

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

Versie 2006

Aangepast voorblad

DECNR: 2011-150

Ontvangen: 14-02-2012

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag 2
	Nieuw

VROM/GCONR ³
07-103

LVN/CBDNR ⁴

Hoofdproject			Hersenen en gedrag				
--------------	--	--	--------------------	--	--	--	--

Deelproject			3.				
-------------	--	--	----	--	--	--	--

Financieel beheerder	
----------------------	--

Budgetnummer	
30973530N	

Titel van het onderzoek:

Transgene UBB⁺ muizen, PS1/APP muizen en hun kruising: eiwitbepalingen

startdatum 1-01-2012

einddatum ⁹ 1-01-2015

Duur van de proef¹⁰: 1 dag

	Naam	Tel (+ Tel privé enkel VO, VVO en VM)	E-mailadres	Bevoegdheid ⁵	Cap. groep /afdeling
1. Verantwoordelijk onderzoeker (VO)				Art.9	
2. Vervanger VO (VVO)				Art. 9	
3. Verantwoordelijk medewerker (VM) GGO ⁷	Zie VO				
4. overige uitvoerenden				Art.12	
5. overige uitvoerenden				Art. 9	

Diergroep	1	2	3	4				
ctrl/exp/sham	ctrl	exp	exp	exp				
Diersoort	01	01	01	01				
Stam	C57Bl6	C57Bl6	C57Bl6	C57Bl6				
Construct / mutatie ?	Wild type	APPSwe/P S1-dE9	UBB ⁺	APPSwe/PS1-dE9/UBB ⁺				
	APPSwe/P S1-dE9	APPSwe/PS1-dE9/UBB ⁺	APPSwe/PS1-dE9/UBB ⁺					
	UBB ⁺							
	APPSwe/PS1-dE9/UBB ⁺							
Herkomst (leverancier) *	01	01	01	01				
Aantal	13	25	13	25				
Geslacht	m	m	m	M+V				

Dieren immuuncompetent ?	ja	ja	ja	ja				
Leeftijd/gewicht	6 mnd	6 mnd	6 mnd	6 mnd				
Doel van de proef *	32	32	32	32				
Belang van de proef *	01	01	01	01				
Toxicologisch onderzoek *	01	01	01	01				
Bijzondere technieken *	01	17	01	17				
Anesthesie *	04	04	04	04				
Pijnbestrijding *	01	01	01	01				
Mate ongerief *	04	05	04	05				
Toestand dier einde exp*	01	01	01	01				

* VHI-coderingen zie bijlage

1 Verantwoording

Aanvraag dierproef DEC-UM (kaders zijn licht flexibel, maar het geheel is max. 5 pag. versie 2006)

Titel: Transgene UBB⁺¹ en PS1/APP muizen en hun kruising: eiwit bepalingen

1. Doel van de proef.

De ziekte van Alzheimer (AD) is een multifactoriële ziekte. Er wordt verondersteld dat een verstoorde afbraak van eiwitten sterk bijdraagt aan de ontwikkeling van AD.

In de hersenen van AD patiënten hopen zich eiwitten op in tangles en plaques. Eén van deze eiwitten is UBB⁺¹, een mutante vorm van ubiquitine. Wij willen begrijpen waarom dit eiwit zich tijdens deze neurodegeneratieve ziekten ophoopt, en het belang van het ubiquitine-proteasoom systeem (UPS) bij het opruimen van afwijkende eiwitten. Uit ons eerdere onderzoek is gebleken dat de ophoping van het UBB⁺¹ een duidelijk teken is voor verstoorde eiwitaafbraak. Er is door ons een transgene muis ontwikkeld die het humane UBB+1 tot overexpressie brengt. Deze muis heeft inderdaad een geremd UPS, minder synaptische plasticiteit in de hippocampus, wat gepaard gaat aan neuron/synaps verlies en een gedragsfenotype (verslechterd ruimtelijk geheugen, Fischer et al., Neurobiol. Aging 30, 847-863, 2009).

Door kruising met een reeds eerder ontwikkeld model voor AD (met ontwikkeling van plaques), hebben wij een nieuw type muismodel ontwikkeld met twee kenmerken van AD (plaques en verstoorde eiwitaafbraak). Uit ons onderzoek bleek dat tegen onze verwachting in de plaque vorming juist verminderd is in deze triple transgene muis. Deze data zijn recent onderbouwd door metingen van de A β -42 nivo's. Deze bleken significant te zijn verlaagd in deze triple transgene muis. Daarom willen wij onderzoeken welke eiwitten betrokken zijn bij dit proces. Dit betreft o.m. de neuropeptiden NPY, Calbindine 28K en somatostatine. Uit de studie van Minkeviciene et al (2010) verwachten we een toename van 20-30-% van kleurings intensiteit.

Het doel hiervan is om de gedragsveranderingen gevonden bij de UBB⁺¹ muis te completeren met bepalingen van neurotransmitter nivo's.

Het betreft een vervolg op eerder onderzoek verricht op de UM DEC# 2007-192, #2008-069, #2010-148

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang

De ziekte van Alzheimer (AD) is de meest voorkomende vorm van dementie en drukt zwaar op patiënt, familie, verzorgers en samenleving. In Nederland lijden momenteel 130.000 mensen aan de ziekte van Alzheimer. Het aantal zal de komende decennia verdriedubbelen. Het feit dat de meerderheid van de gevallen van deze ziekte sporadisch is, en dat er meerdere neuropathologische kenmerken zijn (Abeta in plaques, tau in tangles, cholinerge deficiënties) duidt er op dat meerdere processen op verschillende momenten verstoord kunnen raken. Het uiteenrafelen van deze processen, ook gedurende veroudering en in relatie tot gedragsveranderingen, zal wetenschappers een handvat kunnen geven interventies te ontwikkelen. Wij richten ons al enkele jaren op het ontstaan en opruimen van afwijkende eiwitten in neuronen zoals bij AD, en denken hiermee één van de verbindende processen te hebben geïdentificeerd. Het ontrafelen van de volgorde waarin de verschillende vormen van pathologie ontstaan en een wisselwerking met elkaar hebben, zal een belangrijke bijdrage leveren aan het ontwikkelen van therapieën. Daarmee wordt de ziekte vertraagd waardoor patienten pas later opgenomen hoeven te worden. Hierdoor ontstaat ook een sterke vermindering van kosten voor de samenleving.

3. Alternatieven

Een deel van het onderzoek zal plaatsvinden door middel van celweek. Neuroblastoma cellen en Hela cellen met een substraat voor het proteasoom-systeem, waaraan GFP hangt zullen gebruikt worden om na te gaan of een bepaald eiwit het proteasoom-systeem beïnvloedt door remming. Ook kan nagegaan worden of door andere eiwitten deze remming teniet kan worden gedaan.

Alle processen die plaatsvinden rondom het ubiquitine-proteasoom systeem (UPS) bij het opruimen van afwijkende eiwitten kunnen echter niet met celweek nagebootst worden, omdat hier verschillende structuren bij betrokken zijn. Het is niet mogelijk om in vitro plaque vorming te induceren, terwijl we deze wel willen kwantificeren in de context van neuropathologie en remming van het UPS. De interacties en processen die hiertoe leiden zijn alleen aanwezig in een diermodel. Uiteraard zullen we zo min mogelijk muizen gebruiken en de mate van ongerief laag houden, volgens de regels van de overheid. Ook zullen we zoveel mogelijk muizen gebruiken uit de back-up populatie van de fok.

4. Ethische afweging

Volgens de aanvrager staat de wetenschappelijke waarde van het onderzoek in relatie tot het aantal en ongerief van de proefdieren zoals beschreven in dit project. Dit met name vanwege het belang voor de mogelijke behandeling van de ziekte van Alzheimer.

Wetenschap

5. Wetenschappelijke onderbouwing

Het aantal mensen met de ziekte van Alzheimer (AD) zal zeer sterk stijgen in de komende twintig jaar. Momenteel zijn er in Nederland circa 130.000 AD patiënten.

De oorzaak van AD is tot nog toe onduidelijk. Veel onderzoek is verricht aan de erfelijke vormen van AD. Echter, in de meerderheid van AD patienten is er geen familiale oorzaak aan te wijzen. Daarom moet er een ander mechanisme zijn dat bijdraagt aan de neurodegeneratie van het AD type.

Wij hebben sterke aanwijzingen gevonden voor zo'n mechanisme (Van Leeuwen et al., Science 279, 242-247, 1998). Normaal wordt DNA, via mRNA vertaald in een eiwit met een specifieke functie. De productie van mRNA wordt geacht met weinig fouten te verlopen. Wij hebben echter bij AD gevonden dat neuronen in de hippocampus en cortex foutieve mRNA's (met een dinucleotide deletie) van genen, geassocieerd met AD, hebben. Deze foutieve RNA's worden vertaald in +1 eiwitten die accumuleren bij AD en niet bij controle patienten. Eén van die eiwitten betreft het ubiquitine. Het ubiquitine is van groot belang bij diverse cellulaire processen zoals de snelle afbraak van eiwitten (bijv. transcriptie-factoren, abnormaal gevouwen eiwitten, Dit resulteert onder meer in het in stand houden van neuronale netwerken. Sindsdien is er gefocust op mutant ubiquitine (UBB+1). UBB+1 accumuleert in de plaques en tangles en remt de afbraak van eiwitten door het proteasoom, het axonale transport van mitochondria en induceert celdood (Dennissen et al., Neurodegenerative Diseases 7, 76-79, 2010). De volgende stap was het genereren van transgene UBB+1 muizen.

Er zijn 2 lijnen met een hoge UBB+1 expressie. Wij hebben besloten op de UBB⁺¹ lijn lijn verder te gaan, de andere lijn is gecryopreserveerd. Deze lijn heeft als gevolg van een lichte proteasomale remming, accumulatie van UBB+1 in de neuronen van cortex en hippocampus, een veranderd proteoom (o.m. eiwitten betrokken bij de energiebalans en bij axonaal transport), en een veranderd gedragsfenotype (verslecht contextueel geheugen, vastgesteld in de Morris Water maze en Fear conditioning). Er is echter geen duidelijke neuropathologie aangetoond in de 3413 lijn (Fischer et al., Neurobiol. Aging 30, 847-863, 2009).

Vervolgens hebben wij de UBB⁺¹ lijn gekruist met de AD muizenlijn (APPsw/PSEN1dE9, Jankowsky et al., Hum. Mol. Gen., 13, 159-170, 2004). Deze laatste lijn (Leeuw85) is inmiddels na een aantal generaties in de C57/Bl6 background gebracht. Op de leeftijd van 9 maanden vertoont deze lijn duidelijke accumulatie van A β . Uit ons onderzoek is gebleken dat de kruising van deze twee lijnen een muizenlijn (APPsw/PSEN Δ E9 x UBB⁺¹, triple muizenlijn) oplevert, die duidelijk minder A β pathologie vertoont. We willen onderzoeken wat het mechanisme is van deze verminderde plaque vorming door het nivo van de eiwitten betrokken bij de processing te meten.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Dit Dec protocol is wetenschappelijk beoordeeld en goedgekeurd door de Scientific Advisory Board (SAB) van de Internationale Stichting Alzheimer Onderzoek.

Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Soort: muis; muizenlijn (leeuw85) die het humane APP-gen met de "Swedish" mutatie en het humane PS-1 gen met een deletie van exon 9 mutatie bevatten. Deze muis heeft een co-integraat waardoor selectie op slechts 1 van deze twee genen noodzakelijk is. Momenteel is de genetische achtergrond: C57Bl6. (

de Johns Hopkins University.

De andere muizenlijn heeft een CamKII α promotor en bevat het UBB⁺¹ gen. Deze muizenlijn is te Amsterdam en heeft een C57Bl6

achtergrond.

De derde lijn (triple muizenlijn) die gebruikt zal worden is een kruising van de leeuw85 lijn met de UBB⁺¹ lijn. Als diemodel voor AD (= A β aggregatie in plaques) is gekozen voor muizen, omdat hier al een aantal diere modellen van aanwezig waren. Er zal gebruik worden gemaakt van zowel dieren met negatief als positief genotype. Dieren met een negatief genotype zijn C57Bl6 muizen en zullen gebruikt worden als controle.

Wat is de uiteindelijke bestemming van het dier na de proef? Terminatie. Na een overdosis pentobarbital natrium (150mg/kg i.p.) zal intracardiale perfusie plaatsvinden, gevolgd door isolatie van de hersenen. De gefixeerde coupes zullen aangekleurd worden voor verschillende eiwitten.

7b. Sexe

Er wordt alleen met mannen gewerkt bij de UBB⁺¹ lijn en de leeuw85 lijn. Omdat de invloed van de oestruscycli bij vrouwtjes het aantal benodigde muizen vergroot. Bij de kruising van deze 2 lijnen zal bij de triple transgene muis echter gebruik worden gemaakt van zowel mannetjes als vrouwtjes, omdat een lager percentage dubbel positief is.

7c. Aantallen

Berekeningen a.d.h.v. L. Sachs: $n = 2(z_{\alpha/2} - z_{\pi})^2 * (\sigma/\delta)^2$

Hierin $2(z_{\alpha/2} - z_{\pi})^2 = F$. Voor een onbetrouwbaarheid van de toets $\alpha = 0,05$ en een onderscheidingsvermogen (π) 80% is $F_{0,80} = 15,7$

Voor een onbetrouwbaarheid van de toets $\alpha = 0,05$ en een onderscheidingsvermogen van 80% is $F_{0,80} = 15,7$.

We verwachten een toename van 20-30% kleurings intensiteit $\delta = 0.25$.
en standaarddeviatie $\sigma = 0.22$

$$n = F * (0.22/0.25)^2$$

$$n = 12.16$$

Uitvalspercentage C57Bl6 en ubb+1: 5%

$$(a - 0.05a) = 12.16$$

$$a = 12.80 \rightarrow 13 \text{ muizen per groep}$$

Uitvalspercentage triple en leeuw85 muizen: 50%

$$(a - 0.50a) = 12.16 \quad 0.5a = 12.16 \quad a = 24.32$$

Voor de verschillende muizenlijnen zijn er ook verschillende uitvalspercentages, dit i.v.m. de epileptische aanvallen die de leeuw85 en triple muizen vertonen. Van tevoren is niet duidelijk welke muis een epileptische aanval zal vertonen. De muizen die voortijdig uitvallen door een epileptische aanval kunnen niet gebruikt worden voor dit experiment, maar ze kunnen wel gebruikt worden voor een ander experiment (dec 2010-147).

We willen de muizen perfuseren op een leeftijd van 6 maanden.

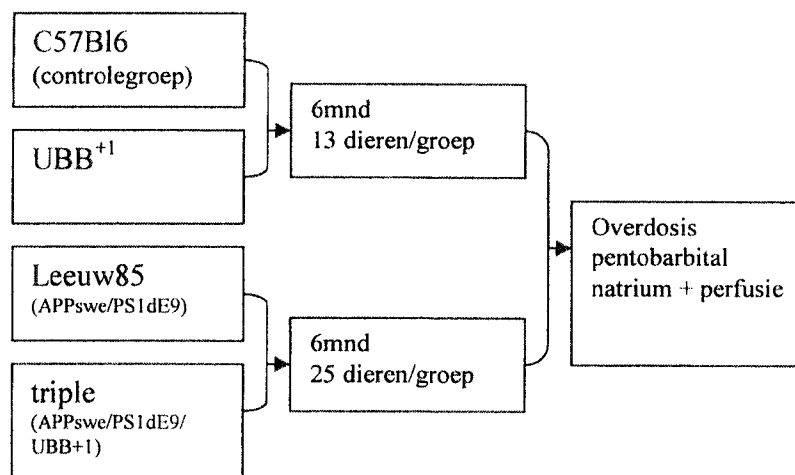
Van de triple en leeuw85 dieren hebben we 25 dieren per groep nodig en van de C57Bl6 en UBB+1 dieren hebben we 13 dieren per groep nodig.

Het totale aantal muizen komt dan op 76 dieren.

	C57Bl6 (control)	UBB+1	APP/PS1	APP/PS1/UBB+1
6 mnd	13	13	25	25

Dierproef

8. Experiment



Hiertoe gebruiken wij de drie muismodellen :

- UBB⁺1 mouse (;
- De leeuw85 lijn (APPSw/PSEN1dE9) en
- De triple transgene muis (UBB⁺1/ APPSw/PSEN1dE9).

Als controlegroep worden C57Bl6 muizen gebruikt. Dit zijn de muizen met een negatief genotype uit de fok.

Postmortem analyse

Het meten van de nivo's van diverse eiwitten betrokken bij de neurotransmissie o.i.v. UBB⁺1 zoals de GABA A receptor, Calbindine 28 K, NPY en somatostatine. Op basis van de studie van Minkeviciene et al (2010) verwachten wij een toename van 20-30% in kleuringsintensiteit.

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

Wijze van termineren: De dieren worden geanestheiseerd met pentobarbital natrium (150mg/kg; intraperitoneaal) en geperfuseerd (zie perfusie SOP).

9b. Pijnbestrijding

Dit is bij eerdere experimenten niet nodig gebleken.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

Tijdens het experiment wordt een ongeriefdagboek bijgehouden. Het is gebleken dat ca. 50% van de APP/PSEN1 en de triple transgene muizen epileptische insulten laten zien als ze circa 7 maanden oud zijn. Als een epileptisch insult wordt geconstateerd, worden de dieren direct getermineerd op DEC-protocol 2010-147. Het is ongeriefscore 5 bij diergroep 2 en 4.

Daarnaast wordt gekeken naar het gedrag, de houding, mobiliteit, verzorgingstoestand en andere opvallende afwijkingen. Hierbij worden de volgende scores gehanteerd: 0=normaal, 1=geringe afwijking, 2=matige afwijking, 3=ernstige afwijking. Bij een score van 3 op een van de onderdelen of bij een gecombineerde score groter dan 3 zal het dier worden geëuthanaseerd. Hierbij zal euthanasie plaats vinden door middel van CO₂/O₂.

10a. Ongerief

aard	ernst	duur	frequentie
i.p. injectie met 150mg/kg natrium pentobarbital + perfusie	4	injectie+inslapen	1x
epileptisch insult	5	getermineerd na constatering	

10b. Welzijnsevaluatie

Er zijn in eerdere experimenten geen extremen gevonden.

11. Verzorging en huisvesting

Muizen kunnen bij elkaar gehuisvest worden. De dieren worden beneden in kamer . het cpv gehuisvest. De perfusies vinden plaats op . In geval van calamiteiten dienen personen op voorblad onder 1 en 4 gewaarschuwd te worden.

12. Deskundigheid

Alle personen hebben de art. 9 of art.12 status en hebben de handelingen beschreven in dit DEC al eerder uitgevoerd.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

De perfusie SOP is bijgevoegd.

Relevante literatuur

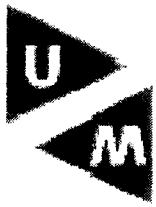
- Van Leeuwen et al., Frameshift mutants of beta amyloid precursor protein and ubiquitin-
B in Alzheimer's and Down patients. Science 279, 242-247, 1998.
- Fischer et al., Long-term proteasome dysfunction in the mouse brain results in Alzheimer-related proteomic changes and in memory deficits, Neurobiol. Aging, 30, 847-863, 2009.
- Dennissen et al., Neurodegenerative Diseases 7, 76-79, 2010.
- Dennissen et al., FEBS Letters, 585, 2568-2574, 2011.
- Minkeviciene et al., Amyloid-Induced Neuronal Hyperexcitability Triggers Progressive Epilepsy, J. Neuroscience 29, 3453-3462, 2009

Attachment

Standard Operation Procedures (SOP): Intracardial perfusion of mice

The mouse is terminally anesthetized with an overdose of pentobarbital sodium ;approximately 150 mg/kg, i.p.). After 3-5 minutes, sedation is confirmed by pinching of the hind feet with a forceps and touching of the eye. If there is a visible pain response or blinking response, pinching and touching of the eye will be repeated periodically until no response can be seen, for up to 20 minutes post-injection.

The sedated mouse is laid dorsal side down, the rib cage is cut open and the heart is exposed. A cut is made in the right atrium and a needle is inserted into the left ventricle of the heart. Via the needle, the mouse is perfused with the following solutions: tyrode buffer followed by 4% paraformaldehyde (PF). After perfusion fixation, the brains are carefully removed and postfixed for 24h at 4⁰C in the same fixative. Afterwards the brains are removed, hemisected in the midagittal line and cut with the vibrotome. Coupes are stored at 4°C in 0.1% sodium azide in PBS to prevent bacteria growth.



University Maastricht

Faculty of Health, Medicine

and Life Sciences

Dierexperimenten Commissie

DEC

Aan:

/voorzitter

p/a Secretariaat DEC-UM

Postbus 616

NL-6200 MD Maastricht

Telefoon:

Uw referentie:

Onze referentie :

Maastricht, 24-11-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Transgene UBB⁺ muizen, PSI/APP muizen en hun kruising: eiwitbepalingen*", is op de DEC vergadering van 18 november 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- 1) De DEC verzoekt de privételefoonnummers van de verantwoordelijke onderzoeker en de vervangend verantwoordelijke onderzoeker, op het voorblad te vermelden.
- 2) De e-mailadressen op het voorblad zijn niet meer juist. De DEC verzoekt deze aan te passen.
- 3) De DEC merkt op dat diverse VHI coderingen op het voorblad niet juist zijn en verzoekt deze aan te passen, te weten: Groep 1 en 3, de code voor bijzondere technieken in code 01/de code voor anesthesie in code 04 en het ongerief in code 01. Groep 2 en 4 de code voor anesthesie in code 04.
- 4) *[De rest van de tekst in deze lijst is illegibel]*
- 5) Punt 7c- De DEC verzoekt een (navolgbare) powerberekening te maken, bij voorkeur op basis van het verwacht verschil en variantie in de te meten parameters.
- 6) Naar aanleiding van het hoge uitvalspercentage verzoekt de DEC het model in de fok te verfijnen of de dieren niet te oud te laten worden. Gaarne de berekening bij punt 7c goed opschrijven en niet naar beneden afronden.
- 7) Bij punt 9c verzoekt de DEC te vermelden dat de ongeriefscore (code 05), voor de groepen 2 en 4 is.
- 8) Bij punt 10a verzoekt de DEC in een tabel, de aard, ernst, duur en frequentie beter te definiëren per handeling en groep, en het totale ongerief aan te geven (het verschil uit de groepen moet naar voren komen en in overeenstemming zijn met het voorblad).

Gelieve eventuele vragen te beantwoorden in een brief en indien noodzakelijk Uw project aan te passen en duidelijk de aanpassingen grijs te markeren.

Uw project staat bij de DEC geregistreerd onder nummer 2011-150, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Aan de DEC UM
Postbus 616
6200 MD Maastricht

Maastricht, 1 december 2011

Betreft 2011-150 (niet aangehouden)

Geachte /secretariaat

Hierbij gelieve u de opmerkingen op de vragen aan te treffen.

Kleine wijzigingen in het DEC (zoals privételefoonnummers, codes, enz) zijn grijs gemarkeerd in de DEC aanvraag en in deze brief met aangepast aangeduid. Op de vragen is onderstaand geantwoord.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- 1) De DEC verzoekt de privételefoonnummers van de verantwoordelijke onderzoeker en de vervangend verantwoordelijke onderzoeker, op het voorblad te vermelden. Aangepast
- 2) De e-mailadressen op het voorblad zijn niet meer juist. De DEC verzoekt deze aan te passen. Aangepast
- 3) De DEC merkt op dat diverse VHI coderingen op het voorblad niet juist zijn en verzoekt deze aan te passen, te weten: Groep 1 en 3, de code voor bijzondere technieken in code 01/de code voor anesthesie in code 04 en het ongerief in code 01. Groep 2 en 4 de code voor anesthesie in code 04.

De codes op het voorblad zijn veranderd, behalve de code voor ongerief in 01 voor groep 1 en 3. Deze dieren krijgen ook een i.p. injectie en worden geperfuseerd, daarom is score 3 gegeven.

4)

Deze persoon is niet de PI, maar voorzitter van de stichting. De naam is verwijderd bij punt 6.

- 5) Punt 7c- De DEC verzoekt een (navolgbare) powerberekening te maken, bij voorkeur op basis van het verwacht verschil en variantie in de te meten parameters.

De berekeningen zijn a.d.h.v. L. Sachs gemaakt:

Berekeningen a.d.h.v. L. Sachs: $n = 2(z_{\alpha/2} - z_{\pi})^2 * (\sigma/\delta)^2$

Hierin $2(z_{\alpha/2} - z_{\pi})^2 = F$. Voor een onbetrouwbaarheid van de toets $\alpha = 0,05$ en een onderscheidingsvermogen (π) 80% is $F_{0,80} = 15,7$

Voor een onbetrouwbaarheid van de toets $\alpha = 0,05$ en een onderscheidingsvermogen van 80% is $F_{0,80} = 15,7$.

We verwachten een toename van 20-30% kleurings intensiteit $\delta = 0.25$.
en standaarddeviatie $\sigma = 0.22$

$$n = F * (0.22/0.25)^2$$

$$n = 12.16$$

Uitvalspercentage triple en leeuw85 muizen: 50%

Uitvalspercentage C57Bl6 en ubb+1: 5%

$$(a-0.05a) = 12.16$$

$$a=12.80 \rightarrow 13 \text{ muizen per groep}$$

$$(a-0.50a) = 12.16 \quad 0.5a = 12.16 \quad a = 24.32$$

- 6) Naar aanleiding van het hoge uitvalspercentage verzoekt de DEC het model in de fok te verfijnen of de dieren niet te oud te laten worden. Gaarne de berekening bij punt 7c goed opschrijven en niet naar beneden afronden.

Daar is geen sprake van bovenmatige epileptische insulten zoals op de UM. Daar staan muizen op leidingwater. Verfijning: normaal drinkwater zou kunnen
Verdere actie: Momenteel geprobeerd om bevroren morula's van deze lijn (Amsterdam) gerevitaliseerd en gehouden op leidingwater (i.p.v. aangezuurd drinkwater). Mocht deze procedure niet slagen dan zullen wij overgaan op het herintroduceren van mannen van het

Afgesproken is dat wij niet doorgaan met de huidige populatie Leeuw 85 maar dat lopende experimenten worden afgerond.

Epileptische insulten treden vooral op als de muizen ongeveer 6-7 maanden oud zijn. De 6 maanden studie wordt z.s.m. afgerond.

- 7) Bij punt 9c verzoekt de DEC te vermelden dat de ongeriefscore (code 05), voor de groepen 2 en 4 is. **Aangepast**
- 8) Bij punt 10a verzoekt de DEC in een tabel, de aard, ernst, duur en frequentie beter te definiëren per handeling en groep, en het totale ongerief aan te geven (het verschil uit de groepen moet naar voren komen en in overeenstemming zijn met het voorblad). **Toegevoegd**

aard	ernst	duur	frequentie
i.p. injectie met 150mg/kg natrium pentobarbital + perfusie	4	injectie+inslapen	1x
epileptisch insult	5	getermineerd na constatering	

Met vriendelijke groet

Aan:

Ons kenmerk Doorkiesnummer Maastricht
20-12-2011

Project: *Transgene UBB⁺ muizen, PSI/APP muizen en hun kruising:*
eiwitbepalingen.

DEC-UM
Voorzitter DEC-UM

p/a secretariaat DEC-UM

Verantwoordelijk onderzoeker (VO):

Secretariaat DEC-UM

Namens de Vergunninghouder van de DEC-UM, delen wij u mede dat
voornoemd project aan de ethische toetsingscriteria voor proefdiergebruik
voldoet.

Bezoekadres

De DEC maakt geen bezwaar tegen uitvoering van dit project zoals
aangevraagd en geeft een positief advies.

Postadres
Postbus 616
6200 MD Maastricht

Projectnummer: 2011-150
Diersoort: muis
Aantal dieren: 76
Einddatum: 20-12-2015

Uw project staat bij de DEC en CPV geregistreerd onder bovenstaand
nummer. Gelieve dieren, die voor dit project bestemd zijn, ook onder dit
nummer aan te vragen.

Voorzitter DEC-UM

Vicevoorzitter DEC-UM