second phase we will employ a Cre-dependent ChR2 virus in the transgene ePet1Cre mouse strain in

order to specifically target serotonergic cells only and their respective projections, again to these abovementioned brain areas. Within the field of systems neuroscience these kind of injections are now mainstay and considered safe to use for the experimenter and the animal. No apoptosis or cell damage has been reported even in prolonged experiments with more than needed viral dosages (for review see Yizhar et al., 2011).

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

### **Goal #1. Validation of behavioral paradigm (fear conditioning)**

The first objective will focus on the development and validation of a new behavioral contextual fear conditioning task allowing measurement of the level of generalization between similar but not identical stimuli. These experiments will be non-invasive and do not require any procedure other than handling and training. Mice will be exposed only once and very briefly to an electric shock during the learning phase.

In line with a recent protocol applied in human fMRI (Lissek et al., 2014) we will associate one tone (e.g. 15 kHz) with a foot shock (CS+) in the training phase, while presenting this tone and other tones on a parametrically varied axis (steps of 2.5 kHz to 5 kHz: 12.5, 10, 7.5 and 5, i.e. GSs or generalization stimuli) without an aversive event during this test phase. For more information on the behavioral paradigm, please see Appendix 1 with an instructional figure also depicted.

As it has been shown that mice can significantly discriminate between tones differing only 2% (de Hoz and Nelken, 2014) we should consider piloting and hence adjusting the frequency range. This will be done in the first 5 mice. After obtaining data from these mice we will determine the average freezing tuning curve and based on the steepness of this curve, i.e. not too steep -> too much separation, not too shallow -> too little separation, we will adjust the differences between auditory tones accordingly, i.e. decrease or increase frequency differences respectively.

The amount of freezing behavior is considered as an anxiety operant. We expect our behavioral data to fall along an ascending line going from little (furthest GS-CS+ distance) to maximal freezing (closest GS-CS+ distance). The steepness of this line will be indicative of the level of generalization versus separation: steep, shallow and flat lines will point toward high, low and no perceptual discriminability respectively.

### **2. Structural connectivity**

The DRN is one of many moderate-size clusters along the midline of the brainstem and harbors the somata of most serotonergic neurons in the brain (Jacobs and Azmitia, 1992). It receives input from a multitude of regions, notably the hypothalamus, cortex, basal ganglia and midbrain. Considerable hyper-direct inputs from prefrontal cortex and basal ganglia are present (Pollak Dorocic et al., 2014). To document the numerous projections arising from the DRN to other brain regions we will inject transgene ePet1Cre mice with a Cre-dependent tracer allowing expression of a fluorescent protein along the projecting axons followed by post-hoc histological analysis. Mice will be injected only once and will be sacrificed according to ethical guidelines after which transcardial perfusion will be performed to extract the brain. Slices will be made and examined using a fluorescence microscope. These 20 animals will be selected randomly from component #1 (Goal #1: Validation of behavioral paradigm), hereby reducing the total of mice needed in this project.

### **3. Optogenetic neuromodulation**

To investigate a more acute role of serotonin in the process of pattern separation in PTSD and to explore the direct functionality of the different nodes within this circuitry, we will employ an optogenetic stimulation strategy in our ePet1Cre transgene mice. In order to study the effect of general excitation of the DRN we will inject ChR2-CaMKII (Channelrhodopsin; Calmodulin-dependent protein Kinase type II) virus in DRN, which expresses in all excitatory cells. This will be achieved in #30 ePet1Cre mice and will give us a rough overall idea of the total involvement of the DRN in the behavior when using optogenetics. Next, Cre-dependent virus to stimulate serotonergic cells (upregulation) specifically within the DRN and differentially at the different target locations, e.g. DRN to dentate gyrus (DG), DRN to prefrontal cortex

(PFC) or DRN to primary auditory cortex (A1), will be achieved by injecting virus in DRN which travels along axons of projecting neurons to these other brain regions. Firstly we will apply light stimulation over DRN itself in #50 mice, in a later phase we will implant the light fibers over the different projection areas, i.d. #20 transgene mice for each condition. These injections will be done using AAV5.EF1a.DIO.hChr2(H134R)-eYFP.WPRE.hGH. In contrast to pharmacological interventions, optogenetics allows for millisecond temporal precision and thus does not evoke massive (short- or long-term) restructuring within the network (e.g. plasticity mechanisms). Furthermore this technique allows testing functional connectivity between different brain regions (Yizhar et al., 2011). The technique also allows to dissociate and test the effect of serotonin during the acquisition versus retrieval phase (or both phases) of fear conditioning.

Light fibers will be implanted bilateral in the DRN and at the different locations. Shining light over the target locations allows for modulating only the projections from the DRN to that target without interfering with the other nodes in the network. This entails the most accurate and pure examination of the circuitry. We will measure the effect of increasing serotonin at these different locations on the different behavioral tests. Control conditions consist of sham injections of saline in different ePet1Cre mice.

Based on the results from the behavioral observations with optogenetic stimulation, we will concentrate on the most interesting efferent projections from the DRN. Optrodes with multiple contact points for registering extracellular activity and an attached light fiber along the shank will be inserted into the target region. We will register single- and multi-unit together with local field potentials activity extracellularly. Recordings without light stimulation will yield information about the connectivity pattern (Liebe et al., 2012), while recordings with light stimulation will reveal the causative relationship between these two regions. These recordings will be made in awake mice engaged in our behavioral assay.

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

All experiments are aimed at unraveling the role of serotonin in PTSD and fit nicely together into a coherent project. Before advancing to the initial aim of this endeavor, i.e. the optogenetic neuromodulation, we first need to work on two fronts. A schematic representation of the go / no-go characteristics is given in Table 2.

Firstly, we need to validate our behavioral paradigm (see *Goal #1. Behavioral task*). This will be achieved in transgene ePet1Cre mice, considering that we also need to disentangle specifically the serotonergic projections from the DRN it would be opportunistic (cf. Reduction) to use these mice also for the behavioral validation protocol and structural connectivity mapping.

Secondly, we need more knowledge on the underlying structural network of serotonergic projections arising from the DRN (see *Goal #2. Structural connectivity*). This will be achieved by, simultaneously with the behavioral validation, injecting transgene ePet1Cre mice with Cre-dependent fluorophores. Post-mortem histology will inform us on the most prevalent efferent connections from the DRN.

The information obtained from these first two components will then be combined in our optogenetic neuromodulatory experiment. We will interfere with default neural functioning whilst engaging our mice in the behavioral task (see *Goal #3. Optogenetic neuromodulation*). This approach will provide evidence for a possibly acute involvement of serotonin in buffering or facilitating PTSD symptomatology. Importantly, all experiments are constructed in a phased design fashion. Depending on the behavioral experiments we will continue with the structural mapping and depending on these results we will proceed with the optogenetic neuromodulation. Criteria for continuation for the different components are:

- Goal #1: Validation of behavioral paradigm

Observing freezing tuning curves, i.e. maximal freezing to the conditioned tone with gradually less freezing to more distinct tones. Maximal freezing does not need to be 100%. Minimal freezing should be equivalent to the amount of baseline 'freezing' measured at the beginning of each experiment, before fear conditioning, for each mouse.

- Goal #2: Determine structural connectivity

Obtaining high quality images of fluorescence with solid clusters of projections to different areas, such as dentate gyrus, prefrontal cortex and/or auditory primary cortex. It is not excluded that other brain regions could be significant projection areas from the DRN and/or that one of the three brain regions suggested here do not show to receive significant projections. In that case we will still select the three best projection areas and continue Goal #3 investigating these three regions.

- Goal #3: Functional connectivity determined by optogenetic neuromodulation

Within Goal #3 we will work with a phased design concerning the #4 different subgoals. If we do not see any significant behavioral change during general excitation of neural activity in DRN (subgoal #1), we will not continue with the subsequent subgoals. If we do not observe significant behavioral changes under subgoal #2 we will not continue to subgoal #3 etc. concerning subgoal #4.

	Go	No-Go
<b>Goal #1: Validation of behavioral paradigm</b>	<p><b>Objective:</b> get freeze-tuning curves for each mouse</p> <p><b>How:</b> amending differences between stimuli</p> <p><b>Why:</b> to get steeper or less steep tuning curves</p> <p><b>Pilot:</b> stimulus difference will be determined in pilot expt in #10 mice</p>	If we do not get freeze tuning curves, i.e. constant freezing, no freezing or no declining freeze behaviour (approximate)
<b>Goal #2: Determine structural connectivity</b>	<p><b>Objective:</b> neural network of serotonergic projections from DRN</p> <p><b>How:</b> viral injection of tracer, only expressed in serotonergic neurons projecting from DRN to other brain regions</p>	If we do not obtain good expression patterns of our tracer emanating from DRN
<b>Goal #3: Functional connectivity determined by optogenetic neuromodulation</b>	<p><b>Objective:</b> functional characteristics of serotonergic projections from DRN to the most promising target brain regions</p> <p><b>How:</b> using optogenetic neuromodulatory techniques allowing serotonergic activation only of axons from DRN to other brain regions. Different subgoals exist to gradually home in on the function of these projections.</p> <p><b>Control:</b> in each subgoal a subset of #10 mice will be injected with a are-independent virus, acting as sham-control injected animals</p>	We have 4 different subgoals that are serially interdependent. If we do not observe any behavioural effect of stimulating serotonin under subgoal #1 we will not proceed to subgoal #2. Idem for the next subgoals.

**Table 2** | Schematic representation of go / no-go signals for each goal separately.

3.4.4 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	cfr. 1. Validation of behavioral paradigm
2	cfr. 2. Determine structural connectivity
3	cfr. 3. Optogenetic neuromodulation
4	
5	
6	
7	

8	
9	
10	<p><b>References</b></p> <p>Arruda-Carvalho M, Akers KG, Guskjolen A, Sakaguchi M, Josselyn SA, Frankland PW. Posttraining ablation of adult-generated olfactory granule cells degrades odor-reward memories. <i>J Neurosci</i>. 2014;34(47):15793-15803.</p> <p>Bakker A, Kirwan CB, Miller M, Stark CE. Pattern separation in the human hippocampal CA3 and dentate gyrus. <i>Science</i>. 2008;319(5870):1640-1642.</p> <p>Boldrini M, Underwood MD, Hen R, Rosoklija GB, Dwork AJ, John Mann J, Arango V. Antidepressants increase neural progenitor cells in the human hippocampus. <i>Neuropsychopharmacol</i>. 2009;34(11):2376-2389.</p> <p>Cardin, J.A., et al. Targeted optogenetic stimulation and recording of neurons in vivo using cell-type-specific expression of Channelrhodopsin-2. <i>Nat Protoc</i>, 2010. 5(2): p. 247-54.</p> <p>de Hoz L, Nelken I. Frequency tuning in the behaving mouse: different bandwidth for discrimination and generalization. <i>PLoS One</i>. 2014;9(3):e91676.</p> <p>Dranovsky A, Hen R. Hippocampal neurogenesis: regulation by stress and antidepressants. <i>Biol Psychiat</i>. 2006;59(12):1136-1143.</p> <p>Honig WK, Urcuioli PJ. The legacy of Guttman and Kalisch (1956): Twenty-five years of research on stimulus generalization. <i>J Exp Anal Behav</i>. 1981;36(3):405-445.</p> <p>Jacobs BL, Azmitia EC. Structure and function of the brain serotonin system. <i>Physiol Rev</i>. 1992;72(1):165-229.</p> <p>Kessler RC, Sonnega A, Bromet E, Hughes M, Nelson CB. Posttraumatic stress disorder in the National Comorbidity Survey. <i>Arch Gen Psychiat</i>. 1995;52(12):1048-1060.</p> <p>Kheirbek MA, Klemenhagen KC, Sahay A, Hen R. Neurogenesis and generalization: a new approach to stratify and treat anxiety disorders. <i>Nat Neurosci</i>. 2012;15(12):1613-1620.</p> <p>Lesch KP, Waider J. Serotonin in the modulation of neural plasticity and networks: implications for neurodevelopmental disorders. <i>Neuron</i>. 2012;76(1):175-191.</p> <p>Letzkus JJ, Wolff SB, Meyer EM, Tovote P, Courtin J, Herry C, Luthi A. A disinhibitory microcircuit for associative fear learning in the auditory cortex. <i>Nature</i>. 2011;480(7377): 331-335.</p> <p>Liebe S, Hoerzer GM, Logothetis NK, Rainer G. Theta coupling between V4 and prefrontal cortex predicts visual short-term memory performance. <i>Nat Neurosci</i>. 2012;15(3):456-462.</p> <p>Lissek S, Bradford DE, Alvarez RP, Burton P, Espensen-Sturges T, Reynolds RC, Grillon C. Neural substrates of classically conditioned fear-generalization in humans: a parametric fMRI study. <i>Soc Cogn Affect Neurosci</i>. 2014;9(8):1134-1142.</p> <p>Liu X, Ramirez S, Pang PT, Puryear CB, Govindarajan A, Deisseroth K, Tonegawa S. Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall. <i>Nature</i>. 2012;484(7394):381-385.</p> <p>Liu Z, Zhou J, Li Y, Hu F, Lu Y, Ma M, Feng Q, Zhang JE, Wang D, Zeng J, Bao J, Kim JY, Chen ZF, El Mestikawy S, Luo M. Dorsal raphe neurons signal reward through 5-HT and glutamate. <i>Neuron</i>. 2014;81(6): 1360-1374.</p> <p>McDevitt RA, Tiran-Cappello A, Shen H, Balderas I, Britt JP, Marino RA, Chung SL, Richie CT, Harvey BK, Bonci A. Serotonergic versus nonserotonergic dorsal raphe projection neurons: differential participation in reward circuitry. <i>Cell Rep</i>. 2014;8(6):1857-1869.</p> <p>Pitman RK, Rasmusson AM, Koenen KC, Shin LM, Orr SP, Gilbertson MW, Milad MR, Liberzon I. Biological studies of post-traumatic stress disorder. <i>Nat Rev Neurosci</i>. 2012;13(11):769-787.</p> <p>Pollak Dorocic I, Furth D, Xuan Y, Johansson Y, Pozzi L, Silberberg G, Carlen M, Meletis K. A whole-brain atlas of inputs to serotonergic neurons of the dorsal and median raphe nuclei.</p>

Neuron. 2014;83(3):663-678.

Priebe S, Bogic M, Ashcroft R, Franciskovic T, Galeazzi GM, Kucukalic A, Lecic-Tosevski D, Morina N, Popovski M, Roughon M, Schutzwahl M, Ajdukovic D. Soc Sci Med. 2010;71(12):2170-2177.

Raghanti MA, Stimpson CD, Marcinkiewicz JL, Erwin JM, Hof PR, Sherwood CC. Differences in cortical serotonergic innervation among humans, chimpanzees, and macaque monkeys: a comparative study. Cereb Cortex. 2008;18(3):584-597.

Redondo RL, Kim J, Arons AL, Ramirez S, Liu X, Tonegawa S. Bidirectional switch of the valence associated with a hippocampal contextual memory engram. Nature. 2014;513(7518):426-430.

Sahay A, Scobie KN, Hill AS, O'Carroll CM, Kheirbek MA, Burghardt NS, Fenton AA, Dranovsky A, Hen R. Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. Nature. 2011;472(7344):466-470.

Self M, Lorteije J, Vangeneugden J et al. (2014). Orientation-tuned surround suppression in mouse primary visual cortex. J Neurosci, 34:9290-9304.

Sherin JA, Nemeroff CB. Post-traumatic stress disorder: the neurobiological impact of psychological trauma. Dial Clin Neurosci. 2011;13(3):263-278.

Tronel S, Belnoue L, Grosjean N, Revest JM, Piazza PV, Koehl M, Abrous DN. Adult-born neurons are necessary for extended contextual discrimination. Hippocampus. 2012;22(2):292-298.

Vangeneugden J, Mazo C, Lepousez G. Fleeting memories: transient character of adult-generated olfactory granule cells committed to odour memories. Front Neurosci. 2015; doi:10.3389/fnins.2015.00110.

Vangeneugden J, Cohen MX, Lorteije J, van Beest E, Roelfsema P, Levelt C, Self M, Heimel A (2016). Surround suppression in mouse V1 depends on feedback from higher-visual areas. Nat Neurosci. Under review.

van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. Nature. 2002;415(6875):1030-1034.

Wolff SB, Grundermann J, Tovote P, Krabbe S, Jacobson GA, Moeller C, Herry C, Ehrlich I, Friedrich RW, Letzkus JJ, Luthi A. Amygdala interneuron subtypes control fear learning through disinhibition. Nature. 2014;509(7501):453-458.

Yizhar O, Fenno LE, Davidson TJ, Mogri M, Deisseroth K. Optogenetics in neural systems. Neuron. 2011;71(1):9-34.



## Appendix

### Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website ([www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

### 1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	35928	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Maastricht University, Faculty of Health, Medicine & Life Sciences, Department of Neuropsychology and Psychiatry	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number #1	Type of animal procedure Goal #1: Validation of behavioral paradigm

*Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

### 2 Description of animal procedures

#### A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

##### **Primary outcome parameter**

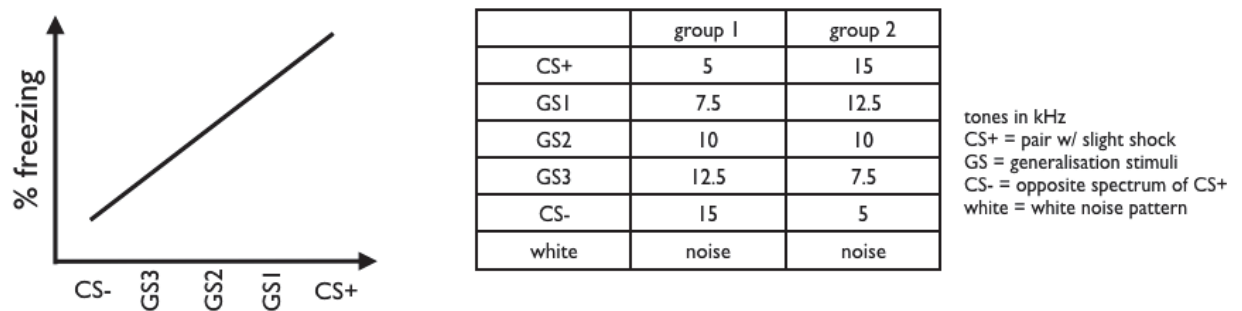
Develop and validate a new behavioral contextual fear conditioning task in mice allowing measurement of the level of generalization between similar but not identical auditory stimuli by measuring freezing response.

##### **General design**

The general goal of all experiments within this project proposal is to investigate the influence of serotonin in PTSD symptomatology. The underlying concept is that faulty pattern separation processes lay at the root of PTSD, due to an improper function of serotonin release. To test this theory we need a solid behavioral paradigm looking into pattern separation processes within the emotional domain. Surely this already exists within the cognitive domain with tasks such as the object recognition or object location tasks (van Hagen et al., 2014). Here, we will utilize auditory fear conditioning with freezing behavior as operant as a way to investigate pattern separation in the emotional domain. Freezing is a natural defense mechanism in prey animals, like mice, when threatened.

More concretely, we will associate tones of certain frequencies with one mild electric shock (duration: 1 sec, intensity: .6 mA), provided by an electric floor plate on which the mice are able to run freely. Based on previous studies (Letzkus et al., 2011; Wolff et al., 2014) one such pairing between tone and shock should suffice to produce significant freezing behavior. We are particularly interested in the amount of freezing to the other non-associated tones with different frequencies. This will allow us to make *freezing tuning curves*, i.e. measuring the amount of freezing to the other stimuli that differ objectively in varying

degrees from the original conditioned tone (see Figure 1). Optimal separation would predict that pure tones being highly similar (e.g. 12.5 kHz) to the shock-paired tone (e.g. 15 kHz) will not elicit freezing behavior. Depending on the initial results, the separation between tones can be adjusted, i.e. increments or decrements of 1, 2 or 3 kHz as being the most similar tones (e.g 15 kHz associated with a shock compared to 14 and 13 kHz or 13 and 11 kHz, etc.). The total dimension of the cage will be 20 x 20 cm, with a camera hanging over the cage to track locomotion. Existing soft- and hardware present in the institute will be utilized (Ethovision, Noldus Software).



**Figure 1** | Freezing tuning curve. Y-axis represents amount of freezing time in the retrieval phase to different auditory tones (X-axis). CS+ or conditioned stimulus is the tone associated with the electric shock. GS1-3 or generalization stimuli are tones similar to, but not identical with, the conditioned stimulus, but not associated with a shock. CS- or tone on the opposite spectrum is the tone most different in frequency from the paired tone. We will also present white noise to measure a general freezing state to sound per se, indifferent to the tones administered in our fear conditioning protocol.

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

This part of the project will consist of non-invasive behavioral monitoring of the locomotion of transgene ePet1Cre mice on a daily basis over a time course of maximally two weeks after auditory fear conditioning. We want to use a subgroup of these transgene mice (i.e. #20 mice) in order to also do structural connectivity mapping of serotonergic projections in the same mice, after finishing their behavioral training (Goal #2). The selection of these #20 mice will be done randomly.

Each animal will first be acquainted with being handled, i.e. taken out of the home cage and placed in the experimental set-up (20 x 20 cm box). Based on previous experiences with mouse behavioral tasks, performed at different national and international institutes, 1 week of daily handling will suffice for the mice to feel comfortable with being handled, i.e. taken out of the cage and put in the experimental set-up. We will use a small tube as a sort of 'elevator' to take the animals out of the cage in the most gently way. The handling phase is followed by placing the mice in the set-up for 30 minutes while tracking locomotion, again for one week. This will serve as a baseline measurement to benchmark further observations. Following these two weeks, the actual fear conditioning experiment will start.

Based on previous publications (Letzkus et al., 2011; Wolff et al., 2014), only one tone-shock association should be sufficient to elicit freezing behavior the next few days up to one week, even lasting up to a maximum of two weeks. Then extinction takes over and de-pairing/de-coupling will take place, gradually reducing the amount of freezing behavior. We are particularly interested in the generalization of freezing to other tones. After the initial fear conditioning session we will look at the extinction of these responses by monitoring the mice subsequently for two weeks, without administering electric shocks.

Mice that are not selected for the viral injection surgery (goal #2: Determine structural connectivity) will be euthanized according to ethical guidelines within our institution.



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

The total amount of 60 mice proposed here is based on previous fear conditioning studies (Letzkus et al., 2011), however no study up to now exists that utilizes exactly the same task. Our estimate is thus partly grounded by previous observations and partly speculative. We are thus unable to apply a specific statistic on the amount of mice necessary. Letzkus and colleagues (2011) needed a smaller amount of mice in their behavioral task because they were merely interested in the difference in amount of freezing behavior between two stimuli. They used auditory sweeps, a tone varying from low to high frequency versus another tone varying from high to low frequency. We are interested in documenting generalization in freezing to parametrically varying tones with less differences in-between than the sweeps used by Letzkus and colleagues (2011). Therefore we expect to use more mice, factor 3 compared to their study.

However, from previous auditory behavioral studies in mice we know that they have quite sensitive auditory thresholds (de Hoz & Nelken, 2014), thus being well suited for discriminating single tones. Furthermore, we will have full control over the parameters of the auditory stimulus, thus allowing us to increase the difference between tones, i.e. larger difference in frequency, should we notice based on the behavior from the first couple of mice that they show freezing behavior to 4 or more tones, i.e. pan-generalization. Pan-generalization would be suboptimal for us as it does not permit examining pattern separation processing per definition. Twenty randomly selected mice from these experiments will also be involved to examine our second research goal (*goal #2: Determine structural connectivity*).

## **B. The animals**

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

We will employ transgene ePet1Cre mice (n = 60, males or females, aged 3-4 months), which are readily available at the institute. The cre-background in this mouse line has no effect on the phenotype and is considered safe to use, as has been done extensively by other researchers in this past, see e.g. Liu et al. (2014) and McDevitt et al. (2014). This amount of 60 mice is based on previous work by the group of a colleague in Switzerland (Letzkus et al., 2011). We will select young adults of a few months old (3-4 months) that will be housed in pairs for the whole duration of the experiment. Breeder mice will be acquired from a licensed breeder, while the breeding takes place in the transgene unit of our institution. This transgene mouse line will further provide mice for the next phases of the project too. Mice will be engaged only for 3-4 weeks once we start with the tone-shock pairing.

Total number of mice: #60

Strain: ePet1Cre, male + female

Age: 3-4 months

Specifics: Only behavioral assay, #20 mice will be re-used in Appendix #2

## **C. Re-use**

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Twenty mice will be selected for the structural connectivity analyses. This is justified as no further procedure is needed for these mice. After behavioral training, as proposed here in this Appendix 1, we will transcardially perfuse 20 mice and do post-mortem analysis on their brain slices.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

## **D. Replacement, reduction, refinement**

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

**Replacement:**

It's however not possible to perform these experiments in *lower class* animals. Mice have adequate hearing, also in this ePet1Cre mouse line (see eg. de Hoz & Nelken, 2014; Liu et al., 2014), to perform auditory experiments. Previous fear conditioning studies in the auditory domain have proven to be very successful in mice. It's also argued that results obtained in mice using fear conditioning protocols do extrapolate to humans. Furthermore our aim cannot be achieved by use of in vitro experiments or computer modelling, because these models do not allow for analysis of behavior and do not represent the organization of a complex neuronal network in a complex biological system such as the brain.

**Reduction:**

Based on previous published work (Letzkus et al., 2011) and personal communication with researchers from that laboratory we estimate to suffice with 60 mice for this task. In the study by Letzkus and colleagues they observed a 40% difference in 17 mice when looking at freezing behavior between an upward and downward auditory sweep (an in/de-creasing tone lasting 2 sec). The differences between our auditory stimuli are less salient hence more mice are needed. We will perform statistical analysis from the start of our observations. If we notice large differences between similar stimuli and hence high pattern separation, we will need fewer mice to achieve statistical significance, calculated using *Analysis of Variance* statistics. If we notice in the first five mice that differences between auditory stimuli are too small to be 'separated', i.e. mice show as much freezing to CS- and CS+, we will artificially increase stimulus difference, e.g. by selecting not 14 Hz but 12 Hz as CS- (with 15 Hz as CS+). Furthermore, 20 mice from the experiments in Appendix 1 will be re-used in the experiment in Appendix 2.

**Refinement:**

The level of the electric foot shock is inspired by previous published work in the field, but could be adapted (lowered) when excessive freezing is observed (e.g. 100% during the first 5 minutes of fear retrieval). Based on our contact with other institutes have experience with similar protocols this situation will be highly unlikely. All animals will be housed in pairs with same gender littermates, in order to minimize fighting and prevent unintentional breeding. Before starting our behavioral experiments we will first perform gentle handling on them to get them acquainted with the experimenters and the set-up.

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

The exposure to the mild electric shock will be limited to only one second for one day, without further repetitions. We do not expect the need to prolong this adverse effect. Furthermore social housing during the entire duration of the experiment reduces the stress of isolation. When mice, engaged in the experimental protocol and placed back in their home cage, show signs of pain, distress, infection or inflammation, they will be treated with analgesics, antibiotics and/or anti-inflammatory medications. We will prevent pain and discomfort by monitoring the animals during behavioral experiments. Behavioral testing will be conducted according to standard guidelines. Similarly, if animals show pain during any of the experimental procedures described, they will receive analgesics. The persons involved in this experiment possess a strong background of laboratory animal welfare experiences to minimize animal suffering, pain or fear.

## Repetition and duplication

**E. Repetition**

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

Not applicable.

## Accommodation and care

**F. Accommodation and care**

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

x No

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

### **G. Location where the animals procedures are performed**

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

x No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## **Classification of discomfort/humane endpoints**

### **H. Pain and pain relief**

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

When mice, engaged in the experimental protocol and placed back in their home cage, show signs of pain, distress, infection or inflammation, they will be treated with analgesics, antibiotics or anti-inflammatory medications.

### **I. Other aspects compromising the welfare of the animals**

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

Mice will be handled, i.e. acquainted to the experimental set-up, and will experience one session whereby one tone will be associated with a mild electric foot shock. This could all cause stress to the animal: being handled, taken out of its home cage, the electric shock and the post-shock testing following the pairing whereby psychological stress could play a part.

Explain why these effects may emerge.

Mice will probably also associate the context partly as a omen to the shock, although more tones without a shock association are present, in fact only .1% of tones presented will be associated with the mild electrical shock.

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

We only pair one tone for one second in one session with a mild electric shock. We will house them together and behavioral testing after the tone-shock association will only comprise a maximum of 30-60 minutes a day. Furthermore, handling of mice before the start of the behavioral experiments, to get them acquainted with the experimenter and the set-up, will further minimize severity.

### **J. Humane endpoints**

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

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

If mice present with freezing behavior > 30 min after the initial tone-shock association in their home

cage (only the presentation of one tone will be associated with a mild electric foot shock) they will be taken out of the experiment

Indicate the likely incidence.

< 1% with regard to the behavioral protocol, see Letzkus et al. (2011), a publication that resembles our work the most, indicates a same percentage of drop-out during fear conditioning.

#### **K. Classification of severity of procedures**

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

Behavioral protocol: mild -> low intensity electric shock (.6 mA) for just one second and only one day.

### **End of experiment**

#### **L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Not all mice will be sacrificed: 20 mice will proceed to study goal #2 of the project (see *Determine structural connectivity*). For these mice we will need to do post-mortem histology and thus acquire the brains following euthanasia by an overdose of barbiturates and transcardial perfusion.

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

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

Yes



## Appendix

### Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website ([www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

#### 1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	35928	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Maastricht University, Faculty of Health, Medicine & Life Sciences, Department of Neuropsychology and Psychiatry	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number #2	Type of animal procedure Goal #2: Determine structural connectivity

*Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

#### 2 Description of animal procedures

##### A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

To get an idea on the specific anatomical serotonergic projections arising from the dorsal raphe nucleus (DRN) to other brain structures in the trained mice we will inject (see Goal #1) a fluorescent marker (AAV5.EF1a.DIO.hChr2(H134R)-eYFP.WPRE.hGH) that will penetrate the somata in the DRN and travel along the axons projecting from this region. When injecting a Cre-dependent virus, such as this one, in the brain of a transgene mouse having Cre-recombinase expressed only in cells using serotonin as neurotransmitter, the fluorophore will only penetrate serotonergic somata and will only travel along these axons. Here we are interested in the anatomical spread of the fluorophore, to get the different projections from the DRN to other structures charted well.

Currently a substantial online database on structural connectivity exists (*The Mouse Allen Brain Atlas*, see <http://mouse.brain-map.org/>), but different proponents in the field advice on double-checking these published connectivity maps with own experiments. Moreover, the Atlas is not updated for the serotonergic system.

After allowing 2-3 weeks of viral expression we will perform transcatheter perfusion and obduct the brain. Based on own experiences and that of numerous colleagues in the field applying viral injections, no side effects are expected. Fluorescence imaging of cut slices will instruct us on the anatomical connectivity between the DRN and other nodes of the serotonergic network. We will then match our slices with coronal sections of anatomical atlases. This will be done to determine, i.e. to name, the different brain regions that the DRN projects to. More specifically, we are interested in the regions of the brain that the dorsal raphe nucleus (DRN) projects to. This will be important information for us given that we want to

investigate the serotonergic network, which originates from the DRN.

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

A small selection of mice (n=20) will be randomly selected from the behavioral protocol (see Goal #1) and will be injected with a Cre-dependent fluorescent marker stereotactically in the DRN. The virus will be the same as under Appendix #3, with the difference here that no light stimulation is presented in-vivo.

Intracranial injections of the optogenetic opsin will be performed under general anesthesia and adequate post-surgery analgesia. After surgery, animals will receive two weeks of fully recovery in which they will obtain ad libitum water in the cage. After these two weeks, mice will be sacrificed, followed by transcardial perfusion. Post-mortem epi-fluorescence and confocal microscopy on the brain slices will reveal the most dominant projection areas of the serotonergic network.

All mice will be housed socially with same gender littermates for the whole duration of the experiment. They will be isolated for a few hours post-surgery to allow good recovery of the stitches used to close the scalp following viral injection, after which they will be re-paired.

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

By combining the first two goals of this project, we are able to reduce the amount of mice necessary, i.e. 60 mice in total for goals #1 (n = 60) and #2 (n = 20 of these 60 mice of Appendix 1) of the project.

### **B. The animals**

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

We will only select transgene ePet1Cre mice, which are already available at our institute. The 20 selected mice (sex: males or females; age: 3-4 months) will first be subjected to the behavioral validation (Goal #1, see Appendix #1). Breeder mice are acquired commercially while the breeding takes place in the transgene unit of our institute. This transgene mouse line will further provide mice for the next goal (Goal #3) of the project too.

Total number of mice: #20

Strain: ePet1Cre, male + female

Age: 3-4 months

Specifics: re-use of mice from Appendix #1

Only targeted injections of ChR2 coupled to a fluorescent protein (eYFP = enhanced yellow fluorescent protein)

### **C. Re-use**

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

### **D. Replacement, reduction, refinement**

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

**Replacement:**

It's however not possible to perform these experiments in 'lower' class animals. As described in Appendix #1 mice have adequate hearing and the underlying neural network for hearing and fear conditioning is considered constructive when extrapolating results from mice to men (Yizhar et al., 2011). These aims cannot be achieved by use of in-vitro experiments or computer modelling, because these models do not allow for analysis of connectivity patterns and do not represent the organization of a complex neuronal network in a complex biological system such as the brain.

**Reduction:**

By combining two goals in the project we are able to reduce the amount of mice by 25%. After each mouse we will assess the quality of the histology and concatenate the results with the pooled results of the other mice. We will digitalize the data in order to easily create pooled connectivity maps. If we notice clear patterns arising when pooling the results from only a few mice, we will not continue with injecting more mice. Thus needing only a subset of the proposed 20 mice. Mice that will not be used for the structural mapping will be euthanized according to the protocol described under Goal #1.

The main applicant of this proposal has ample experience in histology and anatomy in mice, resulting from experience acquired at other institutes (Self et al., 2014; Vangeneugden et al., under review). By digitizing the data we will be able to construct a solid serotonergic database of connections arising from the DRN which we will disseminate in a separate methods paper to the neuroscience community. In this way other groups could take profit from our efforts and less mice are needed to be sacrificed for this purpose.

**Refinement:**

All animals will be housed socially with same gender littermates. Surgery performed on 20 mice will be according to good surgical practice with gas anesthesia during the procedure and analgesia up to two days after the surgery. The main applicant of this proposal has already ample experience in running structural connectivity studies and has recently published in high impact factor journals using this technique (Self et al., 2014; Vangeneugden et al., under review). Currently all the technological equipment is available at the institute to run these experiments. According to good practice we will also keep track of the behavior of the mice post-operatively, noting nutrition, fluids consumed, body weight and fur status.

---

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

---

These mice will not be subjected to the electric shocks anymore. They will only undergo a viral injection surgery with adequate peri-operative anesthesia and post-operative analgesia. After a few hours of isolation after surgery and 2-3 weeks of social housing we will sacrifice these mice and we will recuperate their brains for post-mortem histology. In addition, pre-operative, local anesthetic will be applied at the site of incision. If a mouse shows signs of pain, distress, infection or inflammation which cannot be treated using antibiotics or analgesics, the mouse will be eliminated from the experiment by means of euthanasia.

---

## **Repetition and duplication**

**E. Repetition**

---

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

---

Not applicable.

---

## **Accommodation and care**

**F. Accommodation and care**

---

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

---

No

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

### **G. Location where the animals procedures are performed**

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## **Classification of discomfort/humane endpoints**

### **H. Pain and pain relief**

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

General anesthesia will be used for all surgical procedures. Animals will be monitored daily during the experimental procedures stated in section 2A and will be checked for signs of pain or discomfort. Standard analgesics will be applied to relief suffering during the post-surgical recovery period. We don't expect to apply any analgesics pre-operatively. During surgery, standard anesthesia protocols will be applied, which also relieve pain.

### **I. Other aspects compromising the welfare of the animals**

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

We do not expect any signs of distress other than surgery and potential post-operative pain. Post-surgical infection will be treated with adequate medication.

Explain why these effects may emerge.

The viral injection involves opening the scalp and skull which might cause an infection of the skin, meninges or brain tissue. We will closely monitor signs of distress and handle accordingly and adequately with antibiotics or with sacrificing the animal if treatment is not adequate.

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

Animals will be visually inspected daily during experiments. During the recovery period after surgery, mice will be inspected every day and body weight will be measured twice a week. Recovery boost gel will be administered if animals are not gaining weight. Prophylactic antibiotic will be administered. In case of adverse effects, the experiment will be halted and the animals will be treated accordingly.

### **J. Humane endpoints**

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

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



If post-surgery recovery develops slowly, i.e. mice still presenting with signs of distress (poor groomed skin, elephant arched back and minimal movement) a few days after surgery, euthanasia will be performed. We do not expect any effect on the serotonergic system given the fact that we only add a tracer to this neurotransmitter system and do not interfere with its normal functioning. We also do not expect brain infections to occur given surgery is performed under aseptic conditions and according to general guidelines from our institution.

Indicate the likely incidence.

< 1%, based on 4 years of experience by the principal researcher, performing similar procedures at other national and international institutes, with regard to the surgeries.

#### **K. Classification of severity of procedures**

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

Viral injection surgery is considered as moderate level of discomfort. Therefore adequate anesthesia and extensive analgesia will be used during and after surgery.

### **End of experiment**

#### **L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

For 20 mice we need to do post-mortem histology and thus acquire the brains following euthanasia by an overdose of barbiturates and transcardial perfusion.

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

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

Yes



## Appendix

### Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website ([www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

### 1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	35928	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Maastricht University, Faculty of Health, Medicine & Life Sciences, Department of Neuropsychology and Psychiatry	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.  <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number #3	Type of animal procedure Goal #3: Functional connectivity determined by optogenetic neuromodulation

### 2 Description of animal procedures

#### A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

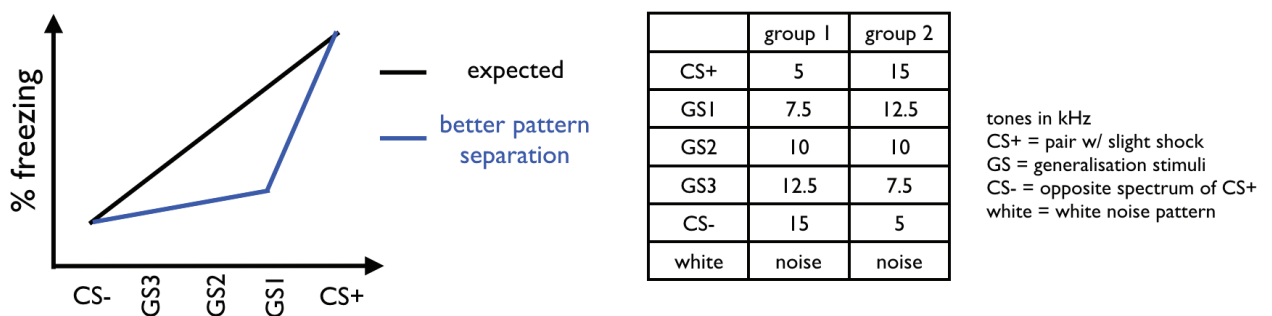
Having validated our behavioural assay under Goal #1 (see Appendix #1: 'Validation of behavioral paradigm') and having established the structural connectivity under Goal #2 (Appendix #2: 'Determine structural connectivity') we will now inject light-sensitive opsins into the dorsal raphe nucleus (DRN) of the transgene ePet1Cre mouse line. This technique, known as optogenetics, will allow us to examine the behavioural effects and relevance on behaviour of activating the serotonergic system in the mouse model of PTSD.

More concretely this is achieved by injecting a Cre-dependent viral construct. Within such a system the virus will only be expressed in cells carrying Cre-recombinase. Using Cre-dependent channelrhodopsin (ChR2), a light-gated opsin, activation by blue light (473 nm), allows for influx of Na<sup>+</sup> ions into the cells causing depolarization thus excitation of these cells. The following viral construct will be used for excitation: AAV5.EF1a.DIO.hChR2(H134R)-eYFP.WPRE.hGH, a Cre-dependent construct and AAV5.CaMKIIa.hChR2(H134R)-eYFP.WPRE.hGH, a Cre-independent construct. The major advantage of optogenetics is the ability to target not only certain cell types, but to also have millisecond control over the activity of the transfected cells in a transistor on/off type fashion using photons. Once the virus is replicating on the cell membrane at the soma, it will also start to replicate along the whole axonal projections from these specific cells to other regions. By implanting a tiny light fiber (200 um) above the DRN proper and above the projection areas, we will be able to activate the full serotonergic system (DRN proper stimulation at the somata), or only specific end terminals of the serotonergic network, e.g. the

DRN-to-DG (dentate gyrus) projection pathway.

We are primarily interested in observing changes in behavioural outcome with respect to amount of freezing when subjecting the mice to the paradigm of Appendix #1. We hypothesise to observe freezing to fewer auditory tones resembling the aversively conditioned tone when increasing serotonin release. This is in line with the faulty pattern separation process, restored partially by artificially increasing serotonin. As such mice will become better at discriminating two tones of different frequency.

An example is used to clarify this point, see also Figure 1. If a mouse shows 80% freezing to a tone of 15 kHz (CS+ or the conditioned stimulus, i.e. paired once with a mild electric foot shock) it will also show freezing, of lesser extent, to the neighbouring tone of 12.5 kHz (GS1 or generalization stimulus), e.g. 50%, and even less freezing to 10 kHz (GS2), e.g. 20% and no more freezing to e.g. 7.5 kHz (CS- or the stimulus on opposite pattern) (see black line in graph of Fig. 1). This over-generalization of freezing can be explained in terms of faulty pattern separation processes. By increasing serotonin release during retrieval (see blue line in graph of Fig. 1) we expect to find less over-generalization, i.e. still considerable freezing to the conditioned stimulus, e.g. 70-80% to 15 kHz, but less freezing to similar stimuli, e.g. 20% to 12.5 kHz and no freezing to the 10 kHz tone.



**Figure 1.** Potential behavioural outcome from the optogenetic experiment. Left panel shows the amount of freezing behaviour to different stimuli. The CS+ is the conditioned tone paired with the slight electric shock. GS1-3 are termed generalization stimuli and are tones of a different frequency not paired with the shock. CS- is the tone totally opposite of the spectrum, i.e. the most different tone. Black curve depicts the expected behavioural outcome without optogenetic stimulation of the serotonergic system. Blue curve depicts the expected outcome after increasing serotonin release. Right panel: table depicting different groups created by counterbalancing conditioning of stimuli. In group 1 the tone paired once with the shock will be the 5 kHz tone. We are interested in the generalization of freezing to the other tone. Group 2 will have the 15 kHz tone associated with the electric foot shock.

We will also perform electrophysiological recordings using optrodes (recording probe + light fiber) during the behavioural paradigms to get an idea on the amount of manipulation and the neural signature underlying the abovementioned potential behavioural change.

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

Following an acclimatization period where ePet1Cre mice are being handled and placed in the experimental set-up, we will proceed with targeted viral injections of the opsins in the DRN (see also Appendix #2). Handling and acclimatization will proceed according to the protocol described in Appendix 1. Also surgery, post-surgery pain relief and general health monitoring will follow exactly the same guidelines as described in Appendix 2, with the exception that now, micro light fibers will be implanted intracranially and fixed on top of the cranium using dental cement. It is important that we implant these fibers bilaterally as our goal is to either completely upregulate serotonin release, in a first approach only over DRN, while in a later approach also over the specific projection areas. We do not expect to observe any pre-operative signs of pain or distress. During surgery we will utilize adequate anesthetics.

All micro-fiber implantations will be bilateral and all virus injections will be with commercially available vectors in transgene ePet1Cre mice. After each surgery, the mice are isolated a few hours to maximally 12 hours, followed by 2 weeks of full recovery and viral expression. For the whole duration of the project mice are socially housed with same gender littermates.

Table 1 gives the reader a quick overview on the experiments proposed within this Appendix 3.

	Short description	Mice	Extra information
<p><b>Goal #3: Functional connectivity determined by optogenetic neuromodulation</b></p>	<p>Using optogenetic neuromodulation to selectively increase serotonin release, separately for the different target projection areas (dentate gyrus - DG, prefrontal cortex (PFC) and primary auditory cortex (A1)), and observe effect on freezing tuning curves.</p>	<p># 220 males + females ePet1Cre line</p>	<p>All experiments: Cre-dependent viral vector Chr2 + #10 sham-injections Cre-independent virus</p> <p><b>Subgoal #1:</b> General excitation of neural activity in DRN using pan-neural promotor (CaMKII) in #40 mice. [#30 actual experiment + #10 pilot]</p> <p><b>Subgoal #2:</b> General excitation of serotonin neurons in DRN using Cre-dependent promotor (EF1.DIO) with light fiber stimulation over DRN in #70 mice, during acquisition phase, retrieval phase or both phases [#20 acquisition, #20 retrieval, #20 both, #10 control]</p> <p><b>Subgoal #3:</b> Target specific excitation of serotonin neurons separately for DRN-DG, DRN-PFC and DRN-A1 projections, in #20 mice each. Similar as subgoal #2 but now placement of light fiber over different target areas. [#70 mice in total]</p> <p><b>Subgoal #4:</b> Electrophysiological recording from target area with the most promising behavioral outcome, i.e. largest effect on freezing tuning curve. [#40 mice in total].</p>

**Table 1** | Overview of the different subgoals and mice needed for each experiment within this Appendix 3.

**(1) Subgoals #1-#2-#3: Optogenetic neuromodulation: behavior**

For the optogenetic experiments we will first focus on investigating the effect of general excitation of the DRN by injecting Chr2-CaMKII virus, which expresses in all excitatory cells. This will be achieved in #40 ePet1Cre mice and will give us a rough overall idea of the total involvement of the DRN in the behavior when using optogenetics. The number of mice needed for this first subgoal is inspired by a similar study by another group (see Letzkus et al., 2011), where #20 mice were utilized in their behavioral protocols. We do add a surplus of #10 mice given that these experiments will be the first optogenetic experiments carried out at our institute and another #10 mice with sham-injections of a cre-independent virus that will function as a control condition.

Next we will focus on the upregulation of serotonin by injecting cre-dependent Chr2 in the DRN of #60 ePet1Cre mice, together with another #10 sham-injected mice (see above). We will first implant optical micro-fibers over the DRN in these mice and run them through the behavioral assay (see Appendix #1). All mice will receive serotonin upregulation during the retrieval phase only. We speculate based on previous research (Kheirbek et al., 2012; Liu et al., 2012) that manipulating the serotonergic system within the retrieval phase could yield differences in the behavioral outcome as explained above. We request #60 mice given that here we would like to test the difference between activating/upregulating serotonin release during the acquisition phase, i.e. when the electric shock is first paired with the auditory tone, versus the retrieval phase, i.e. when the paired tone – but this time without an electric shock – is presented again. As such, #20 mice will be tested whilst manipulating serotonin during acquisition, #20 mice whilst retrieval and another #20 mice will be tested during acquisition and retrieval.

To disentangle the functional involvement of the different projections from the DRN to different target regions, we will again virally inject the DRN, but this time we will not only implant fibers over the DRN, but also over the dentate gyrus (DG), prefrontal cortex (PFC) and primary auditory cortex (A1), each time in #20 mice, amounting to a total of #60 mice under this procedure, combined with another #10 sham-injected control mice (see above). In these mice, only one viral injection is necessitated, only in DRN. Due to viral spread via axons, Chr2 will also reach all the projection areas. To stimulate serotonin release specifically in these projection areas, we will need to get the light stimulation on those spots. This can only be achieved by implanting light fibers specifically over those projection areas. Depending on the results of subgoal #2 we will stimulate the different projections of DRN during the acquisition phase, retrieval phase or both phases.

In summary, for all behavioral subgoals we will be needing #20 mice per condition. Each mouse will be compared as a within factor, i.e. comparing stimulation on vs off.

#### **(2) Subgoal #4: Optogenetic neuromodulation: electrophysiology**

Electrophysiological recordings will be made while mice are engaging in the task and will serve as (a) a validation method to show the effectiveness of the viral manipulation and (b) an indication of the response characteristics of the serotonergic cells. We will insert optrodes (multi-contact arrays with an optic fiber attached, commercial system available from e.g. Neuronexus Inc.) over the DRN and the most promising projection area, based on the analyses of the behavioral tests. We will do this for 30 mice and another #10 sham-injected control animals (see above). It is not possible to 'recuperate' these mice from the behavioral optogenetic interventions because the dental cement on top of the skull is not easily removable. We will implant optrodes in one surgery together with the viral injection, adhering to the abovementioned anesthesia-analgesia protocol. The optrodes can be left within the cortex using a connector piece outside the skull allowing multiple recordings over multiple days. Once the optrodes are implanted the cranium will be closed again completely, i.e. no craniotomies have to be made for our recordings over multiple days. We will record for 3 consecutive days after fear conditioning.

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

By approaching these optogenetic neuromodulation experiments step by step whilst determining the most optimal conditions, we minimize the number of mice needed. The different steps suggest go/no-go decisions, i.e. if subgoal #1 comes out negative we do not proceed to the following subgoal and so forth. We will first try-out a general aim by general excitation of the DRN, independent of its projections. Then we gradually home in on more specific subpopulations: serotonergic cells within the DRN and their projections to the different relevant brain regions based on extensive literature survey beforehand, to finally arrive at the most promising DRN-target brain region where we will record the neural signature of the accompanying behavioural modification. Our goal of a minimum of 20 mice per condition with each sub-experiment is inspired by an influential study published by a collaborative group (Letzkus et al., 2011).

#### **B. The animals**

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

We will only use ePet1Cre mice, #180 mice for the behavioural testing of the optogenetic modulation (#40 mice in subgoal #1, #70 mice in subgoal #2, #70 mice in subgoal #3) and #40 mice will be used for the simultaneous electrophysiological recordings combined with optogenetic modulation during the behavioural assay.

All mice will be around 2-3 months old when we will start handling them. They will be around 12 weeks old at the moment of surgery and 14 weeks old at the moment of the behavioural testing and optogenetic manipulation. We will make no difference between males or females. All mice will be socially housed together with same gender littermates.

Total number of mice: #220

Strain: ePet1Cre

Age: 2-4 months

Behavioural assay + optogenetic stimulation

1. #30 mice – general neural promotor CaMKII & #10 sham-injected mice
2. #60 mice – Chr2 in DRN + light fiber over DRN & #10 sham-injected mice
3. #60 mice – Chr2 in DRN + light fiber over DG, PFC or A1 & #10 sham-injected mice

Behavioural assay + optogenetic stimulation + electrophysiological recording

4. #30 mice – Chr2 in DRN + light fiber over area with best behavioural effect (DG, PFC or A1) & #10 sham-injected mice

---

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

---

### D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

#### **Replacement:**

It's however not possible to perform these experiments in 'lower' class animals. Mice have adequate hearing to perform auditory experiments and previous fear conditioning studies have proven to be very successful in mice (see eg. de Hoz & Nelken, 2014; Liu et al., 2014). It's also argued that results obtained in mice using fear conditioning protocols do extrapolate to humans. Furthermore the cell-type specific manipulations proposed here using optogenetics are only applicable in transgene mouse lines. Furthermore these aims cannot be achieved by use of in-vitro experiments or computer modelling, because these models do not allow for analysis of behavior and do not represent the organization of a complex neuronal network in a complex biological system such as the brain.

#### **Reduction:**

The experience gained by the primary applicant at different national and international institutes as a post-doctoral researcher applying similar protocols and paradigms, albeit in a different sensory system (visual system), will ensure minimal drop-out of mice during both the surgeries and experiments. We will limit the number of animals in this study to a minimum by using power analyses. The power analyses are based on our primary outcome measure: behavioral improvement due to optogenetic neuromodulation. We will make use of the knowledge in similar behavioral protocols using optogenetic neuromodulation from other high-end laboratories, by means of close collaboration with these groups.

#### **Refinement:**

The level of the electric foot shock is inspired by previous published work in the field, but could be adapted (lowered) when excessive freezing is observed (e.g. 100% during the first 5 minutes of fear retrieval). All animals will be housed socially with same gender littermates and the surgery performed will be according to good surgical practice with gas anesthesia during the procedure and analgesia up to two days after the surgery. By choosing the mouse as our preferred animal model, exhibiting similar PTSD-like behavior as in humans, with behavioral tests alike the one presented here already validated, will result in data that can be extrapolated to human patients. Additionally, we have put extra efforts to design the experiment as such that it causes minimal distress to the animals. In particular, the best and most up to date surgical procedures, light fiber construct, drug administration methods and behavioral test are planned. Moreover, we know from our own previous unpublished study which readout measures are more representative and useful. For instance, following observation of certain behavioral phenotype

(freezing), what sort of analysis should be conducted. Having this experience will most likely shorten the duration of the experiments.

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

The exposure to a mild electric shock will be limited to only one second for one day. Furthermore social housing during the entire duration of the experiment reduces the stress of isolation. Social housing is also maintained for the mice that will be operated upon.

## **Repetition and duplication**

### **E. Repetition**

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

Not applicable.

## **Accommodation and care**

### **F. Accommodation and care**

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

No

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

### **G. Location where the animals procedures are performed**

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## **Classification of discomfort/humane endpoints**

### **H. Pain and pain relief**

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

General anesthesia will be used for surgical procedures. Animals will be monitored daily during the experimental procedures stated in section 2A and will be checked for signs of pain or discomfort. Standard analgesics will be applied to relieve suffering during the post-surgical recovery period. We don't expect to apply any analgesics pre-operatively. During surgery standard anesthesia protocols will be applied, which also relieve pain.

### **I. Other aspects compromising the welfare of the animals**

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

A possible adverse effect which might occur is loss of an implanted construct. Also the short-term depletion of serotonin after the experiment due to overuse of serotonin release during the experiment could have an effect on the emotional well-being of the mice. Given the fact that we will only upregulate serotonin for the duration of the behavioral assay, estimated to last approximately 30-60 min/day, we do not expect to resort big effects on long-term serotonin levels.

We will closely watch the mouse's status during the whole experiment, but also specifically post-experiment. We will document its weight, its cage behavior, its grooming status, its interaction with the other mouse in their cage etc. Viral tools used in this study are not infectious (Cardin et al., 2010; Gradinary et al., 2009). The viral tools are applied locally in very small quantity. Thus, do not induce any immune reaction nor has apoptosis or neural cell damage been reported (for review see e.g. Yizhar et al., 2011).

Explain why these effects may emerge.

The fiber construct is fixed on the skull of the animal using dental cement. In the post-operative period the head skin of the animal will heal and grow around the construct. However infection may still occur. Special care will be taken for mice after being engaged in the experiment. However, due to potential lack of serotonergic neurotransmission, some animals might become more anhedonic and hence loose appetite. Based on previous studies using similar optogenetic excitation of serotonin, this outcome is considered unlikely, < 1% (Liu et al, 2014; McDevitt et al., 2014).

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

Animals will be visually inspected daily during experiments. During recovery period after surgery, mice will be inspected several times a day and body weight will be measured every day. Recovery boost gel will be administered if animals are not gaining weight. Prophylactic antibiotic will be administered. In case of adverse effects, the experiment will be halted and the animals will be treated accordingly.

#### **J. Humane endpoints**

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

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

If mice present with freezing behavior > 30 min after the initial tone-shock association in their home cage (only the presentation of one tone will be associated with a mild electric foot shock) they will be taken out of the experiment. Based on previous experiments with optogenetic experiments and viral injections in mice we expect no additional stress, on top of the stress of the surgeries. As mentioned before, the temporary serotonin depletion after interval stimulation between 30 – 60 minutes per day, will mostly likely not resort any effects on the behavior of the mouse. Nevertheless, they will be closely monitored to prevent the effects of such depletion.

Indicate the likely incidence.

< 1%, based on 4 years of experience by the researcher at different national and international institutes, performing similar procedures, with regard to the surgeries, optogenetic neuromodulation and behavioral protocol will help us performing these procedures to the best of our ability and knowledge.

#### **K. Classification of severity of procedures**

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

Behavioral protocol: mild -> low intensity electric shock (.6 mA) for just one second and one presentation during the first tone-shock association session.

Surgery for implantation of the micro light fibers and viral vector delivery to the DRN: moderate -> adequate peri- and post-surgery anesthesia and analgesia will be provided. All operations will be performed under anesthesia. The expected effect of temporary serotonin depletion will be minimal given only the restricted duration of the experiments. We do not expect pain or distress before surgery and after surgery, when necessary based on the status of the animal, we will provide adequate analgesia and/or antibiotics. The cumulative discomfort will therefore be considered moderate.



## End of experiment

### L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

To verify the extent of labelling serotonergic cells and their projection pathways with our light-gated opsins, we need to perform post-mortem histological analyses on each of the mice tested in our behavioural assay. The lack of a functional effect could be due to under-expression of our artificial ligands. Also, as we are interested in activating only the serotonergic neurotransmitter system we would like to avoid labelling and hence artificially exciting/inhibiting non-serotonergic pathways.

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

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

x Yes



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht

Postbus 616

6200 MD MAASTRICHT



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD107002017825

**Bijlagen**

2

Datum 17 januari 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 16 januari 2017. Het gaat om uw project "The role of serotonin in post-traumatic stress disorder". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD107002017825. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

**Wacht met de uitvoering van uw project**

Als wij nog informatie van u nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn bijgeschreven op de rekening van de CCD. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als wij nog informatie van u nodig hebben, wordt deze termijn opgeschort. In geval van een complexe aanvraag kan deze termijn met maximaal vijftien werkdagen verlengd worden. U krijgt bericht als de beslisperiode van uw aanvraag vanwege complexiteit wordt verlengd. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

**Factuur**

Bijgaand treft u de factuur aan voor de betaling van de leges. Wij verzoeken u de leges zo spoedig mogelijk te voldoen, zodat we uw aanvraag in behandeling kunnen nemen. Is uw betaling niet binnen dertig dagen ontvangen, dan kan uw aanvraag buiten behandeling worden gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

**Meer informatie**

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

**Datum:**

17 januari 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD107002017825

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

**Datum:**  
17 januari 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD107002017825

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10700  
Naam instelling of organisatie: Universiteit Maastricht  
Naam portefeuillehouder of  
diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: 50169181  
Straat en huisnummer: Minderbroedersberg 4-6  
Postbus: 616  
Postcode en plaats: 6200 MD MAASTRICHT  
IBAN: NL04 INGE 0679 5101 68  
Tenaamstelling van het  
rekeningnummer: Maastricht University

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

**Datum:**  
17 januari 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD107002017825

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

**Over uw aanvraag**

Wat voor aanvraag doet u?  Nieuwe aanvraag  
 Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn  
 Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 maart 2017  
Geplande einddatum: 1 maart 2022  
Titel project: The role of serotonin in post-traumatic stress disorder  
Titel niet-technische samenvatting: Het belang van de neurotransmitter serotonine bij posttraumatische stress stoornis ( PTSS)  
Naam DEC: DEC-UM  
Postadres DEC: Postbus 616, 6200 MD, Maastricht  
E-mailadres DEC: [REDACTED]

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 1.541,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

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

**Ondertekening**

Naam: [REDACTED]  
Functie: [REDACTED]  
Plaats: Maastricht  
Datum: 16 januari 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht

Postbus 616

6200 MD MAASTRICHT



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD107002017825

**Bijlagen**

2

Datum 17 januari 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 17 januari 2017

Vervaldatum: 16 februari 2017

Factuurnummer: 170825

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD107002017825	€ 1.541,00

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

# DEC-advies PV 2015-004/ [REDACTED]

## Preambule:

De DEC-UM verzoekt U eventuele aanvullende vragen rechtstreeks aan de aanvrager te stellen met een afschrift aan de DEC-UM.

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. **Aanvraagnummer:** 10700
2. **Titel van het project:** *The role of serotonin in post-traumatic stress disorder.*
3. **Titel van de NTS:** *Het belang van de neurotransmitter serotonine bij posttraumatische stress stoornis (PTSS).*
4. **Type aanvraag:**
  - nieuwe** aanvraag projectvergunning
5. **Contactgegevens DEC:**
  - naam DEC; *DEC-UM*
  - telefoonnummer contactpersoon; [REDACTED]
  - e-mailadres contactpersoon; [REDACTED]
6. **Adviestraject:** (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC-UM 17-11-2016
  - aanvraag compleet
  - in vergadering besproken 25-11-2016
  - anderszins behandeld
  - termijnonderbreking(en) van / tot
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
  - aanpassing aanvraag
  - advies aan CCD
7. **Afstemming IvD:**
  - De aanvrager heeft het projectvoorstel afgestemd met de IvD *dd. 17-11-2016*
8. **Eventueel horen van aanvrager:** *N.V.T.*
9. **Correspondentie met de aanvrager:**
  - Datum 29-11-2016
  - Gestelde vragen:

### 3.1 Achtergrond

#### Vragen:

1. *Het voorbeeld van de geur van een BBQ (hetgeen doet denken aan brandend mensenvlees) roept enkele vragen op: 1. Is de geur niet (vrijwel) identiek (m.a.w. dezelfde stimulus) en is er dan wel sprake van faulty PS? Het lijkt eerder de context/associatie die dan anders is. Dit is wezenlijk anders dan wat er in het geplande project wordt bekeken (verschillende stimuli).*

2. *Is het probleem bij PTSD wel faulty PS of is het wellicht juist het gebrek aan top-down cognitieve controle van emoties die vergelijkbare stimuli oproepen? Dat de geur van de BBQ aan het brandende mensenvlees doet denken is niet zo vreemd. En het zou zelfs zo kunnen zijn dat PTSD patiënten en controles verschillende stimuli perfect zouden kunnen onderscheiden, terwijl hun respons toch wezenlijk verschillend is. Het lijkt dan eerder relevant of men de daarbij opkomende emoties juist kan plaatsen en/of onderdrukken. Wat dat betreft zou het niet verwonderlijk zijn wanneer binnen dit project serotonerge input naar bijvoorbeeld de PFC (zoals voorgesteld) juist deze top-down cognitieve control zou beïnvloeden. Dit lijkt dan PS te beïnvloeden (reduced freezing), maar feitelijk kijk je naar iets anders. Hoe wil men hiervoor corrigeren?*

**Antwoord Ad 1.**

De achterliggende hypothese in deze proeven is het bestuderen van overgeneralisatie, veralgemening zo u wil, van vrees aan de hand van de stimulus generalisatie taak die reeds uitgebreid gebruikt en gevalideerd is in humane studies, zie o.a. Lissek et al. (2010), Lau et al. (2011), Lissek et al. (2014a en 2014b). Het aangehaalde voorbeeld komt rechtstreeks uit een review paper in Nature Neuroscience (Kheirbek et al., 2012, zie Figuur 1 uit hun paper). Post-traumatische stress stoornissen hangen deels samen met foutieve contextuele attributie zoals terecht opgemerkt door DEC-UM (stimulus A: geur verbrand *mensenvlees* in context A: oorlog vs stimulus A: geur verbrand *dierenvlees* in context B: BBQ), maar omdat de context waarin een stimulus verschijnt ook beschouwd kan worden als een kenmerk, ook met het overgeneraliseren van aangeleerde vrees naar andere situaties. Zo zullen gelijkende stimuli die een aantal kenmerken delen met de geconditioneerde stimulus, zoals de geur van de BBQ in combinatie met de hitte en geluid van het open vuur in buitenlucht en niet zozeer de geur van aangebrande aardappelen op een inductiekookplaat binnenshuis slechts de geconditioneerde respons kunnen ontlokken. Als deze twee situaties bekeken worden als een verzameling van kenmerken dan is er bepaalde mate van overlap die te maken heeft met de stimulus an sich, alle sensorische componenten (geur, geluid, gevoel etc.), maar ook met componenten die de stimulus overstijgen, zoals de context waarin die stimulus vervat zit (o.a. buiten- vs binnenlucht). In een ideale wereld zou je beide componenten (stimulus an sich en context) willen onderzoeken. We hebben in het bestek van dit project gekozen te gaan voor de eerste component, in navolging van de reeds gevalideerde paradigma's in humane studie. Deze component leent zich heel goed tot experimentele manipulatie, wat niet zozeer een vergoelijking is voor de keuze, maar wel een eerste handvat geeft in ons onderzoek naar de neurale basis van een ingewikkeld ziektebeeld zoals dat het geval is bij PTSS.

**Referenties**

- Kheirbek MA, Klemenhagen KC, Sahay A, Hen R. (2012). Neurogenesis and generalization: a new approach to stratify and treat anxiety disorders. *Nat Neurosci*;15:1613-1620.
- Lau JY, Britton JC, Nelson EE, Angold A, Ernst M, Goldwin M, Grillon C, Leibenluft E, Lissek S, Norcross M, Shiffrin N, Pine DS. (2011). Distinct neural signatures of threat learning in adolescents and adults. *Proc Natl Acad Sci USA*;108:4500-4505.
- Lissek S, Rabin S, Heller RE, Lukenbaugh D, Geraci M, Pine DS, Grillon C. (2010). Overgeneralization of conditioned fear as a pathogenic marker of panic disorder. *Am J Psychiatry*.167:47-55.
- Lissek S, Bradford DE, Alvarez RP, Burton P, Espensen-Sturges T, Reynolds RC, Grillon C. (2014a). Neural substrates of classically conditioned fear- generalization in humans: a parametric fMRI study. *Soc Cogn Affect Neurosci*;9:1134-1142.
- Lissek S, Kaczkurkin AN, Rabin S, Geraci M, Pine DS, Grillon C. (2014b). Generalized anxiety disorder is associated with overgeneralization of classically conditioned fear. *Biol Psychiatry*;75:909-915.



## **Antwoord Ad 2.**

Top-down/cognitieve regulatie van emoties/emotionele gedragspatronen vanuit de prefrontale cortex naar de basolaterale amygdala zoals door de DEC-UM voorgesteld is inderdaad een heel valabel mechanisme wat betreft vrees-conditionering waar de laatste jaren heel wat onderzoek naar verricht is, zie o.a. Courtin et al. (2014) en Knapska et al. (2012). Ook in dit onderzoeksvoorstel nemen we deze belangrijke projectiebaan onder de loep (zie vb. subgoal #3 -DRN-PFC projecties - van goal #3 - Functionele Connectiviteit), maar dan voornamelijk vanuit de vraag naar het belang van serotonine op dit top-down regulatie mechanisme. Aan de hand van goal #2 – Structurele Connectiviteit – willen we eerst een beter zicht krijgen op het belangrijkste subgebied in de prefrontale cortex van serotonerge projecties. Door deze projecties dan selectief uit te schakelen middels optogenetische technieken, kunnen we nagaan wat door de DEC-UM correct wordt opgemerkt, m.n. “*dat* serotonerge input naar bijvoorbeeld de PFC (zoals voorgesteld) juist deze top-down cognitieve control zou beïnvloeden”. Het effect op vrees-conditionering bij manipulatie van de DRN-PFC projectie, gemeten via overgeneralisatie in onze stimulus generalisatie taak, kan verder afgetoetst worden aan het effect gemeten bij manipulatie van de andere projectiebanen, zoals DRN-DG en DRN-A1. Welke van deze projectiebanen het belangrijkste zal zijn, zal moeten blijken uit de empirie.

### **Referenties**

Courtin J, Chaudun F, Rozeske RR, Karalis N, Gonzalez-Campo C, Wurtz H, Abdi A, Baufreton J, Bienvenu TC, Herry C. (2014). Prefrontal parvalbumin interneurons shape neuronal activity to drive fear expression. *Nature*;505:92- 96.

Knapska E, Macias M, Mikosz M, Nowak A, Owczarek D, Wawrzyniak M, Pieprzyk M, Cymerman IA, Werka T, Sheng M, Maren S, Jaworski J, Kaczmarek L. (2012). Functional anatomy of neural circuits regulating fear and extinction. *Proc Natl Acad Sci USA*;109:17093-17098.

2. *Wordt er ook gecorrigeerd voor pattern completion (PC)? Ook dit wordt binnen de huidige experimentele setup niet losgekoppeld van PS.*

### **Antwoord:**

Doordat PS en PC beschouwd dienen te worden als twee componenten op een continue schaal eerder dan twee afzonderlijke en discrete componenten, omvat de studie van de ene per definitie ook de studie van de andere. Vertrekkende van een gelijkaardige beginsituatie van twee stimuli/contexten (zie vorige redenering) houdt PS in dat de schematische representatie (vb. DRN-PFC projecties) de twee stimuli/contexten beter onderscheidt, als het ware zorgt voor minder overlapping. Anderzijds kan het evengoed zijn dat het verstoren van deze projecties via optogenetische neuromodulatie er net voor zorgt dat beide stimuli/contexten schematisch net meer op elkaar gaan gelijken, en er bijgevolg sprake is van PC. Door de parametrische stimulus manipulaties zoals we ze hier geoperationaliseerd hebben, kunnen we de effecten, PS vs PC, ten gevolge van de specifieke manipulatie van projectiebanen experimenteel controleren.

3. *Niet iedere persoon die blootgesteld wordt aan trauma, ontwikkelt PTSD. Wordt hier (differential susceptibility) binnen de context van de geplande muizenstudies ook naar gekeken?*

### **Antwoord:**

Nee, hier wordt in het bestek van dit project niet naar gekeken.

4. *De DEC-UM wil graag een meer onderbouwde achtergrond over de beschikbaarheid van en de beschreven resultaten met proefdieren (bijv. de ePet1Cre transgene muis) in kader van PTSD en het serotonerge systeem om de beschreven hypothese te staven.*

**Antwoord:**

Het gebruik van de ePet1Cre transgene muis in de context van PS/PC is innovatief waardoor er geen resultaten over dit soort proeven voorhanden is. Wel is de muislijn gebruikt geweest in studies die onderzoek deden naar gedrag gerelateerd aan beloning (Liu et al., 2014), geduld voor toekomstige beloningen (Miyazaki et al. 2014) en sociale contacten (Matthews et al., 2016). De eerste studie (Liu et al., 2014) verdient verdere verduidelijking. Zij vonden namelijk dat het stimuleren van serotonine vrijgave in de DRN leidde tot meer plaatspreferentie, het verkiezen van een stimulus gekoppeld aan serotonine vrijgave boven een suiker beloning, maar tevens ook tot het beter kunnen discrimineren van sensorische stimuli. Zij gebruikten een olfactorische taak waarbij de muis twee geuren van elkaar diende te onderscheiden. Het optogenetisch activeren van de serotonerge neuronnen in de DRN leidde tot steilere leercurves. De olfactorische taak was een van de vele taken in hun onderzoek en PTSS lag nooit in hun vizier. Dit was voor ons een belangrijk aanknopingspunt voor dit onderzoeksvoorstel.

**Referenties**

Liu Z, Zhou J, Li Y, Hu F, Lu Y, Ma M, Feng Q, Zhang JE, Wang D, Zeng J, Bao J, Kim JY, Chen ZF, El Mestikawy S, Luo M. (2014). Dorsal raphe neurons signal reward through 5-HT and glutamate. *Neuron*;81:1360-1374.  
Matthews GA, Nieh EH, Vander Weele CM, Halbert SA, Pradhan RV, Yosafat AS, Glober GF, Izadmehr EM, Thomas RE, Lacy GD, Wildes CP, Ungless MA, Tye KM. (2016). Dorsal raphe dopamine neurons represent the experience of social isolation. *Cell*;164:617-631.  
Miyazaki KW, Miyazaki K, Tanaka KF, Yamanaka A, Takahashi A, Tabuchi S, Doya K. (2014). Optogenetic activation of dorsal raphe serotonin neurons enhances patience for future rewards. *Curr Biol*;24:2033-2040.

5. *De DEC-UM vraagt zich af wat de plaats van de voorgestelde studie is binnen de huidige behandelmethodes? Het is nu moeilijk te beoordelen in hoeverre Uw idee vernieuwend en van toegevoegde waarde is.*

**Antwoord:**

Het onderzoeksvoorstel heeft bovenal een fundamenteel wetenschappelijke inslag. We beogen geen directe klinische implicaties met onze onderzoeksresultaten. Wel is het zo dat een humane studie aantoonde dat de reconsolidatie van vreesherinneringen kan bespoedigd worden na gebruik van een standaard beta-blocker (Kindt et al, 2009). Onze bevindingen zouden op termijn eventueel kunnen zorgen voor het gebruik van antidepressiva die de vrijgave van serotonine kunnen beïnvloeden tijdens reconsolidatie therapie bij PTSS of andere angststoornissen.

**3.2 Doel**

**Vragen:**

1. *Goal #2. Is het voor een eerste exploratieve studie (zoals beschreven bij Goal #3) niet afdoende af te gaan op serotonerge connecties die reeds beschreven zijn? De beschreven experimenten bij Goal #2 lijken zo niet kritisch voor Goal #3.*

**Antwoord:**

Nee, uitgaan van reeds beschreven studies is niet afdoende. De volgende argumenten gelden tegen de objectie van de DEC-UM:

- (1) Voorgaande structurele connectiviteit studies beschikten nog niet over de transgene serotonine muislijn en waren derhalve afhankelijk van immunohistochemische methoden.

Door gebruik te maken van de ePet1Cre muislijn in combinatie met 3D-reconstructie technieken gebaseerd op fluorescentie beeldvorming zullen we in staat zijn een uitgebreid 3D-model te reconstrueren door injectie van een Cre-afhankelijke marker. Dit in navolging van de studie van Pollak Dorocic en collega's (2014) waarbij gekeken werd naar de input vanuit verschillende hersengebieden naar de DRN. (2) Een bestaande database, m.n. de Allen Mouse Brain Atlas, is nog niet uitgebreid met de serotonerge projecties vanuit de DRN. (3) Het doel achter onze optogenetische neuromodulatie experimenten is na te gaan welk effect serotonine heeft op vrees-conditionering door de serotonerge projecties vanuit de DRN naar andere hersengebieden te beïnvloeden en het effect hiervan op gedrag te observeren. Vrees-conditionering omvat tal van hersengebieden (Herry & Johansen, 2014) en het is nog niet exact geweten hoe serotonine hierop inwerkt, m.a.w. via welke structuren het inwerkt op dit neurale circuit.

### **Referenties**

Herry C & Johansen JP. (2014). Encoding of fear learning and memory in distributed neuronal circuits. *Nat Neurosci*;17:1644-1654.

Pollak Dorocic I, Furth D, Xuan Y, Johansson Y, Pozzi L, Silberberg G, Carlen M, Meletis K. (2014). A whole-brain atlas of inputs to serotonergic neurons of the dorsal and median raphe nuclei. *Neuron*;83:663-678.

2. *De DEC-UM vraagt om duidelijker in de tekst te vermelden dat doel 2 gebruikt maakt van dieren al beschreven in doel 1. Nu blijkt dit enkel uit de bijgevoegde tabel.*

### **Antwoord:**

Dit wordt nu duidelijk(er) vermeld in de tekst.

3. *De DEC-UM merkt op dat het doel van dit PV is onderverdeeld in drie specifieke aims, en dat er een "interdependence" tussen deze verschillende aims is. Hoe gaan de onderzoekers het PV uitvoeren als aim 1 of 2 niet succesvol blijken?*

### **Antwoord:**

Dit is een zeer terechte opmerking van het DEC-UM. We hebben ook heel lang gepuzzeld en gebrainstormd over hoe het best invulling geven aan de nieuwe regelgeving waarbij een 5-jaren plan uitgekend dient te worden. In dergelijk tijdsbestek kan je als onderzoeker ook niet anders dan een aantal experimenten serieel te plannen waarbij er noodzakelijkerwijs interdependentie optreedt. We hebben ervoor geopteerd de interdependentie te minimaliseren door 3 grote doelen voorop te stellen, m.n. een gedragscomponent, een anatomische component en een functionele component, overeenkomend met *Goal #1 Validation of behavioral paradigm*, *Goal #2 Determine structural connectivity* en *Goal #3 Functional connectivity determined by optogenetic neuromodulation*, respectievelijk. Binnen goal #3 hebben we dan nogmaals een onderverdeling gemaakt in subgoals, dit omwille van dezelfde redenering. Er is dus deel serialiteit/interdependentie, maar tevens ook onafhankelijkheid van de voorgestelde experimenten. Ieder experiment heeft tevens ook voldoende 'buffers' om de keten niet te verstoren.

Zo kunnen we onder goal #1 de gedragstaak voldoende goed afstellen, zorgen voor voldoende discriminatie in vriesgedrag tussen de gekozen stimuli, alvorens de taak in goal #3 in combinatie met de structurele anatomie te koppelen. Binnen goal #3 staan alle 4 subgoals voldoende zelfstandig om ook apart uitgevoerd te kunnen worden.

## **3.3. Belang**

### **Vraag:**

1. *De DEC-UM verzoekt U nog eens naar de laatste zin te kijken, de DEC-UM vraagt zich af wat U hiermee bedoelt.*

**Antwoord:**

Zoals reeds aangehaald is het objectief van die onderzoeksvoorstel voornamelijk van fundamenteel wetenschappelijke aard. Desalniettemin willen we ook speculeren naar mogelijke klinische toepasbaarheid van de verwachte resultaten. Zo zou het best kunnen dat serotonine een heel groot effect uitoefent op patroon separatie. De muizen in onze proeven zouden bv. door upregulatie van serotonine minder overgeneralisatie kunnen vertonen in vreesgedrag tot gelijkaardige tonen. Dit zou dan kunnen inhouden dat we door toediening van SSRI's een gelijkaardig gedragseffect bij mensen lijdend aan PTSS kunnen bewerkstelligen. SSRI's zijn antidepressiva die zorgen voor meer serotonine in de synaptische spleet door de uptake en de daaropvolgende afbraak van serotonine te verhinderen. De toediening van SSRI's zou dan in combinatie met cognitieve gedragstherapie gegeven kunnen worden waarbij onder supervisie van een psychotherapeut het geheugenspoor van de traumatische gebeurtenis stelselmatig wordt geheractiveerd.

**3.4.2**

**Vraag:**

1. *Is een random-selectie van dieren voor doel 2 aanvaardbaar? Is het niet noodzakelijk om dieren met een veranderd gedragspatroon te selecteren?*

**Antwoord:**

Het uitvoeren van de structurele mapping bij enkel muizen die een veranderend gedragspatroon vertonen is ons inziens niet relevant. We verwachten niet dat op die korte termijn de serotonerge projecties vanuit de DRN compleet veranderd zullen zijn. In dat opzicht is een random selectie een valabele optie. Stel dat dit toch het geval zou zijn en zich slechts zou voordoen bij een handvol dieren, dan hebben we, indien we enkel deze muizen zouden selecteren, een structurele mapping uitgevoerd bij dieren die eerder de uitzondering dan de regel zijn. We willen deze structurele mapping zo breed mogelijk houden, vandaar een tweede argument voor de random selectie.

**3.4.3**

**Vraag:**

1. *De DEC-UM vraagt de onderzoekers een figuur met go-nogo momenten bij te voegen.*

**Antwoord:**

Deze figuur is toegevoegd.

**3.4.4**

**Appendix 1**

**Vragen:**

**A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters.**

1. *Er wordt aangegeven dat het gedrag wordt aangeleerd door dagelijkse handeling gedurende max. 2 weken. Houdt dit dan ook in dat de muizen dagelijks eens shock krijgen bij inoefenen 15 kHz? Dit is tegenstrijdig met wat aangegeven is 3.4.2.*

**Antwoord:**

Nee, de muizen krijgen slechts eenmalig een shock bij de geconditioneerde stimulus, hetzij de 15kHz, hetzij de 2.5 kHz toon (gecontrabalanceerd design). De dagelijkse handelingen bestaan uit het vertrouwd maken van de muis met de experimentator en de experimentele setting, dit gedurende een tweetal weken, waarbij er nog geen toon-schok associatie is toegepast. De eerste week bestaat uit het vertrouwd maken met de experimentator en het uit de kooi gehaald worden.

De tweede week bestaat uit het vertrouwd maken met de experimentele opstelling waarbij we met een overhangende camera op compleet niet-invasieve wijze de locomotie van de muis in de opstelling filmen.

Ald deze handeling-fase van 2 weken achter de rug is, start de eigenlijke toon-schok associatie. Nogmaals, slechts eenmalig zal een toon geassocieerd worden met een schok.

2. *Wat wordt de sequentie van stimulus: oplopende kHz, eerst 15kHz daarna lager, ...?*

**Antwoord:**

Er wordt geen sequentie gepresenteerd. Er zal altijd slechts een toon per keer gepresenteerd worden. Voor een deel muizen zal 15kHz met de schok geassocieerd worden, voor het andere deel muizen zal dit de 2.5kHz toon zijn. Dit binnen het kader van een gecontrabalanceerd onderzoeksdesign. De andere ongeconditioneerde tonen zullen at random, opnieuw een per keer, gepresenteerd worden.

3. *Letzkus et al. hadden kennelijk genoeg aan 20 muizen per conditie en experiment (zie appendix 3 onder A, laatste zin). Waarom de onderzoekers hier 3 keer zoveel muizen nodig hebben, wordt niet duidelijk in de uitleg in de een na laatste alinea van A. Er zijn toch niet 3 condities?*

**Antwoord:**

Inderdaad, er zijn geen 3 condities en inderdaad we calculeren een factor 3 in het aantal dieren noodzakelijk voor dit specifieke gedragsexperiment. De logica van deze factor wordt ons insziens duidelijk in het projectvoorstel weergegeven: *"Letzkus and colleagues (2011) needed a smaller amount of mice in their behavioral task because they were merely interested in the difference in amount of freezing behavior between two stimuli. They used auditory sweeps, a tone varying from low to high frequency versus another tone varying from high to low frequency. We are interested in documenting generalization in freezing to parametrically varying tones with less differences in-between than the sweeps used by Letzkus and colleagues (2011). Therefore we expect to use more mice, factor 3 compared to their study."*

Met heel veel plezier trachten we dit hier opnieuw uit te leggen. De twee auditieve sweeps die Letzkus en collega's gebruikten verschilden heel erg van elkaar, hadden een heel grote discriminatieve waarde. De discrete, kortdurende stimuli die wij gaan gebruiken voor het testen van overgeneralisatie en de rol van serotonine hierin, verschillen heel wat minder van elkaar, hebben minder discriminatieve waarde. Dit impliceert dat we meer dieren nodig hebben om tot duidelijke resultaten te kunnen komen. Anderzijds kunnen we ook niet kiezen voor heel erg van elkaar verschillende stimuli.

Dit zou inhouden dat onze *freeze-tuning curves* te steil zouden verlopen waardoor we een mogelijk effect van serotonine op deze *tuning curves* zouden missen. 60 muizen lijkt ons een acceptabele hoeveelheid voor het valideren van ons gedragsparadigma.

4. *U spreekt hier over een diermodel waarbij de angst die opgeroepen wordt door het geluid na een week of twee verdwijnt. In hoeverre is dit vergelijkbaar met PTSD, waarbij met name het chronische aspect van de angst ook een enorme impact heeft?*

**Antwoord:**

De vooropgestelde termijn van twee weken waarna extinctie bij muizen is louter hypothetisch en niet gebaseerd op empirische observatie. Het is niet uitgesloten dat de termijn van extinctie nog langer doorebt en in dat opzicht er dus meer gelijkenissen zijn met PTSS bij de mens. Tevens dient men er rekening mee te houden dat men bij het uitdenken van experimenten bij proefdieren steeds de humane pathologie zo goed mogelijk tracht te benaderen, maar dat er altijd abstractie gemaakt dient te worden.

We hadden de vrees conditionering nog meer salient kunnen maken door de muizen bv. een tijd, gecontroleerd, in een kooi met bepaalde context (horizontale strepen, hexagon vorm, bepaalde geur etc.) en een predator (vb. kat) kunnen plaatsen. In zeker opzicht zou dit de humane realiteit nog meer benaderen, maar we kunnen ons voorstellen dat de DEC-UM hier bezwaar tegen zou indienen. Wij zouden dit althans bezwaarlijk kunnen goedkeuren.

5. *Wat is de reden dat U de dieren die geen virusinjectie krijgen, gaat opofferen?*

**Antwoord:**

Deze dieren worden niet meer verder gebruikt in experimenten. Het alternatief dat deze dieren een natuurlijke dood tegemoet gaan in ons instituut lijkt ons inziens niet preferabel, noch voor de dieren zelf aangezien ze dan toch een opgesloten leven zouden moeten lijden, noch voor het instituut wegens de hiermee geassocieerde kosten voor onderhoud.

**B. De Dieren.**

6. *Kijkt men wel naar emotionele PS (versus cognitieve PS)? Anders gezegd. Is faulty emotionele PS wel een probleem bij PTSD? Is faulty cognitieve PS wel een probleem bij PTSD? Is het wellicht een bijkomstigheid (gevolg) van de ziekte en gaat het niet meer om de rem op emotionele responsen die bepaalde stimuli met zich meebrengen? Hoe houdt men rekening met (corrigeert men voor) alternatieve verklaringen voor gevonden gedragseffecten binnen het huidige design?*

**Antwoord:**

Onze betrachting is net het onderzoek naar de mogelijkheid en verklaringsgrond van een cognitief proces, m.n. patroon separatie als determinant voor angststoornissen en meer specifiek PTSS. Als hypothese schuiven we net een faulty cognitieve PS naar voren. De suggestie gegeven door de DEC-UM dat het eerder een probleem is van (geen of in mindere mate) rem op emotionele responsen is een heel valabele suggestie, maar ligt niet in het bestek van dit onderzoeksvoorstel. Door de stimuli dusdanig parametrisch te creëren in de voorgestelde discriminatie taak trachten we op gedragsniveau cognitieve patroon separatie/completie zo goed als mogelijk te benaderen. Dit stelt ons dan ook in staat om het onderliggende neurale circuit en de rol van serotonine hierin aan de hand van optogenetische neuromodulatie te toetsen.

7. *Verwacht men geen uitval?*

**Antwoord:**

We verwachten slechts minimaal tot geen uitval. Door de legio ervaring van de hoofdonderzoeker van dit project in het uitvoeren van gedragstaken bij knaagdieren zal uitval geminimaliseerd worden.

8. *U gaat de muizen in paren huisvesten. Denkt U last te zullen gaan hebben van 'sociale buffering'? Hoe ondervangt U dit?*

**Antwoord:**

Het effect van sociale buffering op onze gedragstaak vormt geen enkel probleem. Het effect van ondermaatse patroon separatie en de rol die serotonine hierin kan spelen zal individueel binnen iedere muis zelf gemeten worden. Voor iedere muis bekomen we een *freeze tuning curve/functie* waarvan we de hellingsgraad overheen muizen kunnen middelen. Iedere muis zal gepaard gehuisvest worden waardoor er geen onderlinge verschillen bestaan tussen de muizen in onze experimenten.

### **C. Hergebruik.**

9. *Is er een reden dat U 20 dieren moet opofferen voor het bestuderen van de hersenen? Dit aantal lijkt nogal veel?*

**Antwoord:**

Uit de in totaal 60 dieren die betrokken worden in de gedragstaak zullen een 20-tal dieren verder gaan in de structurele mapping experimenten. Deze 20 muizen zullen dan een korte operatie met virale injectie ondergaan, een operatie die om en bij de 30-60 minuten duurt. We schatten hiervoor een 20-tal dieren te zullen nodig hebben aangezien we een uitgebreide 3D kaart van projecties vanuit DRN naar de verschillende hersengebieden willen opstellen. De overige 40 dieren, zonder virale injectie, zullen gesacrificeerd worden volgens protocol in het instituut. Het lijkt ons daarom nuttig om toch voldoende dieren te gebruiken voor de structurele mapping. We willen zeker een goed beeld krijgen van de anatomische projecties. Beide groepen muizen worden sowieso gesacrificeerd.

10. *U vraagt 60 dieren in deze appendix. Daarvan gaat U er 20 injecteren met een virus, 20 offert U op. En wat gebeurt er met de overige 20 dieren?*

**Antwoord:**

Deze interpretatie van het DEC-UM is niet volledig correct, veroorzaakt door het onduidelijk vermelden van het aantal dieren en/in de verschillende experimenten. Hier volgt een nieuwe poging. In totaal worden #60 muizen betrokken bij de experimenten in Appendix #1. Alle muizen ondergaan de stimulus discriminatie taak waarbij er eenmalig een toon met een elektrische schok geassocieerd zal worden. Voor #30 dieren zal dit de 15 kHz toon zijn (cf. groep #1), voor de overige #30 dieren zal dit de 5 kHz toon zijn (cf. groep #2). Daarna zal at random #20 dieren met de tracer geïnjecteerd worden. Dit kunnen zowel de dieren uit groep #1 of groep #2 zijn. Uit welke van deze twee groepen de dieren komen maakt niet uit. Deze #20 dieren zullen dan na 2 weken expressie gesacrificeerd worden voor histologische analyse van de projectie banen vanuit de DRN. De overige #40 dieren worden volgens protocol gesacrificeerd zonder tracer injectie en zonder histologische analyse.

### **D. Vervanging, vermindering en verfijning.**

11. *U geeft aan het aantal te minimaliseren door gebruik te maken van een power analyse, is dat correct? Onder punt B "de dieren", schrijft U iets anders.*

**Antwoord:**

We begrijpen de discrepantie en hebben het stuk over de power analyse onder sectie D verwijderd uit het project. Een power analyse uitvoeren is niet mogelijk omdat er voor de discriminatie taak die wij hier willen gebruiken, geen voorgaande data/resultaten beschikbaar zijn.

### **I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen.**

12. *De DEC-UM begrijpt dit stuk niet zo goed. Wat gaat U precies doen met de 40 dieren die niet doorgaan naar experiment 2? En de dieren die naar experiment 2 gaan, daarvan moet U de hersenen bestuderen en dus moeten ze geëuthanaseerd worden?*

**Antwoord:**

Zie tevens weerwoord onder objectie #11.

### **L. Wijze van doden.**

13. *Mogelijk kunt U wat nader onderbouwen waarom een aantal dieren wordt gedood, want het noemen van enkel post-mortem histologie komt wat summier over.*

**Antwoord:**

Hier begrijpen we de DEC-UM niet goed. Van de in totaal #60 dieren die de gedragstaak zullen ondergaan, worden #20 dieren geïnjecteerd met de tracer. De hersenen van deze #20 dieren zullen na transcardiale obductie histologisch onderzocht worden onder de twee-foton microscoop. De overige #40 dieren kunnen niet “eeuwig” blijven leven in het animalarium van de UM alvorens een natuurlijk dood te sterven. Deze dieren zullen dus gesacrificeerd dienen te worden. Tenzij er een valabel alternatief door de DEC-UM wordt voorgesteld?

**Appendix 2**

**Algemene opmerkingen:**

1. *Kan deze appendix niet samengevoegd worden met appendix 1, aangezien de muizen gebruikt voor deze aim 2 vnl. post euthanasie experimenten ondergaan?*

**Antwoord:**

Dit had inderdaad een mogelijkheid kunnen zijn, maar omwille van de structuur van het project en het feit dat deze aanvraag al heel wat iteraties met de IVD heeft ondergaan waarbij een scheiding initieel door IVD werd voorgesteld, hebben we geopteerd dit zo verder uit te werken. We zien geen inhoudelijke redenen om dit nu wel samen te voegen.

2. *De DEC-UM weet niet zeker of zij het doel van dit experiment begrijpt. U schrijft dat U serotonerge regio's in de hersenen in verband wilt brengen met andere hersenstructuren in de getrainde muizen.*

*Hoe belangrijk is het dat het getrainde muizen zijn? In appendix 1 zegt U dat U niet verwacht dat het effect van de primair opgewekte angst na 2 weken nog zichtbaar is in de gedragstesten. Daarna gaat U pas virus injecteren en dan wacht ook nogmaals een paar weken. Verwacht U hier ook maar iets te kunnen zien in de hersenen dat verband houdt met de angstprikkel?*

**Antwoord:**

Naar onze mening wordt er nergens in Appendix #2 aangehaald dat de tracer injecties in getrainde muizen dient te gebeuren. Er staat weliswaar, in de eerste zin, dat injecties in “trained mice” zullen gebeuren, maar hiermee verwijzen we naar het feit dat we #20 muizen uit Appendix #1 zullen gebruiken, muizen die “getraind” zijn, deze dieren recupereren en hiervoor dus geen #20 nieuwe of ook “niet-getrainde” muizen voor moeten gebruiken. We hopen hiermee de onduidelijkheid te hebben verholpen.

**Vragen:**

**A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters.**

1. *U wilt ad random 20 dieren uit appendix 1 selecteren voor deze appendix. Hoe random is dit?*

*Houdt U rekening met sociale stress wanneer U opnieuw dieren die elkaar niet gewend zijn bij elkaar gaat zetten? Zullen de dieren in paren of in groepen gehuisvest worden?*

**Antwoord:**

Dit is volledig at random. De dieren zullen hooguit 30-60 minuten uit de kooi genomen worden voor de eigenlijke operatie van tracer injectie. Daarna worden ze weer bij elkaar geplaatst. Dezelfde paren als voorheen zullen gebruikt worden. Het kan voorkomen dat slechts 1 of allebei de muizen de tracer injectie zullen krijgen. De injectie heeft hoegenaamd ook geen enkel effect op het gedrag van de muis eens de anesthesie is uitgewerkt.



2. *Bij het injecteren van de Cre muizen vraagt de DEC-UM zich af of U een controle groep heeft geïncubeerd en of U dat zinvol lijkt? Dezelfde vraag geldt ook voor heel exp. 3. U beschrijft daar dat de muis zijn eigen controle is, kan dat voor iedere situatie?*

**Antwoord:**

Voor de tracer injectie (Appendix #2) is een controle conditie niet nodig. Voor de gedragscomponent (Appendix #1) vormt iedere muis zelf zijn eigen controle; voor iedere muis bekomen we een *freeze tuning curve/functie* waarvan we de hellingsgraad overheen muizen kunnen middelen. Voor de optogenetische experimenten onder Appendix #3 is de suggestie van het DEC-UM om een controle groep toe te voegen heel correct. We hebben bijgevolg een controle groep van #10 dieren aan iedere subgoal toegevoegd. Deze dieren zullen een sham-injectie krijgen van een niet-Cre afhankelijk virus van dezelfde hoeveelheid als het Cre-afhankelijke virus. De aantallen benodigde dieren voor Appendix #3 zijn daarom aangepast.

**B. De Dieren.**

3. *De DEC-UM waardeert dat de onderzoekers proberen vermindering en verfijning te bereiken door aims 1 en 2 te combineren. Echter het is de DEC-UM niet duidelijk hoe de onderzoekers omgaan als aim 1 niet uitvoerbaar is.*

**Antwoord:**

Aim 1 zal altijd uitvoerbaar zijn. We zien niet in waarom de DEC-UM hier anders over denkt. We hebben volledige controle over de stimuli en zullen indien we merken bij de eerste muizen dat de 2.5 kHz stimulusverschillen te klein zijn deze stap vergroten tot vb. 4 kHz of 5 kHz. Door net te kiezen voor dit type van discriminatie taak hebben we enorm veel controle en invloed op het slagen van de gedragsexperimenten voorgesteld in Appendix #1.

4. *Krijgen de dieren na de chirurgie enkel ad libitum water gedurende 2 weken?*

**Antwoord:**

Ja, in elk van de voorgestelde experimenten krijgen de muizen ad libitum water en voedsel.

5. *Verwacht men geen uitval?*

**Antwoord:**

We verwachten slechts heel minimaal tot geen uitval. De hoofdonderzoeker heeft heel veel ervaring met virale tracer injecties in andere hersengebieden. We dienen bij dit soort injecties heel zorgvuldig om te gaan met de sinus cavernosus, maar als we standaard stereotactische injectie protocollen opvolgen vormt dit geen enkel probleem.

**J. Humane eindpunten.**

6. *Wat is 'elephant arched back'?*

**Antwoord:**

We realiseren ons dat de benaming misschien niet volledig correct is. We verwijzen naar een gekromde rug, wat deels lijkt op een olifantenrug. Het is een klinisch teken van onbehagen bij een knaagdier. Zie bijgevoegde foto.



### **Appendix 3**

#### **Algemene opmerking:**

1. *Zie ook de vragen bij de andere appendices.*

**Antwoord:**

Bij onze replieken op de opmerkingen bij de andere appendices hebben we ook de experimenten uit Appendix #3 betrokken.

#### **Vragen:**

##### **A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters.**

1. *Kunnen de verschillende sub-doelstellingen schematisch verduidelijkt worden?*

**Antwoord:**

We presenteren onder Sectie A reeds #2 figuren waaronder ook een uitgebreid schema. Misschien dat de DEC-UM kan verduidelijken wat ze precies bedoelen met “schematische verduidelijking”?

##### **B. De Dieren.**

2. *Is sociale huisvesting wel mogelijk gezien de fibers en elektrodes?*

**Antwoord:**

Ja, dit is geen enkel probleem. De fibers zijn geïmplantéerd en steken slechts enkele millimeter uit boven de cement cap op de schedel van de muis. Tijdens het eigenlijke experiment worden de muizen gekoppeld met flexibele fibers via dat klein uitstekend stukje fiber aan de lasers. De elektrodes steken op een zelfde minimale manier uit boven de cement cap. De muizen kunnen hierdoor nog steeds vrij en zonder problemen hun kooien exploreren.

3. *In Appendix 3 wordt beschreven dat 30 dieren uit aim1 en 60 dieren uit aim 2 worden gebruikt – ook hier vraagt de DEC-UM voor een onderbouwing wat betreft go-nogo momenten.*

**Antwoord:**

Dit punt van de DEC-UM begrijpen we niet goed. #30 dieren + #10 dieren (controle conditie) ondergaan het experiment onder subgoal #1; #60 dieren + #10 dieren (controle conditie) ondergaan het experiment onder subgoal #2; #60 dieren + #10 dieren (controle conditie) ondergaan het experiment onder subgoal #3; #30 dieren + #10 dieren (controle conditie) ondergaan het experiment onder subgoal #4. We begrijpen niet goed wat de DEC-UM bedoelt met go-nogo momenten. Het betreft hier seriële experimenten, waarbij er enkel wordt overgegaan naar het volgende subgoal na behalen vorige subgoal. De subgoals zijn zodanig opgesteld dat ze van breed naar specifiek gaan. We hebben ons hierbij deels gebaseerd op voorgaande, gepubliceerde studies (McDevitt et al., 2014). Eerst onderzoeken we de gedragsmatige effecten bij volledige activering van alle neuronen in DRN.

Daarna zoeken we in op enkel de serotonerge neuronen in DRN waarbij we kijken naar de meest effectieve fase waarin deze neuronen betrokken zijn, tijdens de leer- (*acquisition phase*) dan wel ophaal-fase (*retrieval phase*). Vervolgens kijken we, voor de fase met grootste effect, welke projectie vanuit de DRN de grootste gedragsverandering veroorzaakt bij optogenetische stimulatie. Tenslotte kijken we voor de fase en voor de projectie vanuit DRN met de grootste gedragsverandering wat er gebeurt op elektrofysiologisch niveau, i.e. actie potentialen.

### **Referentie**

McDevitt RA, Tiran-Cappello A, Shen H, Balderas I, Britt JP, Marino RA, Chung SL, Richie CT, Harvey BK, Bonci A. (2014). Serotonergic versus nonserotonergic dorsal raphe projection neurons: differential participation in reward circuitry. *Cell Rep*; **8**:1857-1869.

4. *Het aantal dieren per groep is niet duidelijk. Het lijkt om groepen van 30 dieren te gaan? Maar is, getuige de laatste zin van A, het doel niet 20 per groep?*

**Antwoord:**

Zie tevens onze voorgaande repliek. Inderdaad we gaan uit van #20 dieren per groep. Dit klopt met hoe het beschreven staat in het project. Hier volgt verduidelijking. Subgoal #1 omvat #20 dieren per groep met nog eens #10 extra dieren voor een pilot experiment, dit om vb. de hoeveelheid virus, de exacte stereotactische coördinaten, de optimale virale expressie tijd etc. te fine-tunen. Hierbij hebben we dan nog eens #10 controle dieren aan toegevoegd, dus een totaal van #40 dieren. Subgoal #2 omvat 3 condities, waarbij we telkens #20 dieren per conditie willen testen, dus een totaal van #60 dieren, hierbij dan nog eens #10 controle dieren, dus een totaal van #70 dieren. Subgoal #3 omvat opnieuw 3 condities, waarbij telkens #20 dieren per conditie, hierbij nog #10 controle dieren, dus een totaal van #70 dieren. Subgoal #4 omvat slechts een conditie, mn. de beste projectie vanuit DRN waarbij het grootste effect op de gedragsmatige freeze tuning curves, maar omdat het elektrofysiologische metingen betreft willen we graag iets meer dan #20 dieren testen, vandaar het streven naar #30 dieren in dit subgoal, met nog eens #10 controle dieren, een totaal van #40 dieren voor dit subgoal. In totaal voor Goal #3 Functionele Connectiviteit dus:  $40+70+70+40 = 220$  muizen. Zie tevens de aangepaste Tabel 1.

5. *Verwacht men geen uitval?*

**Antwoord:**

Ja, uitval is mogelijk omdat het hier toch wel relatief moeilijke experimenten betreft. Vandaar dat we voor #20 dieren per conditie gaan. Op basis van de invloedrijke studie van Letzkus et al. (2014) worden 12-15 “goede” muizen als standaard beschouwd. Met #20 dieren per conditie hebben we dus een buffer tegen uitval van om en bij de #5 muizen.

6. *U vraagt om nogmaals 150 dieren. Echter, kunt U niet de 20 dieren zonder bestemming van appendix 1 hergebruiken, bijvoorbeeld voor de pilot van doel 1?*

**Antwoord:**

Dit is niet mogelijk omdat de dieren in Appendix #3 eerst geïnjecteerd gaan worden alvorens blootgesteld aan de toon-schok associatie.

7. *Hier rijst de vraag wat het nut nog is van het experiment in appendix 1? Wanneer U een reeds gevalideerd diermodel voor PTSD gebruikt, hoeven de experimenten in appendix 1 dan niet uitgevoerd te worden?*

**Antwoord:**

Met de experimenten in Appendix #1 hopen we een stimulus discriminatie taak als benadering van patroon separatie, een alternatieve en cognitieve manier om te kijken naar angststoornissen te valideren. Het is dus niet een reeds gevalideerd diermodel voor PTSS. Dit hopen we met Appendix #1 te bekomen. Appendix #3 dient dan om de rol van serotonine op het gedrag gemeten met deze gevalideerde taak te onderzoeken.

#### **D. Vervanging, vermindering en verfijning.**

8. *U schrijft: “By choosing the mouse as our preferred animal model, exhibiting similar PTSD-like behavior as in humans, with behavioral tests alike the one presented here already validated, will result in data that can be extrapolated to human patients.” Kunt U dat nader toelichten? Hoe past appendix 3 in die extrapolatie?*

##### **Antwoord:**

Er worden binnen de functionele neurochirurgie al heel wat diepe hersenkern interventies gedaan bij legio neurologische en psychiatrische ziektebeelden, zie onder andere een heel recent review paper door Lewis en collega's (2016) in *Neuroscientist*. Optogenetische neuromodulatie wordt hierbij gezien als mogelijke opvolger van de elektrische hersenstimulatie. Een goed inzicht in het neurale circuit onderliggend aan ziektebeelden zoals PTSS en een goed inzicht in hoe optogenetische neuromodulatie als mogelijke therapie hierbij kan ingezet worden door dit eerst meticuleus te bestuderen in proefdieren, kan op de (middel)-lange termijn heel wat voordelen opleveren voor (humane) patiënten die lijden aan dergelijke ziektebeelden. Door gebruik te maken van het stimulus discriminatie onderzoeksdesign zoals reeds gevalideerd bij mensen (Lissek et al. (2010), Lau et al. (2011), Lissek et al. (2014a en 2014b) in onze muizen vereenvoudigen we de extrapolatie van onze onderzoeksresultaten enigszins.

##### **Referenties**

Lau JY, Britton JC, Nelson EE, Angold A, Ernst M, Goldwin M, Grillon C, Leibenluft E, Lissek S, Norcross M, Shiffrin N, Pine DS. (2011). Distinct neural signatures of threat learning in adolescents and adults. *Proc Natl Acad Sci USA*; **108**:4500-4505.

Lewis PM, Thomson RH, Rosenfeld JV, Fitzgerald PB. (2016). Brain neuromodulation techniques: A review. *Neuroscientist*; **22**:406-421.

Lissek S, Rabin S, Heller RE, Lukenbaugh D, Geraci M, Pine DS, Grillon C. (2010). Overgeneralization of conditioned fear as a pathogenic marker of panic disorder. *Am J Psychiatry*. **167**:47-55.

Lissek S, Bradford DE, Alvarez RP, Burton P, Espensen-Sturges T, Reynolds RC, Grillon C. (2014a). Neural substrates of classically conditioned fear-generalization in humans: a parametric fMRI study. *Soc Cogn Affect Neurosci*; **9**:1134-1142.

Lissek S, Kaczkurkin AN, Rabin S, Geraci M, Pine DS, Grillon C. (2014b). Generalized anxiety disorder is associated with overgeneralization of classically conditioned fear. *Biol Psychiatry*; **75**:909-915.

- Datum antwoord 04-01-2017
- Verstreckte antwoorden: Zie hierboven.
- De antwoorden hebben wel geleid tot aanpassing van de aanvraag, echter de DEC-UM had nog een aantal vragen(zie hieronder).
  
- De DEC-UM heeft op 10-01-2017 nog een aantal vragen gesteld aan de onderzoeker. Vragen met antwoorden(ontvangen 11-01-2017):
  
- 3.1. Bij vraag 2 merkt de DEC-UM op dat er ook onderzoeken zijn die suggereren dat “pattern separation and pattern completion” (deels) separate processen zijn met verschillende anatomische substraten (hippocampale subgebieden).

##### **Antwoord:**

Deze opmerking van de DEC-UM is zeer terecht. Gebaseerd op onder andere het werk van Dr. Knierim weten we dat patroon separatie zich voornamelijk afspeelt in de neurale respons patronen van de gyrus dentatus oftewel dentate gyrus (DG), terwijl patroon completie zich eerder afspeelt op niveau van cornu ammonis (Lee et al.,

2015). Een recent review paper van de hand van Dr. Knierim licht de aard van deze hippocampale verschillen verder toe (Knierim & Neunuebel, 2016).

**Referenties:**

Knierim JJ & Neunuebel JP. (2016). Tracking the flow of hippocampal computation: pattern separation, pattern completion, and attractor dynamics. *Neurobiol Learn Mem*;129:38-49.

Lee H, Wang C, Deshmukh SS, Knierim JJ. (2015). Neural population evidence of functional heterogeneity along the CA3 transverse axis: pattern completion versus pattern separation. *Neuron*;87:1093-1105.

- 3.4.2. *Het uitvoeren van de structurele mapping bij enkel muizen die een veranderend gedragspatroon vertonen, is volgens de DEC-UM niet relevant. De DEC-UM verwacht niet dat op die korte termijn de serotonerge projecties vanuit de DRN compleet veranderd zullen zijn. Gaarne in oogachting nemen dat basis/capaciteit om op stimulus te reageren ('veranderd gedragspatroon) reeds biologisch en (functioneel) anatomisch aanwezig kan zijn vóór ingrijpen. Ofwel primaire variatie in serotonerge functie kan respons wellicht voorspellen.*

**Antwoord:**

We danken de DEC-UM voor het volgen van onze redenering zoals geponeerd in de (voorgaande) wijzigingsbrief. We denken inderdaad ook dat de gedragspatronen, al dan niet veranderd na conditionering, het resultaat zullen zijn van de aanwezige structureel, anatomische connecties, waarop dan functionele modificaties kunnen inspelen. Qua metafoor kan men bijvoorbeeld denken aan reeds aanwezige bekabeling van een huis waardoor je lamp gaat branden (noodzakelijke anatomische voorwaarde) waarbij je met een schakelaar de sterkte kan fine-tunen (voorwaardelijke functionele modificatie).

- *Appendix 1. B. Vraag 7. Als U louter en alleen naar cognitieve PS wil kijken, waarom hanteert U dan geen puur cognitieve PS taak of voegt U deze niet toe (d.a. OLT-variant)? Door de huidige studieopzet is het juist moeilijk te onderscheiden of een eventueel verschil in performance in de huidige taak een primair cognitieve of emotionele basis heeft. Juist ook omdat U een model en test in één concept verenigd hebt.*

**Antwoord:**

Binnen de UM is bij de start van het project overleg geweest m.b.t. het al dan niet implementeren van de OLT taak. Omwille van het beperkt aantal trials die men bij de OLT kan doen en de moeilijke parameterisatie (stimulus controle) leek deze taak ons minder geschikt om patroon separatie/completie vanuit een (puur) cognitieve hoek te benaderen. De huidige discriminatie taak met verschillende frequenties lijkt ons eerder geschikt m.b.t. beide objecties: veel trials mogelijk met daarbij heel veel controle over de aangeboden stimuli.

We zien niet zo goed in waarom deze taak minder geschikt zou zijn dan de OLT taak wat betreft het dissociëren van cognitie en emotie? Ook bij de OLT zou je een locatie dienen te associëren met de elektrische schok. Wat zou dan beletten dat de muis geen gegeneraliseerde angst vertoont t.a.v. andere locaties, m.a.w. eerder problematische emotionele dan wel cognitieve patroon separatie vertoont? Graag geven we gehoor aan de suggestie van de DEC-UM indien we de achterliggende redenering beter begrijpen.

- *Indien U na de laatste waarneming bij dieren die U niet hoeft te doden in het kader van Uw experiment, deze niet bestemd voor adoptie, dan gaat de DEC-UM er vanuit dat U de dieren retourneert aan de proefdierfaciliteit, waar de dierenarts of een andere terzake deskundige het lot van de dieren bepaalt.*

**Antwoord:**

Inderdaad, de dieren zullen dan geretourneerd worden aan de proefdierfaciliteit alwaar een dierenarts over het lot van de dieren bepaalt.

- De antwoorden hebben wel geleid tot aanpassing van de aanvraag.

**10. Eventuele adviezen door experts:** (niet lid van de DEC-UM) **N.V.T.**

## **B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)**

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is. **JA**
2. De aanvraag betreft een **nieuwe** aanvraag.
3. Is de DEC competent om hierover te adviseren? **Ja**
4. 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.

*Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan. Immers, de verschillende subdoelen zijn zowel tijdsafhankelijk als uitkomstafhankelijk van elkaar. Deze subdoelen zijn allemaal noodzakelijk om de doelstelling te behalen. De aanvrager heeft zowel binnen de doelstellingen en bijlagen dierproeven als tussen de doelstellingen beschreven op basis van welke criteria deze zal besluiten het project wel of niet te continueren.*

*De DEC-UM 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-UM van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.*

2. Geef aan of er aspecten in deze aanvraag zijn die niet in overeenstemming zijn met wet- en regelgeving anders dan de Wod? Denk hierbij aan bijvoorbeeld de Flora en fauna wet en Wet dieren. Indien van toepassing, leg uit om welke aspecten het gaat en waarom hier sprake van is.

*N.v.t., daar dit buiten de taakstelling van de DEC valt overeenkomstig artikel 18a.2.b van 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.

*Het projectvoorstel heeft inderdaad kenmerken van fundamenteel onderzoek.*

*Belangen en waarden*

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een reële relatie is tussen beide doelstellingen.

*Zie antwoord op vraag C5.*

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden.

De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamenteel wetenschappelijke project, dat gericht is op inzicht in de rol van het serotonerge systeem bij post-traumatische stress stoornis (ptss), zijn: *de proefdieren, de onderzoekers, de uiteindelijke doelgroep, nl. degenen die lijden aan ptss en hun naasten, en ook de medische wetenschap en de samenleving als geheel.*

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: *De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de experimentele handelingen en de gevolgen daarvan en de opoffering aan het eind van de proeven. De proefdieren zullen gering dan wel matig ongerief ondervinden.*

Waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden: *De onderzoekers vergaren kennis over de achterliggende oorzaken van ptss, de onderliggende neurale netwerken en de invloed van het serotonerge systeem. Op basis hiervan hopen zij uiteindelijk klinisch relevante interventies te kunnen ontwikkelen. De onderzoekers zullen medisch-wetenschappelijke kennis verkrijgen die relevant is in het onderzoek en uiteindelijk ook in de behandeling van ptss en deze kennis delen met de wetenschappelijke gemeenschap.*

Waarden die voor degenen die lijden aan ptss bevorderd worden: *Uiteindelijk kan meer kennis over de neurobiologische achtergrond van hun symptomen leiden tot verbeterde therapeutische mogelijkheden. Daardoor zou de kwaliteit van leven van deze patiënten en hun naasten verbeterd kunnen worden. Groei van medische kennis en mogelijke uitbreiding van het therapeutische arsenaal op een gebied waar daaraan behoefte is, i.c. de psychiatrie, wordt eveneens bevorderd door het onderhavige onderzoek. Daarom heeft dit onderzoek ook belang voor de samenleving als geheel.*

6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten. Zo ja, benoem deze, leg uit waarom daar sprake van kan zijn en of geef aan of deze effecten afgedekt worden door specifieke wetgeving.

*N.v.t., daar dit buiten de taakstelling van de DEC valt overeenkomstig artikel 18a.2.b van 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 antwoord toe.

*Voor zover de DEC-UM kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat gezien de wetenschappelijke output, de verworven interne- en externe financiering 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 antwoord toe.

*De DEC-UM 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-UM 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 de aanvrager voldoet aan de in de Wod voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw antwoord toe. **N.V.T.**

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 de richtlijn. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan omdat het om wetenschappelijke redenen noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht toe waarom wel/niet.

*De DEC-UM heeft zich ervan verzekerd dat zulks het geval is.*

11. Beoordeel of het ongerief als gevolg van de dierproeven realistisch is ingeschat en geclassificeerd, waarbij uitgegaan wordt van de kans op angst, pijn, stress en/of ziekte bij individuele dieren.

*De DEC-UM 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. Geef aan op welke wijze de integriteit van de dieren wordt aangetast.

*De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de experimentele handelingen en de gevolgen daarvan. De dieren worden aan het eind van de proef opgeofferd.*

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 antwoord toe.

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

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn? Onderbouw uw antwoord.



*De DEC-UM is van mening dat de doelstellingen van de proef niet behaald kunnen worden, anders dan met de aangevraagde dieren, daar geschikte vervangingsalternatieven ontbreken, zoals beschreven in onderhavig projectvoorstel.*

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. Onderbouw uw antwoord.

*Naar de mening van de DEC-UM 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 statistische analyse middels een poweranalyse.*

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 antwoord toe.

*De DEC-UM 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-UM 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. Onderbouw uw antwoord.

*Voor zover de DEC-UM 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-UM 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? Geef ook aan welke maatregelen verder zijn getroffen om bij fok of aankoop van dieren het aantal in voorraad gedood te beperken.

*In onderhavige projectaanvraag worden niet dieren van een eenvormig geslacht gebruikt. Alhoewel de DEC-UM 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 de richtlijn. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht dit toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd.

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

20. Indien dieren worden gedood, is adoptie of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is.

*Adoptie is ten aanzien van onderhavige aanvraag niet opportuun daar het hier niet handelt om niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren.*

*NTS*

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

*Naar de mening van de DEC-UM is zulks het geval.*

## **D. Ethische afweging**

1. Benoem de centrale morele vraag.

*Rechtvaardigt het verkrijgen van inzicht in de rol van het serotonerge systeem bij post-traumatische stress stoornis, de opoffering en het ongerief dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project The role of serotonin in post-traumatic stress disorder?*

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.

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

Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: *substantieel voordeel.*

Waarden die voor de doelgroep bevorderd worden: *matig voordeel.*

Algemeen: *relevante groei van medische kennis.*

*De DEC-UM is van mening dat de belangen van de medische wetenschap en de samenleving in het algemeen en van de patiënten en hun naasten binnen het project "The role of serotonin in post-traumatic stress disorder" zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven, na gering en matig ongerief, tot de dood. Zij worden door de experimenten en de consequenties daarvan in hun welzijn geschaad. De integriteit van de dieren wordt geschaad door de experimentele handelingen en de gevolgen daarvan, en door de opoffering aan het eind van de proeven.*

*Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project echter leiden tot kennis over de achterliggende oorzaken van ptss, de onderliggende neurale netwerken en de invloed van het serotonerge systeem. Er zullen nieuwe doelwitten worden geïdentificeerd als basis voor nieuwe therapeutische strategieën.*

*De verwachting is dat de verworven inzichten op termijn bouwstenen kunnen leveren voor een betere behandeling van mensen die lijden aan ptss. Ptss komt wereldwijd voor, onder andere als gevolg van oorlogen en andere geweldsituaties. Ptss kan relatief jonge mensen treffen en resulteren in een aanzienlijke en langdurige ziektelast, die niet alleen voor de patiënt maar ook voor diens naasten moeilijk te dragen is.*

*Het huidige therapeutische arsenaal is beperkt. Door een verbeterde therapie zou uiteindelijk de kwaliteit van leven verbeterd kunnen worden van belangrijke aantallen patiënten en hun omgeving.*

*Ptss kan het gevolg zijn van het uitvoeren van taken die de samenleving politiek wenselijk acht, zoals het verdedigen van het landsbelang of het dienen van de vrede.*

*Ook vanuit deze optiek heeft dit onderzoek belang voor de samenleving als geheel. Vandaar dat de DEC-UM het onderhavige onderzoek van substantieel belang acht. Het is aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. De onderzoekers zullen zoveel mogelijk trachten het lijden van de dieren te beperken d.m.v. anesthesie en pijnbestrijding, waardoor het werkelijke ongerief van de dieren beperkt blijft in relatie tot het te behalen voordeel.*

### 3. Beantwoord de centrale morele vraag.

*De DEC-UM beantwoordt de centrale morele vraag: "Rechtvaardigt het verkrijgen van inzicht in de rol van het serotonerge systeem bij post-traumatische stress stoornis, de opoffering en het ongerief dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project The role of serotonin in post-traumatic stress disorder?" bevestigend. Hoewel de DEC-UM de intrinsieke waarde van het dier onderschrijft en oog heeft voor het te ondergane ongerief van de proefdieren, weegt het substantiële belang van dit project naar haar mening zwaarder.*

*De DEC-UM is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en de 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-UM 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. Er zijn voldoende go/no go momenten voorzien om onnodige dierproeven te vermijden. De DEC-UM 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-UM de voorgestelde dierproeven in het projectvoorstel "The role of serotonin in post-traumatic stress disorder" als ethisch gerechtvaardigd. Derhalve voorziet de DEC-UM het projectvoorstel "The role of serotonin in post-traumatic stress disorder" van een positief advies.*

## E. Advies

1. Advies aan de CCD  
 De DEC-UM adviseert de vergunning te verlenen.
2. Het uitgebrachte advies is **unaniem** tot stand gekomen.
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.

*N.v.t. Daarenboven is de DEC-UM niet gewoon projectaanvragen buiten de context c.q. haar verantwoordelijkheid en competentie te beoordelen.*



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht

Postbus 616

6200 MD MAASTRICHT



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD107002017825

**Bijlagen**

1

Datum 20 februari 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 16 januari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "The role of serotonin in post-traumatic stress disorder" met aanvraagnummer AVD107002017825. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

### **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 "The role of serotonin in post-traumatic stress disorder" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 maart 2017 tot en met 1 maart 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-UM gevoegd. Dit advies is opgesteld op 16 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:**  
20 februari 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD107002017825

### **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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven

namens deze:

  
I. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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



# Projectvergunning

## gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Universiteit Maastricht

Adres: Postbus 616

Postcode en plaats: 6200 MD MAASTRICHT

Deelnemersnummer: 10700

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 maart 2017 tot en met 1 maart 2022, voor het project "The role of serotonin in post-traumatic stress disorder" met aanvraagnummer AVD107002017825, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-UM. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is senior post-doctoraal onderzoeker. Voor de uitvoering van het project is biologische verantwoordelijke verantwoordelijk. De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 16 januari 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 16 januari 2017;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 16 januari 2017;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 16 januari 2017, ontvangen op 16 januari 2017.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
<b>3.4.4.1 Goal #1: Validation of behavioral paradigm</b>				
	Muizen (Mus musculus) /	60	100% Licht	
<b>3.4.4.2 Goal #2: Determine structural connectivity</b>				
	Muizen (Mus musculus) / afkomstig uit bijlage 3.4.4.1	20	100% Matig	
<b>3.4.4.3 Goal #3: Functional connectivity determined by optogenetic neuromodulation</b>				
	Muizen (Mus musculus) /	220	100% Matig	

**Aanvraagnummer:**  
AVD107002017825

**Voorwaarden**

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

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:**

AVD107002017825

## 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:**

AVD107002017825

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.