

	Dossier: AVD1150020173414	
		Aanwezig
1	NTS	X
2	Aanvraagformulier	X
3	Projectvoorstel	X
4	Bijlage beschrijving dierproeven	3X
5	DEC-advies	X
6	Ontvangstbevestiging	X
	Evt. Vragen CCD aan aanvrager	Ontbreekt
	Evt. antwoorden aanvrager	X
7	Beschikking en vergunning	X
8	Beoordeling achteraf	X



Format

Niet-technische samenvatting

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

1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Het ontrafelen van de pathobiologie van dementie en de evaluatie van potentiële therapieën; een focus op glia.
1.2 Looptijd van het project	5 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Neuroinflammatie, dementie, neurodegeneratie, veroudering, neuron-glia interacties

2 Categorie van het project

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

3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	<p>Wereldwijd zijn er ongeveer 50 miljoen mensen, die leiden aan dementie. Hun geheugen en denkvermogen zijn aangetast, waardoor ze ernstige problemen hebben met hun dagelijkse activiteiten. Patiënten hebben veel hulp nodig van hun familie en hun verzorgers, en dit heeft een groeiende sociaal-economische impact op de maatschappij. Vooral door de hoge kosten voor de gezondheidszorg en omdat veel mensen door mantelzorgtaken minder kunnen werken. De meest voorkomende vorm van dementie is de ziekte van Alzheimer.</p> <p>De precieze oorzaak van dementie is onbekend. Heel vroeg in het ziekteproces wordt er in de hersenen te veel amyloïd-eiwit gevormd. Dit amyloïd is giftig voor hersencellen. Wij willen onderzoeken hoe de verschillende hersencellen zijn aangedaan. Sinds kort weten we dat niet</p>
---	--

alleen de zenuwcellen, maar ook de gliacellen (steuncellen) belangrijk zijn voor de werking van de hersenen. We weten dat deze cellen reageren op amyloïd, maar hun rol in het ontstaan van dementie is onbekend. Op dit gebied zijn spannende ontwikkelingen gaande, die kansen bieden voor het ontdekken van nieuwe aangrijpingspunten voor medicijnen.

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

Wij verwachten dat ons onderzoek leidt tot meer inzicht in het ontstaan van dementie, en we zullen potentiële nieuwe therapieën testen in muismodellen voor deze ziekte. Dit is wetenschappelijk zeer belangrijk omdat het nog steeds onduidelijk is hoe de dementie nu precies ontstaat. Dit project levert kennis op nodig is om toekomstige nieuwe therapieën te ontwikkelen die potentieel de ziekte kunnen voorkomen, afremmen of genezen.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

Maximaal 10294 muizen.

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

Onder licht ongerief wordt verstaan het injecteren van een muis, een simpele gedragstaak of het doodmaken van een muis. Een klein aantal dieren ondervindt matig ongerief ten gevolge van kleine chirurgische handelingen of gedragstesten. In uitzonderlijke gevallen kunnen complicaties optreden als gevolg van chirurgische ingrepen of repetitieve gedragstesten of ten gevolge van een genetische modificatie in combinatie met handelingen. In een deel van de muizen kan er sprake zijn van ernstig ongerief. Dit kunnen herhaalde gedragstaken zijn met muizen die door een genetische verandering al matig ongerief ondervinden. Daarnaast kunnen de muizen door het genotype last hebben van epilepsie en of kleine hersenbloedinkjes. Bij Alzheimer patiënten komen epilepsie en hersenbloedinkjes ook voor. Onze diermodellen lijken sterk op wat er bij de patiënt gedurende het ziekteproces gebeurt, en dat omvat ook het ongerief.

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

Licht: 51%; matig 41%; ernstig 8%.

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

Dieren worden gedood en hun zenuwweefsel wordt uitgebreid geanalyseerd.

4 Drie V's

4.1 **Vervanging**
Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.

Waar mogelijk zullen we gebruik maken van humaan hersenmateriaal of celkweken. We hebben zeer veel ervaring met deze alternatieven, maar dierproeven blijven noodzakelijk. Het bestuderen van het exacte cellulaire mechanisme dat leidt tot geheugenproblemen, en mogelijk nieuwe therapieën kan alleen in proefdieren. De hersenen zijn zeer complex, daarom is het nog steeds niet mogelijk om dit volledig na te bootsen in een celkweekbakje.

4.2 **Vermindering**

We werken met een minimum aantal dieren, noodzakelijk voor een

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

wetenschappelijk juiste uitvoering van een experiment. Waar mogelijk gebruiken we vervangingsalternatieven zoals humaan hersenmateriaal van Alzheimer patiënten, die hun hersenen hebben gedoneerd na overlijden. Na literatuurstudie voeren we gefaseerde studies uit in experimenten zonder dieren en kleinschalige dierstudies, waarbij we bepalen wat nodig is om wetenschappelijk verantwoorde conclusies te kunnen trekken.

4.3 **Verfijning**

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

Op basis van voorgaand onderzoek binnen onze eigen afdeling en de wetenschappelijke literatuur beschikken wij over uitgebreide kennis van het zenuwstelsel van muizen. Dementie (problemen met leren en geheugen) kan niet onderzocht worden in een celkweekbakje. Muizen zijn zeer geschikt voor onderzoek aan dementie, omdat de processen die leren en geheugen reguleren in de muis sterk overeen komen met die in de mens. Voor genetische experimenten zijn muizen uitermate geschikt. Doormiddel van gedragstaken (zoals leren en geheugen), kunnen we dan bepalen wat de rol van een gen of een molecuul is in dementie en kunnen we de effectiviteit van nieuwe geneesmiddelen op deze processen uittesten.

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

De dieren krijgen kooiverrijking en worden zoveel mogelijk gehuisvest in groepen. Ook houden we de conditie van de dieren iedere dag goed in de gaten en zullen we per dier bekijken of het experiment voortijdig dient te worden beëindigd. Bij operatieve ingrepen zullen de dieren adequate verdooving en pijnstillers krijgen. De experimenten worden uitgevoerd door bevoegd, ervaren en competent personeel.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven

Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in	11500
		<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	UMC Utrecht
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	30244197
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	Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht
		Postbus	80125
		Postcode en plaats	3508TC Utrecht
		IBAN	NL27INGB0000425267
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
		Functie	Hoogleraar
		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	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- | | |
|-----------------------------|--|
| (Titel) Naam en voorletters | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> 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 | 15 - 1 - 2018 |
| Einddatum | 15 - 1 - 2023 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Understanding the pathobiology of Alzheimer's disease and evaluation of potential therapies; a focus on glia.
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Het ontrafelen van de pathobiologie van de ziekte van Alzheimer en de evaluatie van potentiële therapieën; een focus op glia.
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|-------------------------------|
| Naam DEC | DEC Utrecht |
| Postadres | Postbus 85500 3508 GA Utrecht |
| E-mailadres | dec-utrecht@umcutrecht.nl |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1541 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 ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
 - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
 - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
 - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
 - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

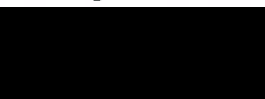
Naam

Functie

Plaats

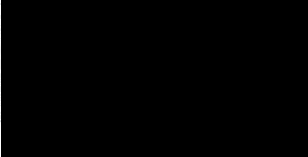
Datum

Handtekening



Utrecht

05-12-2017





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).
- 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.

In 2015 it was estimated that 47.5 million people world-wide live with Alzheimer or other dementias. These people suffer from a deterioration in memory, thinking, behaviour, and the ability to perform everyday activities (=cognitive impairment). The WHO has noted dementia as a global epidemic affecting

the elderly population. Dementia poses not only a physical and psychological burden on patients, families, and caretakers, but has also a growing socioeconomic impact on the society¹⁻³. The main cause of dementia is Alzheimer's disease (AD). The cognitive impairment and dementia in AD is due to a progressive degeneration or death of central nervous system (CNS) cells, i.e. the neurons, glia, and vascular cells. Although adult stem cells are still present in the adult and aged brain, the regenerative potential is limited and the affected CNS cells are not replaced leading to progressive loss of function⁴. Currently, there is no cure to prevent, halt, or reverse dementias.

A main still unanswered question is: *what is causing the cognitive impairment and dementia?*

Over the years, genetic studies have revealed causative genes (amyloid precursor protein (APP), presenilin 1 (PS1) and presenilin 2 (PS2) genes) and genetic risk factors (Apolipoprotein E (ApoE)), but in the majority of AD cases the exact cause of the disease is still unclear⁵⁻⁷. We do know that (1) these mutations lead to an increase production in neurons and aggregation of amyloid- β in the brain parenchyma and the vasculature, (2) aging is the main risk factor, (3) glial cells respond to amyloid- β leading to reactive gliosis and chronic neuroinflammation, (4) synapses lose their function, and eventually (5) CNS cells die (neurodegeneration). However, it is still unknown, which of these processes are causing dementia. Understanding the exact molecular, cellular, and physiological mechanisms underlying cognitive impairment and dementia is crucial for the development of novel effective future therapies.

The degree of cognitive impairment in AD correlates with synapse loss, glia activation, and vascular problems. Accumulating evidence points towards **a central role for glia**, i.e. the astrocytes and microglia, in cognitive impairment as (1) astrocytic processes are an intricate part of the synapse and cover the blood vessels with their endfeet, (2) both microglia and astrocytes are involved in synaptic pruning (=removal of synapses), (3) apolipoprotein E (ApoE), the main genetic risk factor of AD, is mainly expressed by glia, and (4) there is strong evidence that glia regulate neuronal communication⁸⁻¹¹. Astrocytes buffer extracellular potassium, recycle glutamate, and regulate water balance. Moreover, astrocytes are actively involved in the modulation of neuronal signalling. These cells, together with neurons, form the tripartite synapse^{12,13}. Exciting new evidence shows that microglia are also involved in synaptic plasticity, and mediate early synapse loss in neurodegenerative diseases by excessive, complement-mediated pruning^{14,15}. Taken together, cognitive impairment and dementia is likely caused by a change in the interplay between glia and neurons. Our studies show that the increase in reactive microglia and astrocytes is directly correlated to plaque load in an AD mouse model¹⁶. Furthermore, we have shown that in old AD mice the microglia and astrocytes are immune-activated (neuroinflammation) and express genes that are involved in synaptic pruning, such as complement factors, and immunoproteasome subunits^{17,18}. Glia are also the neural stem cells of the CNS (neurogenic glia). Therefore targeting glia could prevent or reverse AD by inhibiting neuroinflammation, but could also contribute to brain repair by activating neurogenesis.

AD is neuropathologically characterized by the accumulation of extracellular deposits of amyloid- β (plaques), the accumulation of intraneuronal hyperphosphorylated tau (tangles), and reactive gliosis. The causative genes (APP, PS1 and PS2) all lead to an increased production of the aggregation prone amyloid- β . A mutation in tau has never been found in AD, and now it is generally accepted that an early increase in amyloid- β , either by an increased production or a decreased degradation, starts a cascade of events leading to neuronal tau accumulation and reactive gliosis. In over 95% of all AD cases the disease is not due to mutations in the causative genes, in these cases it is likely that AD is started by a decrease in the degradation of amyloid- β . Therapies directed at inhibiting the production or increasing the degradation of amyloid- β , are so far not successful as these therapies lead to many side-effects, such as an increase in inflammation or interference of growth-factor and Notch-signalling. Therefore, shifting focus to glia-directed therapies is a novel approach which might contribute to develop effective therapies to prevent or reverse dementia. We have studied the role of the proteasome, a major enzymatic complex involved in degradation of protein aggregates, and we observed an activation of this system mainly in glia. In subsequent experiments, in which we determined a genome-wide expression analysis of microglia and astrocytes from AD mice, we found that glia are immune activated and that the genes involved in synaptic communication were down-regulated. Currently, there is an increasing interest in the role of glia in neuronal communication and brain disease, including AD. This is due to new insights in glia biology. Some of the genetic risk factors involved in AD corroborate the notion that glia are implicated in dementia as they are highly expressed in glia, such as ApoE, clusterin, and TREM2. Advanced bioinformatics of gene expression networks in late onset dementia post mortem brain identified novel genes including the microglia genes TYROBP, TREM2B and CD33, which can be crucially involved in

synapse pruning.

There is an urgent need for a cure for cognitive impairment and dementia in AD, as there is no effective therapy yet. To identify critical pathways that can be targeted for therapy, fundamental knowledge on the processes that lead to functional changes in neural circuits leading to cognitive impairment and dementia is essential. We envision that targeting glia could be beneficial from several angles. It could help to prevent synaptic dysfunction by preventing pruning and by keeping the microenvironment in an optimal condition to support neurons. In addition, as glia are the stem cells of the CNS, stimulating these cells to produce new neurons and glia could help the brain to self-repair. Studying the role of glia in cognitive impairment and dementia in AD is a relative new field of research³¹, and attracts a lot of attention lately as novel functions of glia (tri-partite synapse, pruning, stem cells, neurovascular regulation) became apparent over the last years^{8,10,32,33}.

Our approach is to focus on glia in AD. For many years AD research was neuro-centred. Novel insights in glia biology and glia-neuron interactions and the finding that many genetic risk factors are glial-genes now induce a shift in the field. Over the years a vast amount of knowledge has been gathered concerning neuropathological changes, biochemical changes (APP processing), and MRI imaging. This strategy has not led to a cure. Opinion makers in the AD research field now indicate that is essential to focus on the cellular processes. Our strategy is fully focussed on the cellular approach, by studying molecular changes in glia, by studying functional changes in glia and neuron-glia interactions, and by imaging molecular and cellular changes in the living mice. This novel strategy will reveal novel cellular targets that potentially could yield novel therapies to intervene with the dementia process.

3.2 Purpose

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

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

The overall goal of this project is to understand the molecular, cellular, and physiological processes underlying cognitive impairment and to evaluate potential therapies, in order to gain fundamental insight in the AD disease process and to identify novel potential biomarkers and therapeutic targets. In this project we focus on the role of glia in these processes.

The research questions we want to answer in relation to cognitive impairment and dementia in AD are:

1. What are the molecular changes in glia at the epigenome, transcriptome, proteome, and metabolome level?
2. What are the consequences of these changes for e.g. neuron-glia communication, neurovascular unit, neural circuit activity, synaptic plasticity, glia functioning, and behaviour?
3. Can we prevent, reverse, or halt the neurodegeneration and cognitive impairment by targeting glia (reactive and neurogenic glia)?
4. Can we image (neuronal, glial, and vascular) pathology with MRI/PET/SPECT scan and can we follow the reverse of pathology by novel drugs or biologicals in living mice?

We have already performed transcriptome and proteome analyses^{18,24} on AD mouse brains, and these studies will be the basis for research question 3 and 4. However, these omics analyses have either been performed on whole brain homogenates, synaptosomes, or in AD mouse of 15-18 months-of age. To also study the changes early in the disease process, and in different cell types we will extend the omics analyses. The earlier experiments showed an immune activation of the glia in AD mice, therefore we will target the glia (pharmacologically and genetically) to answer research question 3 and 4.

Since 1998 we have studied Alzheimer disease using different mouse models and human brain tissue¹⁶⁻²⁶. We have ample experience with molecular, cellular, neuropathological, and behavioural studies in AD mouse models. In addition, we are experts in the biology of glia in relation to brain diseases^{8,27-30}. The group has a long-term international track record in neurodegeneration and glia research, which is illustrated by over 100 publications in peer reviewed journals and the ongoing support of several international funding agencies (NWO, ZonMW, International Society for Alzheimer Research, Michael J Fox foundation, HFSP).

3.3 Relevance

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

Scientific relevance: What is the cause of cognitive impairment eventually leading to dementia is a major unresolved question. Answering this question is crucial to develop effective therapies to prevent, halt, or reverse dementia. The AD research field has shown over the years that the neuron-centric focus, is not sufficient to fully understand the cascade of events leading to dementia. Synaptic dysfunction is the most relevant, early neurobiological substrate of cognitive impairment and dementia. An emerging concept is that the synapse dysfunction is not a cell autonomous process of the aggregated Amyloid- β proteins on merely neurons, but also stems from malfunction of the synaptic microenvironment comprising astrocytes and microglia. Some of the genetic risk factors involved in AD corroborate the notion that glia are implicated in dementia as they are highly expressed in glia.

Societal relevance: When growing older, people are often confronted with mild cognitive impairments. These may progress into dementia, as observed in AD. Dementia affects many people and their families. Currently, 1 in 3 people aged 85 years or over suffer from dementia. According to a recent report from the World Health Organization, a new dementia patient emerges every 4 seconds in the world. Elderly have a very high chance of getting the disease, thus due to the aging society dementia is becoming a global epidemic. Unfortunately, despite years of intensive research, it is still not possible to stop or cure AD. The World Health Organization thus calls dementia rightly "a public health priority". Developing an effective medicine is extremely important for current patients and their relatives, but also for all of us. Because everybody can get this disease. In 2015 the number of dementia patients was estimated to 47.5 million, and this will mount up to 135 million in 2050. In 2010 the total estimated worldwide costs of dementia were US\$ 604 billion. These costs are driven mainly by social care needs and health care costs. The informal care provided by families, friends and the community is essential, and leads to more and more people cutting back on working hours ¹⁻³.

3.4 Research strategy

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

In this project we determine molecular, cellular, and physiological pathways that are involved in the cognitive impairment and dementia in AD, and we will test novel therapeutic strategies to prevent, reverse or stop the cognitive impairment. Typically, the strategy we use consists of four steps that logically follow each other and progress from model (AD and glia-targeted mouse models), to target (candidate molecular, cellular, and physiological pathway identification), to function and intervention (validation in the AD mouse model, and translational to the clinic), finally leading to more fundamental insight in the disease pathogenesis, and revealing novel biomarkers and targets for treatment.

Our strategy (see figure 1) is based on starting with established AD mouse models and glia-targeted mouse models (genetically modified mice: **step 1**). By using these models we can follow Amyloid- β induced pathology in mouse models carrying different AD mutations in the APP and PS1 genes (APP/PS1, APP23, Tg-SwDI). In addition, we will use mouse models in which specific genes can be targeted in glia to visualize the glia (e.g. GFAP-eGFP or CXCR1-eGFP), or to specifically over-express or knockdown genes in a controlled fashion in glia (e.g. GFAP-CreERT2 or CXCR1-CreERT2).

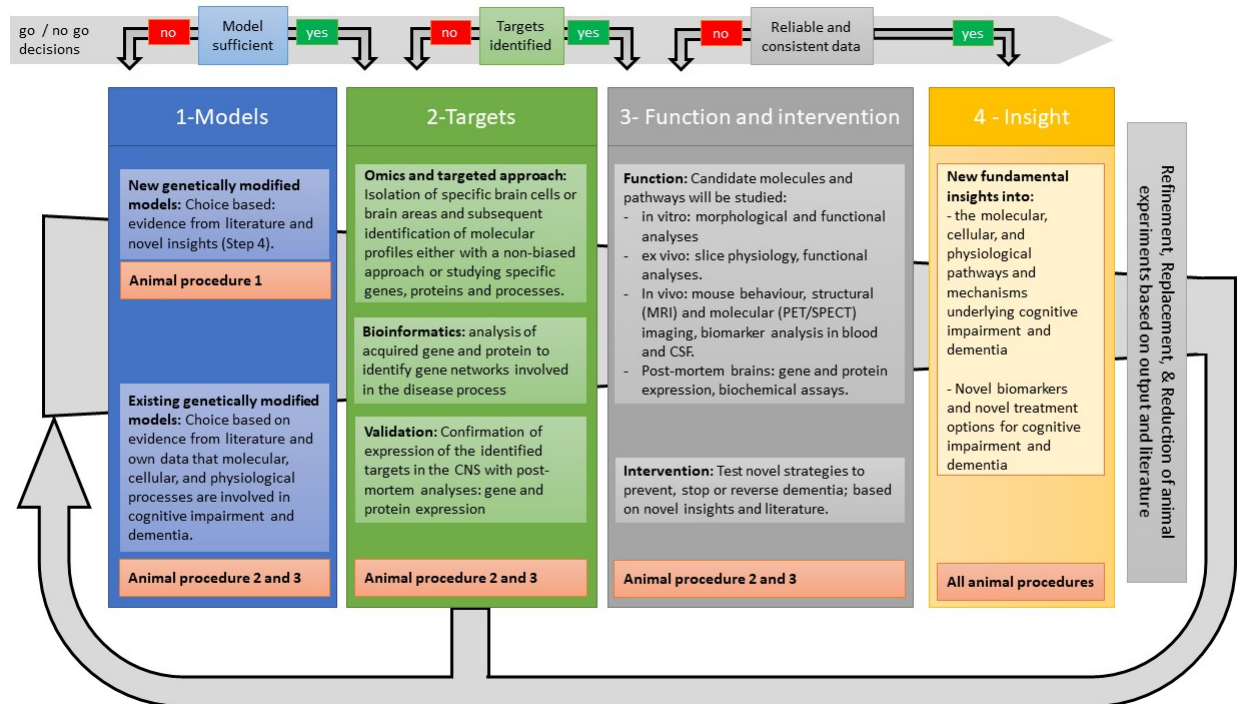


Figure 1. Overview of the project's strategy. The project's strategy is part of a continuous effort of our group and collaborators to understand the glia-specific molecular, cellular, and physiological processes underlying cognitive impairment and dementia in Alzheimer's disease. Animal procedures involved are indicated.

In **step 2** we identify candidate molecules and pathways in glia that are important in the AD disease process; two of such candidates are currently already studied in step 3 (GFAP and vimentin). For each target candidate a decision is made whether or not the candidate should be studied in the next step (either by overexpression and down-regulation by viral vectors (**step 3**), or by importing an existing genetically modified mouse model (**step 1**). The decision to make a novel genetically modified mouse model will only be taken after testing the gene *in vitro* (**step 3**) to obtain sufficient insight (**step 4**) to decide to make a new mouse model (**step 1**). Typically, the strategy we use consists of three steps that logically follow each other and progress from model (mouse models for AD), to target (candidate molecular, cellular, and physiological pathway identification) to function and intervention (validation in the Alzheimer mouse model, and translational to the clinic), and insight. Primary candidate selection is in part based on the expression in post-mortem mouse and human brain tissue from the Netherlands Brain Bank and from profiling studies on (fluorescently labelled) glial cells from tissues from AD mouse models.

To reveal the effect of an intervention of a candidate molecule or pathway (selected from **step 2**, or based on earlier studies or literature) we will start with regulating the expression levels of the target molecules by knocking-down and overexpressing genes with viral vectors (expression vectors, shRNAs) or by pharmacological compounds in glia (**step 3**). If our data is consistently showing that this approach is e.g. not sufficiently precise or inefficiently targeting all glia in the brain areas important for cognition (cortex and/or hippocampus) (**step 4**), we will make novel genetically-modified glia-targeted mouse models (**step 1**). In **step 3** we will determine the functional consequences of an intervention (*in vitro* and *ex vivo* functional analysis (electrophysiology, glial cell activity), *in vivo* SPECT/PET/MRI imaging, mouse behaviour, and post-mortem histological analysis and we will translate the findings to patients (biomarker analysis and validation in human post-mortem brains of Alzheimer patients and non-demented controls).

The insight (**step 4**) in the glia-focussed molecular, cellular, and physiological pathways and mechanisms underlying cognitive impairment and dementia in AD will be applied to further uncover the potential of the targets and the pathways for therapy or as biomarkers for the disease progression. If needed, new existing mouse models will be acquired from collaborators or from service suppliers and novel genetically-modified glia-targeted animal models will be made (**step 1**).

Findings from our studies are not only relevant for AD patients, but also for other patients suffering from non-AD cognitive impairment and dementia. It is likely that general molecular, cellular, and physiological

pathways underlie a broad range of dementia-inducing diseases, such as stroke or traumatic brain injury. In figure 1 go/no go points are indicated. All steps in figure 1 will converge in knowledge in **step 4** (insight). Our approach will reveal mechanisms of cognitive impairment, that can be either AD specific or of general value for different types of dementia. This knowledge will crucially contribute to the identification of novel targets to treat patients with cognitive impairment and dementia.

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.

Step 1 - Models:

Animal procedure 2 and 3

We will use existing genetically-modified mouse models for AD, and for targeting glia. The choice of the mouse model is based on our previous findings or the findings of others, and we aim for mouse models with a clear reactive gliosis induced by amyloid- β . Mouse models with overexpression of mutant amyloid precursor proteins (APP) are well-established models for amyloid- β -induced glia activation and cognitive impairment (APP/PS1, APP23, Tg-SwDI). In this project we will investigate cognitive impairment induced by an amyloid- β -triggered reactive gliosis and synaptic dysfunction. In line with this, the APP mouse models deliver high amyloid- β load in the mouse brain, thereby mimicking the amyloid- β exposure in the human AD brain. We are aware that the available AD mouse models never fully mimic the disease pathogenesis as is seen in AD patients. However, these models are well suited and well-established to study specific molecular, cellular, and physiological pathways that underlie part of the AD pathogenesis.

We have chosen for mouse models, as we have extensive experience with mice and there is a wealth of (genetic) information available. If required we will use genetically-modified mice with cell type specific and inducible transgene expression or gene knock-down or gene reactivation, which will contribute to the refinement of experiments. The relevant existing mouse lines are either already in house or will be imported and further bred in our facility. An important step in finding disease relevant molecular, cellular, and physiological processes is to be able to visualize or isolate specific subset of glial cells. This can be done by highlighting these cell populations by cell specific expression of fluorescent proteins or proteins interfering with cellular processes. When we have identified novel genes or pathways (from our own studies (step 2 and 3) or from literature) which are involved in cognitive decline and dementia, or can be applied as tool to study cognitive decline and dementia, or can be applied for more precise gene expression, we will import new mouse lines from established animal facilities (JAX or MMRC) or collaborating colleagues. Mouse models with a known discomfort will be closely monitored.

Animal procedure 1

In case genetically-modified mouse lines are not available through collaborators and established animal facilities (JAX or MMRC), we will generate new mouse lines (with standard techniques or with the novel Crispr/Cas9 technology) to study the identified novel genes or pathways (from our own studies (step 2 and 3) or from literature) which are involved in cognitive decline and dementia in AD pathogenesis, or can be applied as tool to study cognitive decline and dementia, or can be applied for more precise gene expression. This also includes the crossing of genetically modified AD mouse models, with mouse models expressing fluorescent proteins or reporter proteins in glia to study glia function, and with mouse models in which specific genes are knocked-out or overexpressed in the CNS or specifically in glia to interfere with glia function, such as the GFAP^{-/-}/VIM^{-/-} which is a model for attenuated reactive gliosis. A welfare assessment will be performed on the novel mouse models, a daily check as described in the Directive 2010/63/EU: corrigendum of 24 Jan 2013 will be performed, and mice will be killed when a hampered phenotype becomes apparent and is not part of the desired disease phenotype.

Step 2 – Targets:

Animal procedure 2

To unravel the molecular and cellular pathways in glia underlying cognitive impairment and cognition we will isolate the glial cells at different ages during the AD disease process from AD mouse models (from **step 1**) with fluorescent or magnetic activated cell sorting (FACS or MACS), based on specific membrane proteins or on the expression of fluorescent proteins driven by glia-specific promoters. The glial cells will be analysed by omic approaches (e.g. epigenomics, transcriptomics, proteomics, metabolomics). This step provides insight into how cells change during the AD pathogenesis. The obtained results will be coupled to the observed functional changes (*in vitro*, *ex vivo*, and *in vivo*, see **step 3**).

As described in section 3.4.3 and in figure 1, following each step, decisions will be made regarding which cells, molecules, or functional read-outs to focus on in subsequent steps of the strategy. Profiling the glial cells will yield a large number of possible candidates, but by using the decision criteria described below (3.4.3) and our previous experience with selecting candidates from molecular screens we aim to select up to 50 candidates for expression pattern analysis. Following the identification of candidate molecules from purified cells or from literature, we will apply different techniques (e.g. immunohistochemistry, in situ hybridization, Western blotting, cell sorting) to investigate the precise distribution and expression levels of these molecules in embryonic, postnatal, adult, and aged brain tissue of wild-type and AD mice. This allows us to identify the exact role of these molecules during development and aging, and the potential change of expression during AD. Knowing the role during development can help to identify targets to reverse the degenerative process leading to cognitive impairment and dementia, as in a young brain there is ongoing neurogenesis and plasticity. To translate our data to patients we will include a similar analysis on human CNS tissue obtained from the Netherlands Brain Bank, which is donated to the brain bank for research. Using our decision strategy (3.4.3), we aim to select up to 20 candidate molecules for biochemical and in vitro analysis. This number is, in our experience, feasible to process in a period of 5 years.

Step 3 - Function and Intervention:

Animal procedure 2 and 3

To get more insight in the functional changes that are the consequences of molecular changes in the glial cells, or that are the consequences of intervention strategies, we will perform *in vitro*, *ex vivo*, *in vivo*, and *post-mortem* analyses. This approach enables us to get a full understanding of the disease process; the role of specific brain areas, molecules and cells in this process; a complete analysis of the effectiveness and side-effects of the intervention strategies; and a translation to the actual patients. Whenever possible we prefer to study molecular processes in *ex vivo* and *in vitro* models preparations as this will prevent suffering from the animals. These approaches contribute to the 3R's.

Animal procedure 2

In vitro: We have different biochemical, electrophysiological, and tissue culture assays to determine whether, and if so how, glia-targeted molecules affect CNS cell function, CNS cell morphology, CNS cell death, CNS network formation, and additional parameters. These assays will be performed after e.g. addition of proteins, small molecules, cerebrospinal fluid, or serum to cultured CNS cells or organotypic cultures (e.g. brain slices) or overexpression or knockdown of candidates by plasmid and viral vectors. It is important to test this under different circumstances because it is known that molecules that induce or prevent AD-related neurodegeneration or stimulate regeneration have different functions in distinct CNS cell-types and distinct parts of the brain at different time points. Therefore we need to perform these assays in tissue culture experiments using cells and brain tissue derived from different brain regions at different time points. For these applications we need to culture CNS cells and tissue derived from mouse embryos, pups, or from adult and aged mice (2-24 month-old).

Animal procedure 2

Ex vivo: Brain slices and specific CNS cells of mice will be acutely isolated from the AD-glia mouse models at different time points (embryos, pups, or from adult and aged mice (2-24 month-old)). Several molecular, morphological, biochemical, and functional assays will be performed to get an insight in the molecular changes and functional consequences of specific manipulations in the CNS tissue without in vitro culturing. Although culturing is essential to manipulate cells with specific tools (see *in vitro*), it is also crucial to get insight in the molecular and functional processes at very specific ages of the animals and after acute addition of potential therapeutic substances or blockers and activators of cellular pathways without inducing additional changes due to culturing. The assays that will be performed are e.g. electrophysiology, calcium imaging, optogenetic, or chemogenetic stimulation of cells, analyses of activity of enzymes (e.g. the proteasome and several kinases and phosphatases).

Animal procedure 3

In vivo: To determine how specific molecular pathways and potential therapeutics from step 2 affect mouse behaviour and the cognitive impairment/dementia disease process during a mouse life we will need to perform several *in vivo* experiments on the mouse models from step 1. Candidates identified from step 2, earlier work (GFAP/Vimentin knockdown), or from literature (e.g. minocycline which might reduce microglia activation) with relevant glial cell expression patterns and functionally validated using biochemical and tissue culture (*in vitro* and *ex vivo*) approaches will be further studied *in vivo* by using genetically modified mouse models (knockout, knockin, overexpression), by inducing overexpression or knockdown using in utero electroporation (in embryo's) and/or by injection of viral vectors (in pups or

adult or aged mice). To test the effects of these manipulations two main read-out parameters are used in parallel: anatomical and functional tests. Using our decision strategy (3.4.3), we aim to select up to 5 candidate molecular pathways for detailed *in vivo* analysis from step 2 in the next 5 years. This number is based on available infrastructure and previous experience. To get insight in the structural and functional changes in the brains of adult to aged mice (2-24 months) and to translate our finding to the clinic we will perform MRI structural and functional MRI imaging. For instance, we will perform a CO₂ challenge to analyse the function of neurovascular unit, which consists of endothelial cells, pericytes, and astrocytes. SPECT and PET imaging is required to study pathology (e.g. plaques with PIB and glia activation with TSPO tracers). Both approaches are being applied in clinical studies, and are needed to analyse the effectiveness of therapies targeted at Amyloid- β and glial pathology. To couple the pathology (either analysed in *post-mortem* brain tissue or analysed *in vivo* with MRI/PET/SPECT imaging) to a functional outcome (relevant for patients) it is essential to perform several behavioural tests in 2-24 month mice. These tests will reveal the basal cognitive and physiological status of the mice of step 1 and will give insight in the functional outcome of the targeted molecules and pathways or novel therapeutic approaches (from step 2 or the literature). Functional behavioural tests include, amongst others, rotarod, home cage analysis, fear conditioning, Morris water maze, grip test, open field, elevated plus maze and object/social recognition tasks. Interventions include small molecules, proteins, biologicals (e.g. antibodies, nanobodies), viral vectors (e.g. rhodopsins/DREADSS for optogenetic/chemogenetic stimulation of cells). To couple the pathology (either analysed in *post-mortem* brain tissue or analysed *in vivo* with MRI/PET/SPECT imaging) to a biomarker that can identify the disease progression (relevant for patients) it is essential to draw blood and CSF from the 2-24 month old mice to analyse the levels of e.g. amyloid- β or GFAP (and other biomarkers that are being used to determine the molecular pathways involved in dementia in patients) or the to determine the pharmacological profiles of the small molecules and proteins.

Post-mortem: From all mice that were studied in functional tests we will dissect the brain to evaluate how the MRI/SPECT/PET images concur with the actual neuropathology. In addition, this tissue can also be used to validate new targets (from step 2). By collecting and storing all brain tissue we contribute to the 3R principle as this will decrease the number of mice needed for step 2. To get insight in the neuropathological status and changes of the mouse brains we will evaluate the morphology of CNS cells and brain areas, the number of specific CNS cell types, changes in RNA and proteins by *in situ* hybridisation and quantitative PCRs, immunocytochemistry and Western blotting, etc.

Step 4 – Insight:

Animal procedure 1, 2, and 3

Steps 1-3 and animal procedure 2-3 all lead to more insight in the molecular, cellular, and physiological pathways underlying neuron-glia dysfunction, cognitive impairment, and dementia in AD. In addition, our experiments will give new leads for therapeutic targets and biomarkers to follow the disease progression. Based on our results and combined with knowledge from literature and obtained from international colleagues, we will generate new models (step 1 and animal procedure 1) focussed on specific pathways to further determine the role of these pathways in disease. We will take the 3R's into account, and wherever possible will perform our experiment on human brain tissue or cell-based assays (reduction / replacement), and will perform our experiments on a mouse model that closely mimics specific parts of the disease (reduction, refinement).

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.

To achieve our aims we make use of a four-step strategy. The coherence of the different components is described in 3.4.2 and are depicted in the flow chart in figure 1. The selection points are indicated in the flow charts. Here we will provide more information on the selection strategy and coherence.

Step 1 Models: We will work with well-established genetic mouse models for AD (see <http://www.alzforum.org/research-models>). We have extensive experience with the APP/PS1 model, which is a valid model for amyloid- β induced reactive gliosis and cognitive decline. The APP/PS1 mouse lacks amyloid- β deposits in the vasculature, which is a common neuropathological feature in AD patients, and leads to reactive gliosis in astrocytes enwrapping the vasculature. Therefore, we will also include AD mouse models with reported amyloid- β deposits in the vasculature (Cerebral Amyloid Angiopathy (CAA) models), such as the well-established Tg-SwDI and APP23 mice. In addition we will work with mouse models, to study in particular, but not only, the glial cells. These models include models to genetically target CNS cells, (gfap-CRE and CXCR1-CRE lines, GFAP/VIM^{-/-}, etc); models to intervene with cell

functions (for opto- and chemogenetics etc); models to visualize CNS cells (gfap-GFP, ROSA-tdTomato, etc); models to study neuron-glia network activation (genetically encoded calcium indicators such as GCaMPs). These mice can either be crossed with AD mice or to induce the expression of a specific gene the AD mice will receive an injection with a viral vector. The choice of the mouse model will be based on the experimental design in step 2 and 3. For instance, if we need to visualize the glial cells we will cross the AD mice with mice expressing a fluorescent protein in the glial cells. And if we need to measure the calcium response, we will cross AD mice with mice expressing GCaMPs in glia.

Step 2 Targets: The AD-induced changes in molecular pathways will be studied in isolated glial cells. We will identify genes, cells, and pathways involved in cognitive impairment and dementia in AD pathogenesis using gene/protein profiling from human and mouse tissues and specific cell populations. Step 2 includes bioinformatic analyses of acquired gene and protein datasets in combination with published data to identify gene networks involved in the dementia disease process and confirmation of the expression of identified genes and proteins in relevant brain regions and neural cells. The selection criteria of the genes and pathways for further analysis will be based on: the fold-change in expression between control and AD; the statistical significance of this fold-change; the relevance for the disease (based on literature and from data on human brain tissue); and whether the pathway or molecule is involved in a glia-specific process.

Step 3 Function and intervention: To understand the functional consequences of reactive glia and glia-specific molecular pathways we will study tissue culture assays and acute slices to characterize the functional role of identified candidate targets (from step 2 or from our earlier work and literature) *in vitro* and *ex vivo*. We will also intervene with reactive gliosis by crossing the Alzheimer mouse models with genetic models with attenuated reactive gliosis (e.g. GFAP^{-/-}/VIM^{-/-}) or by genetically (viral vectors) or pharmacologically (small molecules, biologicals) suppressing reactive gliosis. In addition, we will induce amyloid- β deposits in the vasculature of AD mice with a diet (such as a diet with low levels of folate, vitamins B6 and B12 and enriched with methionine to induce hyperhomocysteinemia), to mimic the amyloid- β vasculature deposits in AD patients. The functional consequences of reactive gliosis and the effectiveness of the interventions will be studied with (*in vitro* / *ex vivo*) electrophysiology, optogenetics, calcium imaging, and neuron-glia interactions at the morphological level and with (*in vivo*) mouse behaviour, structural and molecular imaging, morphological and CSF analysis.

Step 4 Insight: The experiments and subsequent data will reveal novel fundamental insight in the molecular, cellular, and physiological processes underlying cognitive decline and dementia and in the effectiveness of potential therapies in rodent models. This insight will be used for further in depth analysis of specific molecules or pathways. These molecular and pathways will be selected based on our data, data from literature, validation in the human AD tissue, availability of mouse models and tools.

For all steps, decisions will be made regarding which molecules, genes, cells, or pathway to focus on. These decisions will be based on data acquired in previous steps, e.g. on expression patterns or function *in vitro* and *ex vivo*, a close examination of available literature and databases (e.g. mouse and human brain atlas and expression databases), knowledge from previous experiments by us or our collaborators, or the reliability and consistency of the obtained data. The amount of available literature and preliminary data will differ for each candidate. Therefore, if needed pilot experiments (n=3) will be conducted to support the decision for a particular molecule, gene, cell, or pathway. We always combine research on AD mouse models with studies on human brain tissue obtained from the Netherlands Brain Bank and neuropathology departments. This ensures translation to the actual patients. To interfere with molecular, cellular, and physiological processes and to study the relation to cognition animal studies are essential. By including clinical relevant outcome measures (MRI/PET/SPECT scanning and biomarker analyses on body fluids) we contribute to the translation to the actual patients.

1. Alzheimer's Association. 2017 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* **13**, 325–373 (2017).
2. World Health Organization. The epidemiology and impact of dementia - current state and future trends. (2015).
3. World Health Organization & Alzheimer's Disease International. *Dementia a public health priority.* (World Health Organization ; Alzheimer's Disease International, 2012).
4. van den Berge, S. A. *et al.* The proliferative capacity of the subventricular zone is maintained in the parkinsonian brain. *Brain J. Neurol.* **134**, 3249–3263 (2011).
5. Menzies, F. M. *et al.* Autophagy and Neurodegeneration: Pathogenic Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Neuron* **93**, 1015–1034 (2017).

6. Rosenberg, R. N., Lambracht-Washington, D., Yu, G. & Xia, W. Genomics of Alzheimer Disease: A Review. *JAMA Neurol.* **73**, 867–874 (2016).
7. Singleton, A. & Hardy, J. The Evolution of Genetics: Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *Neuron* **90**, 1154–1163 (2016).
8. Pekny, M. *et al.* Astrocytes: a central element in neurological diseases. *Acta Neuropathol* **131**, 323–345 (2016).
9. Osborn, L. M., Kamphuis, W., Wadman, W. J. & Hol, E. M. Astrogliosis: An integral player in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* **144**, 121–141 (2016).
10. Heneka, M. T., Golenbock, D. T. & Latz, E. Innate immunity in Alzheimer's disease. *Nat. Immunol.* **16**, 229–236 (2015).
11. Parpura, V. *et al.* Glial cells in (patho)physiology. *J. Neurochem.* **121**, 4–27 (2012).
12. Araque, A. *et al.* Gliotransmitters Travel in Time and Space. *Neuron* **81**, 728–739 (2014).
13. Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P. & Haydon, P. G. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* **22**, 208–215 (1999).
14. Dudvarski Stankovic, N., Teodorczyk, M., Ploen, R., Zipp, F. & Schmidt, M. H. H. Microglia–blood vessel interactions: a double-edged sword in brain pathologies. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **131**, 347–363 (2016).
15. Hart, A. D., Wyttenbach, A., Hugh Perry, V. & Teeling, J. L. Age related changes in microglial phenotype vary between CNS regions: Grey versus white matter differences. *Brain. Behav. Immun.* **26**, 754–765 (2012).
16. Kamphuis, W., Orre, M., Kooijman, L., Dahmen, M. & Hol, E. M. Differential cell proliferation in the cortex of the APP^{swePS1dE9} Alzheimer's disease mouse model. *Glia* **60**, 615–629 (2012).
17. Orre, M. *et al.* Reactive glia show increased immunoproteasome activity in Alzheimer's disease. *Brain* **136**, 1415–1431 (2013).
18. Orre, M. *et al.* Isolation of glia from Alzheimer's mice reveals inflammation and dysfunction. *Neurobiol. Aging* **35**, 2746–2760 (2014).
19. Hol, E. M. *et al.* Neuronal expression of GFAP in patients with Alzheimer pathology and identification of novel GFAP splice forms. *Mol. Psychiatry* **8**, 786–796 (2003).
20. Hol, E. M., van Leeuwen, F. W. & Fischer, D. F. The proteasome in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: lessons from ubiquitin B+1. *Trends MolMed* **11**, 488–495 (2005).
21. de, P. R. *et al.* Accumulation of aberrant ubiquitin induces aggregate formation and cell death in polyglutamine diseases. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 1803–1813 (2004).
22. Fischer, D. F. *et al.* Disease-specific accumulation of mutant ubiquitin as a marker for proteasomal dysfunction in the brain. *FASEB J* **17**, 2014–2024 (2003).
23. van Leeuwen, F. W. *et al.* Frameshift mutants of beta amyloid precursor protein and ubiquitin-B in Alzheimer's and Down patients. *Science* **279**, 242–247 (1998).
24. Vegh, M. J. *et al.* Reducing hippocampal extracellular matrix reverses early memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Acta NeuropatholCommun* **2**, 76 (2014).
25. Kamphuis, W. *et al.* Glial fibrillary acidic protein isoform expression in plaque related astrogliosis in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **35**, 492–510 (2014).
26. Kamphuis, W. *et al.* GFAP and vimentin deficiency alters gene expression in astrocytes and microglia in wild-type mice and changes the transcriptional response of reactive glia in mouse model for Alzheimer's disease: GFAP and Vimentin in Alzheimer's Disease. *Glia* **63**, 1036–1056 (2015).
27. Middeldorp, J., van den Berge, S. A., Aronica, E., Speijer, D. & Hol, E. M. Specific human astrocyte subtype revealed by affinity purified GFAP antibody; unpurified serum cross-reacts with neurofilament-L in Alzheimer. *PLoS One* **4**, e7663 (2009).
28. Middeldorp, J. *et al.* Intermediate filament transcription in astrocytes is repressed by proteasome inhibition. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **23**, 2710–2726 (2009).
29. Middeldorp, J. & Hol, E. M. GFAP in health and disease. *Prog. Neurobiol.* **93**, 421–443 (2011).
30. Hol, E. M. & Pekny, M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Curr Opin Cell Biol* **32**, 121–130 (2015).
31. De Strooper, B. & Karran, E. The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. *Cell* **164**, 603–615 (2016).
32. Chung, W.-S., Welsh, C. A., Barres, B. A. & Stevens, B. Do glia drive synaptic and cognitive impairment in disease? *Nat. Neurosci.* **18**, 1539–1545 (2015).
33. Li, H. & Chen, G. In Vivo Reprogramming for CNS Repair: Regenerating Neurons from Endogenous Glial Cells. *Neuron* **91**, 728–738 (2016).

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	Generation of genetic mouse models for studying the role of glia in cognitive impairment and dementia, and maintenance of colonies of genetically modified mice, including breeding with discomfort.
2	Amyloid-triggered glia response and its role in cognitive impairment and dementia: Molecular analyses, functional consequences, and test novel strategies to prevent, stop or reverse dementia - <i>Ex vivo</i> and <i>in vitro</i> .
3	Amyloid-triggered glia response and its role in cognitive impairment and dementia: Molecular analyses, functional consequences, and test novel strategies to prevent, stop or reverse dementia – <i>In vivo</i> .
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	11500	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht	
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	Type of animal procedure
	1	Generation of genetic mouse models for studying the role of glia in cognitive impairment and dementia, and maintenance of colonies of genetically modified mice, including breeding with discomfort.

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.

Mouse models for Alzheimer's disease (AD) are instrumental in providing insight in the molecular, cellular, and physiological pathways underlying cognitive impairment and dementia. Our research is focussed on glia, which form the bridge between neurons and the vasculature, therefore we also will use mouse models to visualize and target glial cells, neurons, and the vasculature, and to allow purification of specific groups of brain cells from brain tissue. We will work with three types of models (or a combination thereof): (1) disease models, (2) models to target CNS cells: to visualize or to induce cell-type specific gene expression, and (3) functional models: to intervene with the function and to study the function of CNS cells.

This procedure is focussed on making new genetic models and on maintenance of colonies of genetically modified mice with inherent discomfort. The new models are either made by crossing existing models (maximally 3 AD mouse models (e.g. APP/PS1, APP23 or Tg-SwDI) times 8 different crossings (e.g. AD x Astrocyte-Cre / AD x microglia-Cre / AD x astrocyte-Cre x Floxed-GCaMP / AD x astrocyte-Cre x Floxed-rhodopsin / AD x astrocyte-fluorescent protein / AD x microglia-fluorescent protein / AD x astrocyte-Cre x Floxed-fluorescent protein / AD x microglia-Cre x Floxed-fluorescent protein) = 24) or by generation of novel genetically modified models, based on a selection of maximally 5 genes from our omics study (see project proposal: step 2, figure 1). We will use a combination of the models to study the pathobiology of cognitive impairment and dementia in AD. The choice for a specific model or combination of models is depending on the exact research question and the molecular and functional read out. The details of the experimental approach will be described in the work protocols and will be discussed with the IvD and

colleagues in the field.

Modification of the genetic code of mice is an important tool to identify and characterize mechanisms underlying cognitive impairment and dementia, in relation to the function of glia in AD. Before generating a new genetically modified mouse (GMM) line, *in vitro* and *post-mortem* expression studies will be performed to establish the significance of the gene/molecule for neuron-glia-vasculature interactions. Also, literature will be studied intensively and databases will be used to validate our choice. The combination of all this information together with our knowledge (and knowledge of collaborators) will determine whether we will generate a new GMM. This is a general strategy (by us and colleagues in the field) to decide whether the generation of a new GMM is required.

Generation of GMMs will occur via DNA/RNA injection into oocytes or injection of genetically modified mouse embryonic stem cells into mouse blastocysts. The genetic modification of mouse embryonic stem cells will be performed by classical recombination or via the CRISPR/Cas9 system. Also, inducible mouse lines (knock-in/-out) can be created via genetic or pharmacological intervention, for example systemic injection with tamoxifen. In addition, crosses between mice carrying a floxed allele and Cre-expression mouse lines can lead to the generation of conditional null-mutant mice or specific expression of genes in subtypes of CNS cells. As a consequence of this advanced breeding procedure mice will only have a gene deletion or expression of a specific protein in a particular CNS cell type.

Welfare assessment of the novel mouse models will be performed according to the guidelines of the new EU directive. New GMMs will be monitored for 2 generations to determine the absence or presence of mice with a hampered phenotype (breeding with discomfort). For the maintenance of colonies with discomfort, animals will be monitored and if applicable, humane end points will be specified and followed.

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

A. Generation of transgenic mice:

1. Superovulation: Gonadotropins will be administered (2 times) by subcutaneous or intraperitoneal injections followed by mating. Pregnant females will be killed for the isolation of early embryos (usually two/four cell stage). Pregnant females will be killed by euthanasia followed by transcardiac perfusion, or by cervical dislocation, or by CO₂/O₂ suffocation.
2. Embryonic stem cells will be used for classical recombination or CRISPR/CAS9 system.
3. Embryo recipients: Recipients for embryo transfer will be rendered pseudo-pregnant by mating with a sterile (vasectomized) male (age 2 until 6 months). The genetically modified embryos will be implanted surgically into the reproductive tract. The embryo recipients will be killed after weaning of the pups at 3-4 weeks of age (not as part of an experiment).
4. Crossing of existing GMMs (e.g. mice with glial Cre expression, mice with glia fluorescent protein expression, floxed-STOP-GCAMPs, floxed-STOP-rhodopsins) and novel GMMs with Alzheimer GMMs (APP/PS1, APP23 or Tg-SwDI).

B. Welfare assessment:

Every day the mice will be examined on several parameters (overall appearance, size, weight and growth, coat condition, behaviour, clinical signs, relative size and numbers of the litter) as has been described in the Directive 2010/63/EU: corrigendum of 24 Jan. 2013. When in the models a humane endpoint is reached, the mice will be killed. We will apply several different strategies to reduce the number and discomfort of animals that are killed as part of breeding: (1) Animals that are bred but not used for an experiment will be genotyped before 3-4 weeks of age. Animals of incorrect genotype will be euthanized as soon as possible making possible discomfort as short as possible. (2) Breeding will be performed by a highly experienced 'breeding coordinator' who will ensure that breedings are set up in such a way that they will yield the number of animals needed for the experiments (except for Mendelian exceptions). (3) Mice with specific genotypes will be shared by multiple researchers in the lab, which avoids parallel breeding and optimizes use of animals thereby reducing animal number. (4) For most experiments we will use male and female mice. Most of our breedings will be heterozygous breedings because the wild-type mice that result from these breedings are genetically different from wild-type mice that can be obtained from companies as Charles River or Janvier, and these wild-type littermates are the proper controls (as they have the same genetic background). The generated GMMs will be used at

different developmental stages. From embryonic until aged stages. For example, experiments in which we need primary cultures will be performed at embryonic stages till P15, while behavioural studies and MRI/PET/SPECT imaging will be performed in young adults up to aged mice (2-24 months).

C. Breeding with discomfort:

Current lines and novel lines will be monitored on general parameters (overall appearance, size, weight and growth, coat condition, behaviour, clinical signs, relative size and numbers of the litter as has been described in the Directive 2010/63/EU: corrigendum of 24 Jan. 2013) and on the specified humane endpoints specific for that line.

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

Statistical analysis does not play a role for the generation and maintenance of genetic modified colonies, as no groups will be compared. We will use state of the art techniques that are proven to be effective in generating genetically modified mice with a minimum number of mice possible.

For the number of GGMs needed for experiments the statistical evaluation is described in procedure 2 and 3.

B. The animals

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

For this procedure we will use mice (*Mus musculus*), which are either genetically modified or wild-type adult mice. All vasectomized males will be obtained from a registered and licensed commercial company. All other mice will be derived from our own breeding facility, an establishment licensed by the NVWA, a registered commercial company, or a collaborating laboratory.

Generation of GMMs: we expect, based on our experience over the last 10 years, to generate max. 5 new lines over the next 5 years. For the creation of a new GMM-line we will use on average max. 150 mice (according to the Besluit Biotechnologie). These 150 animals consist of 40 donor females (age 6 weeks – 4 months, due to the cycles there is a 1:4 chance to get eggs from the mouse) to generate enough eggs for the manipulation. These are transferred back into foster females (age 6 weeks – 4 months). First these foster females are put in breeding with vasectomized men (8 animals, operated at week 5-6 and can be used up to 1 year) to generate a false pregnancy. However, as not all of these foster mothers will get a false pregnancy and not all will accept the embryo, we need around 30 foster mice. These will produce off spring with chimeric animals (6 foster mothers will fulfil the pregnancy giving 6 pups F1 = 36 pups). The chimeric mice are put in breeding (6 chimeric mice with 6 pups F2 = 36 pups) to generate founder animals. As we will generate a max of 5 new genetic lines a total max. 750 mice are needed.

Breeding with discomfort: the breeding of AD mice that express the human APP gene is associated with discomfort due to spontaneous death. It has been described that spontaneous epileptic seizures may be the cause of this premature death that occurs in about 15% of the mice. The death is independent of age and sex, and occurs without any clear physiological warning. This is classified as moderate discomfort. We have 1 Alzheimer line (APP/PS1) already in the lab and we expect to import 2 new lines (APP23 and Tg-SwDI) in the next 5 years. All of these lines express hAPP and are likely to succumb to premature death in about 15% of the mice. These mouse lines will be crossed with other GMMs as mentioned in A and with wild-type mice. We expect that per AD mouse line (3 lines) and crosses of these mouse lines (24 crosses) max 10 litters per year will be born with 6 pups in a litter. Of these animals 15% will develop discomfort due to the hAPP gene = 9 (mice per line, per year) * 5 = 45 (per line in 5 years) * 27 (3 AD lines and 24 crosses, with discomfort expected) = maximally 1215 mice in 5 years.

Therefore in total max. 750 (generation of genetic modified) +1215 (breeding with discomfort) = 1965 mice are needed.

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.

Litters from breeding with discomfort will be used in experiments described in procedure 2 and 3.

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:

A large part of the studies in our research group is being performed in human post-mortem brain tissue of AD patients, and we are preparing cell models based on induced pluripotent cells. However, animal studies are still needed as we seek comprehensive knowledge and understanding on the molecular, cellular, and physiological mechanisms underlying cognitive impairment and dementia in AD. For these studies we need to combine molecular data with a functional and behavioural read-out.

Reduction:

We have selected well established GMMs that closely mimic the AD disease process leading to cognitive impairment and dementia, and that are based on genes implicated in the disease. In addition, we make use of established mouse models to target glia-specific expression. This approach contributes to robust and reproducible results. Before we start to generate a novel GMMS, based on our omics approach (see step 2, figure 1), we will first perform *in silico* and *in vitro* experiments to gain a sufficient rationale to make the new mouse model. We will always combine research on mouse models with studies on human brain tissue obtained from the Netherlands Brain Bank and neuropathology departments. This ensures translation to the actual patients and minimises the use of animals, wherever possible.

Refinement:

Animal experiments will be performed by skilled and experienced staff. New people in the lab that are licensed to work with animals will be trained by the experienced staff members before they can start working with animals. Animals will be closely monitored and any sign of discomfort will be taken care of. The researchers working with the animals fully understand the impact of welfare on the scientific outcomes.

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

The animals will be taken care of by skilled and experienced staff. All possibilities to reduce pain, fear or suffering will be used. There are no negative environmental effects; all mice will be housed under strict D1 conditions. To reduce discomfort due to the genetic mutation we will, if possible: limit the lifespan of animals, house the mice in groups (social housing) and apply heterozygous breeding.

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.

For surgical procedures, anaesthetics will be applied. Pre- and post-surgery the mice will be given systemic pain relief agents. In addition, antibiotics may be used to prevent infection. The anaesthetics, analgesics, and antibiotics used will be appropriate for mice.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Of the newly generated mouse models we can only predict based on the modified gene whether we expect an adverse effect on the welfare of the animals. Mice with a genetic modification (e.g. of a glia molecule) can display discomfort regarding the genetic alterations, such as abnormal synaptic functions or aberrant homeostatic functions. Therefore, genetic modification of glial molecules or other molecules related to glia-neuron-vasculature interactions may result in discomfort that forms the basis of AD. However, this disease is multifaceted and therefore the modification of a single gene is not likely to cause the full disease phenotype. Many of our research questions are fundamental, therefore it is hard to predict possible discomfort. In addition, unexpected discomfort may arise with these kinds of experiments. We will therefore monitor the animals closely to ensure that the discomfort is limited as

much as possible. To further minimize discomfort we aim to use heterozygous mice for breeding of the AD mouse lines, unless another strategy will lead to a reduction in the use of animals.

Explain why these effects may emerge.

These effects may emerge due to the gene that we have modified. Mice carrying a genetically modified gene implicated in glia-neuron communication may display discomfort due to e.g. abnormal synaptic functioning or neurovascular interactions.

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

We will monitor our mice daily; action will be taken immediately if unexpected adverse effects are detected. Discomfort and pain in these animals will be closely monitored, and when a humane endpoint (balanced against the scientific endpoint) has been reached we will kill the animal.

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.

We will monitor for clinical signs and pathophysiological changes. In balance with the scientific endpoint, we will decide what the humane endpoints are. If a gene is mutated that has been implicated in Alzheimer's disease, the humane endpoints are those clinical signs and pathophysiological changes that are not observed in the human patients with a mutation in the same gene. Animals in pain and distress with signs not mimicking the disease will be killed. If the clinical signs and pathophysiological changes fit the disease that we aim to mimic, then we will reduce pain and distress in these animals by giving analgesics appropriate for mice and by giving optimal care (e.g. warming pads and soft chow).

Indicate the likely incidence.

We expect that a maximum of 25% of the total number animals used for starting new GMMs and breeding with discomfort may display mild to moderate discomfort.

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').

Mild (donors of new GMMs): 30%

Moderate (vasectomized males for new GMMs and mice from breeding with discomfort): 70%

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.

The donor females will be killed as part of the experiment. The vasectomized males will be killed after a false pregnancy was generated in all foster females. The foster females will be killed after the experiment (at weaning of the pups). The foster females cannot be used for additional experiments/surgeries due to their previous surgery.

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).
- 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'.	11500	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht	
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	Type of animal procedure
	2	Amyloid-triggered glia response and its role in cognitive impairment and dementia: Molecular analyses, functional consequences, and test novel strategies to prevent, stop or reverse dementia - <i>Ex vivo</i> and <i>in vitro</i> .

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.

Curative treatments for Alzheimer's disease (AD) are lacking. There is a persisting urgent need for drugs to treat AD, which calls for re-examination of AD disease mechanisms. The recent new view on the involvement of neuron-glia-vasculature interactions in neurodegeneration promises to advance our understanding and will potentially deliver new treatments for AD. The aim of this procedure is to determine the fundamental, molecular, and cellular mechanisms that underlie cognitive impairment and dementia, with a focus on neuron-glia interactions that lead to changes in synapses, the neurovascular unit, and cognition. This knowledge is essential to identify changes in neuron-glia-vasculature processes that are key in the development of cognitive impairment and dementia.

Early in AD pathogenesis the build-up of amyloid- β elicits a cascade of events, starting with synaptopathy and reactive gliosis, followed by neuronal network changes characterized by cognitive impairment, and eventually leading to neurodegeneration and dementia. Amyloid- β has been shown to activate microglia and astrocytes and recent findings point towards astrocytes and microglia as major mediators of the loss of synapses and vascular changes in AD pathogenesis.

We hypothesize that the Amyloid- β -induced activation of glia triggers a loss of their neuron-supportive phenotype and leads to synaptic pruning and cognitive impairment. We anticipate that these changes are the first step in a multi-step process towards dementia. The overall aim of this project is therefore to elucidate the molecular mechanisms that underlie the glia-mediated changes in synapse function and loss that become manifest in AD.

More specifically, in this procedure we will:

Identify novel targets:

Determine amyloid- β induced molecular changes, by omics approaches (proteomics, RNAseq analysis, epigenomics, metabolomics) in the synapse and glial cells at different stages of the disease in the AD mouse brain, and in AD mice with attenuated gliosis.

For this approach adult AD mice, mice with attenuated reactive gliosis, and controls will be killed at several timepoints during the disease process. Brain tissue and brain cells (with FACS and MACS) will be harvested and biochemical and molecular analyses (ELISA, FACS, MACS, transcriptomics, proteomics, metabolomics, epigenomics, qPCR, Westernblot, RNA/ DNA/ Protein extraction) will be performed to test for whole-genome and proteome changes, and to validate and quantify the changes.

Determine functional consequences of AD pathology:

Determine functional changes induced by amyloid- β and reactive gliosis at the cellular level (in vitro, ex vivo) at different AD disease stages.

In order to identify molecules and pathways that affect neuron-glia communication at the synapse and at the vasculature, and to understand the function of these pathways prior to *in vivo* studies, molecular screens and bioassays will be performed *in vitro* and *ex vivo* using for example primary cell cultures and acute brain slices obtained from mice (pre- and post-natal, and adult stages) that are either genetically modified or wild-type. The cells and tissues obtained from the mice will be used for:

- a) Imaging and electrophysiology using primary cells, acute slices or organotypic cultures to test for e.g. changes in cell morphology, network formation cell division, cell migration and motility, viability, differentiation, synapse functions, calcium signalling, and neural circuit function.
- b) Manipulation of the cells (e.g. through viral- or plasmid-driven gene expression, pharmacological agents, light (optogenetics), drugs (e.g. CNO for chemogenetics), electrical activation (e.g. Long term potentiation as a model for memory processes) and subsequent analysis using the above mentioned techniques (e.g. immunocytochemistry, qPCR, calcium imaging, electrophysiology).
- c) Immunohistochemistry, immunocytochemistry, 3D-imaging of solvent cleared organs, or *in situ* hybridization staining, to test for the changes in localization of the expression of specific genes and proteins.

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

For the *in vitro* and *ex vivo* experiments genetically modified AD and glia mouse models will be used.

- a) Embryos: pregnant mothers will be killed. Embryos will be quickly taken from the uterus, will be put on ice water, and will be killed and where relevant transcardially perfused. Brains and other tissues will be harvested for tissue culture or other *ex vivo* purposes.
- b) Pups: Pups will be killed where relevant followed by transcardiac perfusion. Brains and other tissues will be harvested for tissue culture or other *ex vivo* purposes.
- c) Young to aged adults: animals will be killed, where relevant followed by transcardiac perfusion. Brain and other tissues will be harvested for tissue culture or other *ex vivo* purposes.
- d) In some cases the mice will get one stereotactic injection in a specific brain regions with a viral vector expressing e.g. a DREADD, rhodopsin, GCaMPs, or a fluorescent protein including anaesthesia (frequency: maximum 1x, duration: maximum 1 day). These mice will be killed within one month after injection where relevant followed by transcardiac perfusion. Brain and other tissues will be harvested for tissue culture or other *ex vivo* purposes.

Tissues that will be harvested include, but are not limited to: brain, meninges, peripheral nerve, spinal cord, blood vessels, skin, blood and cerebrospinal fluid.

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

The number of animals is based on our large experience of the past decade. For instance, for experiments that require primary cell cultures, biochemical analysis, or immunohistochemical analysis, the number of animals is depending on the total number of cells that can be harvested from the desired brain region. Some brain areas are large and provide large numbers of cells that can be divided over several experiments, whereas other brain areas, such as the hippocampus are much smaller and the cells

from more than one brain need to be pooled for one experiment. Experimental design will further dictate the number of mice needed.

B. The animals

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

Male and female mice will be obtained from our own breeding colonies, licensed academic breeders, or from a commercial licensed breeder. Our work considers pre- and postnatal stages from young pups to aged animals (from P0 to 24 months). In each working protocol, we will specify the ages that will be used. We will also use mice of the models described in procedure 1.

General overview of life stages:

- For primary cultures (dissociated and organotypic) embryos and pups between E14 and P16 will be used. Tissues will be harvested after the embryos and pups are killed followed in some cases by transcardiac perfusion. Manipulation of the cells (via for instance viral- or plasmid-driven gene expression, pharmacological agents) in vitro will be performed. Subsequent analysis will be performed using the above mentioned techniques (Part A, including immunocytochemistry, calcium imaging, and electrophysiology).
- Young and aged adults between 1 and 24 months of age: the mice will be directly killed for the analyses. The mice will be killed where relevant followed by transcardiac perfusion and tissues will be harvested for acute brain slices, immunocytochemistry, neuropathological analysis, acute isolation of cells with MACS or FACS, electrophysiology, or other purposes.

Estimated numbers:

The estimate of the total number of animals is primarily based on our experience over the past 5 years. In general, an estimate for the total number of mice (*mus musculus*, from E14 until 24-months-old mice) is 3000. In our project proposal we describe our strategy to select candidate molecules and pathways for our studies. The number of selected candidates and the specific assays we plan to use determine the total of animals used. From our previous experiments we can calculate that for the experiments described in this procedure we will need a maximum of 600 animals per year (which is 3000 in 5 years). Of these animals, approximately 25% is embryonic (=375) and postnatal (=375) and 75% (=2250) is young and aged adults.

Maximally 50% of the adult mice (=1125) will be AD mice with the expression of hAPP which causes moderate discomfort in 15% of the mice (=169), which is due to the expression of hAPP (see procedure 1). As these mice with the moderate discomfort will suddenly die, we therefore will need for the coming 5 years a maximum of $3000 + 169 = 3169$ mice. For specific experiments, we will use specific calculations, some examples of which are outlined below.

Examples of calculations of animals per experiment:

In vitro primary cell culture to select targets: An adult mother that is time-bred gives us the opportunity to harvest animals at all embryonic ages and early postnatal ages. The pups will be taken out of nest for culturing (where possible to minimize stress for the mother at least one pup will stay in the nest with the mother). Per pup approximately 200.000 hippocampal neurons and glia can be harvested. For an in vitro assay we need 3 cultures/wells per condition. If we have 5 conditions (control + 4 concentration of tested compound) this adds up to 15 wells. For a neurite outgrowth assay approximately 50.000 neurons and glia are seeded per well. For this total experiment we will need $50.000 * 15 = 750.000$ neurons. $750.000 / 200.000 = \sim 4$ animals P0-P2 pups. A normal nest contains ± 6 pups. We aim to select up to 20 candidate molecules for biochemical and in vitro analysis. For this specific experiment we will use $20 \times 4 = 80$ pups for the selection of the targets.

Electrophysiology: An adult mouse brain yields 10 useable hippocampal slices and in general 3 useable recordings can be taken per day. For plasticity measurements a minimum of 15 cells are needed and therefore a total of 5 animals per group. A surplus of 3 animals will be requested for initial pilots to ensure the efficient use of sacrificed animals.

Glial cell sorting by FACS: Based on power calculation, for the -omics analyses we will study $n=6$ mice per condition. The power calculation is based on our previous studies on the APP/PS1 and APP/PS1xGV-/-

mice. We expect a molecular difference of 40% between groups. With a standard deviation between 30% and 40%, a 5% type I error and 80% power we need 6-12 mice per group. This is in line with the experience we have with the variation observed in measurements and biology in these mice.

In all experiments we will include males and females, as so far we have never encountered a sex-specific difference in reactive gliosis.

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.

Some mice will be obtained from our own breeding with discomfort described in animal procedure 1.

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:

A large part of the studies in our research group is being performed in human post-mortem brain tissue of Alzheimer patients, and we are preparing cell models based on induced pluripotent cells. However, animal studies are still needed as we seek comprehensive knowledge and understanding on the molecular, cellular, and physiological mechanisms underlying cognitive impairment and dementia in Alzheimer's disease. For these studies we need to combine molecular data with a functional read-out. For most of our proposed animal experiments there are no replacements available, i.e. at this moment there is no cell line alternative to measure network activity or neuron-glia communication in the hippocampus.

Reduction:

We have selected well established genetic mouse models that closely mimic the Alzheimer disease process leading to cognitive impairment and dementia, and that are based on genes implicated in the disease. In addition, we make use of established mouse models to target glia-specific expression. This approach contributes to robust and reproducible results. We will always combine research on mouse models with studies on human brain tissue obtained from the Netherlands Brain Bank and neuropathology departments. This ensures translation to the actual patients and minimises the use of animals, wherever possible. We will make optimal use of each animal killed by harvesting the maximum amount of tissue from different organs and if needed body fluids. Where possible, nests of mice will be shared between researchers to decrease "breeding surplus" animals. On basis of explorative work and our experience, we will perform statistical analyses to determine the minimal number of animals needed per experiment to obtain data which are of significance for understanding cognitive impairment and dementia. To reduce inter- and intra-assay variability we will only use well-established reagents and protocols during the in vitro procedures and anatomical analyses. Optimization and standardization of experiments remains the route to achieve good standards of practice.

Refinement:

Animal experiments will be performed by skilled and experienced staff. New people in the lab that are licensed to work with animals will be trained by the experienced staff members before they can start working with animals. Animals will be closely monitored and any sign of discomfort will be taken care of. For the experiments on pups, we will always ensure that one pup stays with the mother to reduce stress. The researchers working with the animals fully understand the impact of welfare on the scientific outcomes.

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

The animals will be taken care of by skilled and experienced staff. All possibilities to reduce pain, fear or suffering will be used. There are no negative environmental effects; all mice will be housed under strict

D1 conditions. To reduce discomfort due to the genetic mutation we will, if possible: limit the lifespan of animals, house the mice in groups (social housing) and apply heterozygous breeding. We will check the animals daily on several parameters (overall appearance, size, weight and growth, coat condition, behaviour, clinical signs) as has been described in the Directive 2010/63/EU: corrigendum of 24 Jan. 2013. In addition, humane endpoints will be described for specific experiments in the work protocols.

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.

For surgical procedures, anaesthetics will be applied. Pre- and post-surgery the mice will be given systemic pain relief agents. In addition, antibiotics may be used to prevent infection. The anaesthetics, analgesics, and antibiotics used will be appropriate for mice.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Very rarely, surgical methods described in this procedure might cause complications resulting in discomfort for the animal (from experience less than 1%). If careful monitoring and pain relief measures will not lead to the recovery of animal discomfort we will termination the mice.

The AD mouse models that overexpress hAPP are known for the occurrence of sudden death in 15% of the mice.

Explain why these effects may emerge.

- Although extremely rare, any surgical procedure will involve a risk of discomfort.

- In mouse models with overexpression of hAPP (Alzheimer mouse models) epileptic events and sudden deaths have been reported. The cause may be the transgene, but the exact cause is unknown. It cannot be predicted which mouse will suffer from this discomfort, therefore these mouse lines will be closely monitored.

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

The mentioned procedures have been performed in the lab for several years and there is expertise to ensure that the incidence of complications is minimal. Post-operative monitoring of animals will be done carefully with proper welfare diaries. In case of complications, careful monitoring of animal behaviour such as lack of voluntary movement, piloerection, or recovery of eating behaviour after surgery will be evaluated and if found abnormal will be considered for humane endpoints without causing further distress to the animal.

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.

We will monitor for clinical signs and pathophysiological changes. If a gene is manipulated that has been implicated in a disease, the humane endpoints are those clinical signs and pathophysiological changes that are not observed in the human patient with a mutation in the same gene. Animals in pain and distress with signs not mimicking the disease will be killed. If the clinical signs and pathophysiological changes fit the disease that we aim to mimic, then we will reduce pain and distress in these animals by giving analgesics appropriate for mice and by giving optimal care (e.g. warming pads and soft chow).

In the case of surgery, the humane endpoint is when the weight of the animal is decreasing over 15% in 2 days (by checking their weight on a daily basis) and 20% in body-weight within 7 days (by checking their weight on a weekly basis). In case of surgery, if the wound healing is incomplete and causing suffering to the animal a humane endpoint is reached. Also, when post-operative mice show abnormal overall appearance (piloerection), decreased/increased size/growth development which is not part of their expected phenotype, (de)hydration, changes in colour (skin, eyes, mucous membranes) and (stereotype)behaviour these will be considered humane endpoints and the animals will be killed.

Indicate the likely incidence.

The procedures are well known in the department. Therefore we expect that for maximum 20% of the animals, that will undergo surgery, a humane endpoint will be reached.

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').

- Animals may experience mild discomfort during all of the *in vitro* and *ex vivo* procedures described in A.
- In a small percentage 5% of the cases animals will undergo moderate procedures. In our case these reflect the surgeries with viral injections where animals experience discomfort due to anaesthesia and the recovery of the surgery.

- Mice from a breeding with discomfort will be used. The breeding of AD mouse models that express the hAPP gene is associated with incidental moderate discomfort (in 15% of the AD mice) due to spontaneous death. It has been described that spontaneous epileptic seizures may be the cause of this premature death.

Mild 87%

Moderate 7% (AD) and 5% (viral injection)

Severe 1% (animals that will undergo surgery (viral injection) and reach a humane endpoint)

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 the collection of the tissue necessary for experiments.

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.

The embryos will be placed on ice water and then decapitated and the pups (up to 3 weeks of age) will be decapitated directly. For these ages, cervical dislocation is not possible because the rodents are really small. All other rodents will be killed according to Annex IV of Directive 2010/63/EU.

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).
- 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'.	11500	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht	
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	Type of animal procedure
	3	Amyloid-triggered glia response and its role in cognitive impairment and dementia: Molecular analyses, functional consequences, and test novel strategies to prevent, stop or reverse dementia – <i>In vivo</i> .

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.

Curative treatments for Alzheimer's disease (AD) are lacking. There is a persisting urgent need for drugs to treat AD, which calls for re-examination of AD disease mechanisms. The recent new view on the involvement of neuron-glia-vasculature interactions in neurodegeneration promises to advance our understanding and will potentially deliver new treatments for AD. The aim of this procedure is to determine the fundamental, molecular, and cellular mechanisms that underlie cognitive impairment and dementia, with a focus on neuron-glia interactions that lead to changes in synapses, the neurovascular unit, and cognition. This knowledge is essential to identify changes in neuron-glia-vasculature processes that are key in the development of cognitive impairment and dementia.

Early in AD pathogenesis the build-up of amyloid- β elicits a cascade of events, starting with synaptopathy and reactive gliosis, followed by neuronal network changes characterized by cognitive impairment, and eventually leading to neurodegeneration and dementia. Amyloid- β has been shown to activate microglia and astrocytes and recent findings point towards astrocytes and microglia as major mediators of the loss of synapses and vascular changes in AD pathogenesis.

We hypothesize that the Amyloid- β -induced activation of glia triggers a loss of their neuron-supportive phenotype and leads to synaptic pruning and cognitive impairment. We anticipate that these changes are the first step in a multi-step process towards dementia. The overall aim of this project is therefore to elucidate the molecular mechanisms that underlie the glia-mediated changes in synapse function and loss that become manifest in AD.

More specifically, in this procedure we will:

Determine functional consequences of AD pathology:

Determine functional changes induced by amyloid- β and reactive gliosis at the organism level (in vivo) at different AD disease stages.

Determine functional consequences of interventions:

Determine whether intervention in glia-targeted pathways or in amyloid- β deposition (selected from the target screen, literature, or from own or collaborators unpublished information) can prevent reactive gliosis leading to a rescue in changes in cognitive impairment (in vivo), in neuron-glia communication (in vitro, ex vivo) or in pathology (in vivo imaging and post-mortem analysis) in AD mice.

In order to identify molecules and pathways that affect neuron-glia communication at the synapse and at the vasculature, and to understand the function of these pathways prior to *in vivo* studies, molecular screens and bioassays will be performed *in vitro* and *ex vivo* (see procedure 2).

If sufficient information on molecules and pathways that affect neuron-glia interaction is available from earlier studies and/or literature we will determine the functional consequences *in vivo* in genetically modified AD mouse models, in some cases we will additionally give the mouse a diet to induce vascular amyloid- β deposits. AD genetic mouse models will be subjected to a variety of interventions to modulate cognition and monitor the molecular, cellular, and functional responses. The interventions will be performed in adult mice (2-24 month-old), and the effect of the interventions will be followed at specific time points after the start of the interventions. If an intervention seems successful, the effect of the intervention will be followed in time using behaviour, translational, and post-mortem analyses. These interventions/techniques include: Injection of pharmacological agents (therapeutic compounds, inhibitors and activators of molecular pathways, chemicals to induce transgene expression etc.), biomolecules (DNA, antibodies etc.), or viral particles for delivery of genetic material. The mice will be used for:

- a) Behavioural analyses: the mouse models for AD, with or without intervention will be tested for their cognitive function. Also the general health status of the mice will be monitored.
- b) Translational analyses: the mouse models for AD, with or without intervention will be tested for structural and functional brain changes with MRI and functional MRI. In addition, blood and CSF will be drawn at several time points to evaluate e.g. clinically relevant biomarkers or concentrations of therapeutic agents. Molecular changes in the brains of these mice will be evaluated with SPECT and PET imaging with tracers for e.g. glia activation (e.g. neuroinflammation by the translocator protein (TSPO) tracer) and neuropathology (e.g. amyloid by the PIB tracer).
- c) Upon termination of the experiment, animals will be killed according to Annex IV of directive 2010/63/EU and tissues will be harvested for further analysis, including immunocytochemistry, quantitative PCR, 3D-imaging of solvent cleared organs, or in situ hybridization staining, to test for the changes in localization of the expression of specific genes and proteins, and to test for functional changes *ex vivo* (e.g. electrophysiology, calcium imaging).

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

For the *in vivo* and *post-mortem* experiments genetically modified AD and glia mouse models will be used.

a) Intervention: To visualize or interfere with biological processes, such e.g. synaptic transmission and reactive gliosis, substances will be applied to the mouse continuously or intermittently. Substances will include DNA (e.g. plasmids, linear DNA fragments, nucleotides) to enable expression of proteins, or RNA (e.g. shRNA, microRNA), pharmacological agents (therapeutic compounds, inhibitors and activators of molecular pathways, small molecules, chemicals to induce transgene expression etc.), or biomolecules (DNA, antibodies etc.). Further, we plan to use viruses ((combinations) of AAV, HSV1, CaVs, lentiviruses and Rabies viruses) or dyes to target and/or visualize neuropathological processes and cellular networks. Application of substances to the adult mice will be achieved via one of the following listed methods. If required anaesthesia and post-operative analgesia will be provided to the animal. The frequency and duration of these interventions are very difficult to assess at this moment, but will be detailed further in work protocols. However, here we describe the maximum frequency and duration of the planned

interventions:

1. In diet or drinking water (frequency: constant, duration: maximum 1 year).
2. Subcutaneous injection (frequency: 2x per day, duration: max 14 days or 2x per month, duration max 1 year).
3. Intraperitoneal injection (frequency: 2x per day, duration: max 14 days or 2x per month, duration max 1 year).
4. Oral application (frequency: 2x per day, duration: max 14 days or 2x per month, duration max 1 year).
5. Intra cerebro-ventricular injection (frequency: once, duration: maximum 1 day).
6. Stereotactic injection in specific brain regions including anaesthesia (frequency: maximum 2x, duration: maximum 1 day). Stereotactic surgeries are (very rarely) performed twice in an animal due to the need of replacing a cannula. Injections of compound through cannula is daily).
7. Subcutaneous implantation of a slow release pump (frequency: once, duration: max 1 year).

b) Behavioural analyses: Functional evaluation of neural circuits as a consequence of interventions listed in a) will be performed by analyses of behaviour. For this purpose, mouse models for AD (with or without intervention) will be tested in designed behavioural paradigms and/or assessed for physiological properties. These measures will be selected based on the clinical representation of cognitive impairment and dementia in patients. Acclimatization of the animals to handling and the testing-environment will enable to obtain reliable baseline data with little variation. The types of behavioural tests that we will use will evaluate cognitive function and social behaviour. The same mouse will be maximally used in three behaviour tasks. We will perform home cage analysis (test for mouse activity: normal behaviour of the mouse will be tracked in the home cage environment), fear conditioning (test for learning and memory: mice will learn to predict an electrical shock associated with a specific context), Morris water maze (test for spatial learning and memory: mice will learn to memorize where the hidden platform is in a large circular pool), open field (test for anxiety: mouse behaviour will be followed in an open arena, mice that are a bit anxious will stay along the walls of the arena, others will cross the open field), elevated plus maze (test for anxiety: mouse behaviour will be followed in an elevated maze with an open and a closed arm, mice that are a bit anxious will stay longer in the closed arms), and object/social recognition tasks (test for social interaction and curiosity: mouse will be first familiarized with an object or another mouse, then the object or the mouse will be replaced by a new object or mouse, and the length of time the mouse spends close to the novel object or unfamiliar mouse will be measured). These are standard non-invasive behavioural paradigms used routinely in neuroscience research. Dependent on the aim of the experiment the relevant test(s) will be selected and applied. Behavioural tests will be performed max. 100 times – for instance, once a week testing in an open field for 1.5 year. The duration of the test depends on the test. In general, analysing the baseline and the effects of interventions in mouse models for AD take up to 24 months, as these mouse models mimic an aging disease.

When animals show abnormal behaviour during re-training, which are not related to their genotype or expected phenotype, they will be removed from the experiment. Abnormal behaviour includes stereotypic behaviours and motor problems resulting of adverse effects of the surgery or side effects of the therapeutic compounds.

The frequency and duration of the behavioural test depends on the nature of studied behaviour, which will be specified in the work protocols. At the end of all procedures, mice will be terminated to collect tissues and cells for *post-mortem* molecular and biochemical analysis and to verify injection sites (when applicable), and for *ex vivo* functional analysis. Biological sampling for subsequent molecular and/or cellular analyses will occur after killing the animals by euthanasia followed by transcardiac perfusion, by cervical dislocation, or by CO₂/O₂ suffocation.

Welfare assessment: We will monitor the animals daily on several parameters (overall appearance, weight, coat condition, behaviour, clinical signs of side effects, etc.) as has been described in the Directive 2010/63/EU: corrigendum of 24 Jan. 2013. In addition, humane endpoints will be described for specific experiments.

c) Translational analyses: Neuropathological and functional changes will be analysed by MRI and PET/SPECT scanning. These techniques enable monitoring changes in living mice at several ages (starting at 2 months up to 24 months). In addition they enable translation of the findings to patients suffering from cognitive impairment and dementia.

With non-invasive SPECT scans we will measure the molecular activity of glial-specific proteins and the presence of pathology (e.g. plaques). This involves the use of a small amount of radiolabelled molecules

(radioligands) that bind to certain biological molecules. Those amounts are so small that it will not cause any inconvenience to the mice. Different radioligands will be tested (including atoms such as ^{99m}Tc , ^{111}In , ^{123}I , ^{131}I and ^{18}F), which will be discussed with colleagues that are experienced in SPECT scanning. The scanners detect the radiation of the radioligands and calculate a three-dimensional image of the location of the biological molecules in the animal. With non-invasive MRI scans we will measure the structural and functional changes (CO_2 -challenge) of the brains of the mice. The mice will be anesthetized to be able to scan at several timepoints during the disease progression (e.g. every months starting at 2 months of age in the genetic models for AD, or 1 week after drug/diet/viral vector intervention).

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

The number of animals is based on our large experience of the past decade and on a power analysis for the different parameters measured. In general for our experiments an $\alpha = 0.05$ and $\beta = 0.8$ are considered relevant when comparing WT and experimental groups. For new experiments where we will use a new mouse line we will start with a pilot study which will allow us to determine the appropriate experimental group size. For example, in the case of a new treatment we will perform a pilot experiment (often $N=3$) to evaluate the extent of variation and perform statistical analysis (a power analysis) to assess and ensure that we use the minimum number of animals per group that will be statistically sound and biologically relevant.

B. The animals

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

Male and female mice will be obtained from our own breeding colonies, licensed academic breeders, or from a commercial licensed breeder. Our work considers young to aged animals (from 1 and 24 months). In each working protocol, we will specify the ages that will be used. We will also use mice of the models described in procedure 1.

Based on power calculation, for the behaviour and (MRI-SPECT) imaging analyses we will study 12 mice per condition. The power calculation is based on our previous studies on the APP/PS1 and APP/PS1xGV-/- mice. We expect a molecular, morphological and functional difference of 40% between groups. With a standard deviation between 30% and 40% (depending on the read out), a 5% type I error and 80% power we need 6-12 mice per group. This is in line with the experience we have with the variation observed in measurements and biology in these mice. We will include males and females, as so far we have never encountered a sex-specific difference in reactive gliosis and synapse pathology. Wild-type littermates will be used for controls, to rule out effects of the genetic background. Mice are back-crossed to Bl6, which is an optimal background for mouse behaviour.

We will perform the behavioural tasks at several ages of the mice (2, 3, 4, 6, 9, 12, 15, 18, 24 months) after intervention. After the behavioural task the mice are either directly killed for *post-mortem* neuropathological analysis or *ex vivo* functional analysis, or the mice will be first imaged (SPECT-PET-MRI) and then killed. The exact experiments will be described in the work protocols and will be discussed with the IvD.

We expect to do maximally 5 experiments per year, with 4 groups per experiment (wild-type, AD mouse, wild-type with intervention, AD mouse with intervention), with $n=12$ mice per group, with 4 time points = $5 \cdot 4 \cdot 12 \cdot 4 = 960$ mice per year. This adds up to maximally 4800 in 5 years.

Maximally 50% (=2400) of the adult mice are AD mice with an expected drop out of 15% (=360) due to the expression of hAPP. For the coming 5 years we therefore expect to need a maximum of $4800+360=5160$ 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.

Some mice will be obtained from our own breeding with discomfort described in animal procedure 1.

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:

A large part of the studies in our research group is being performed in human post-mortem brain tissue of Alzheimer patients, and we are preparing cell models based on induced pluripotent cells. However, animal studies are still needed as we seek comprehensive knowledge and understanding on the molecular, cellular, and physiological mechanisms underlying cognitive impairment and dementia in Alzheimer's disease. For these studies we need to combine molecular data with a functional and behavioural read-out. For most of our proposed animal experiments there are no replacements available, i.e. at this moment there is no alternative to measure cognition *in vitro*.

Reduction:

We have selected well established genetic mouse models that closely mimic the Alzheimer disease process leading to cognitive impairment and dementia, and that are based on genes implicated in the disease. In addition, we make use of established mouse models to target glia-specific expression. This approach contributes to robust and reproducible results. We will always combine research on mouse models with studies on human brain tissue obtained from the Netherlands Brain Bank and neuropathology departments. This ensures translation to the actual patients and minimises the use of animals, wherever possible. We will make optimal use of each animal killed by harvesting the maximum amount of tissue from different organs and if needed body fluids. Where possible, nests of mice will be shared between researchers to decrease "breeding surplus" animals. On basis of explorative work and our experience, we will perform statistical analyses to determine the minimal number of animals needed per experiment to obtain data which are of significance for understanding cognitive impairment and dementia. To reduce inter- and intra-assay variability we will only use well-established reagents and protocols during the *in vitro* procedures and anatomical analyses. Optimization and standardization of experiments remains the route to achieve good standards of practice.

Refinement:

Animal experiments will be performed by skilled and experienced staff. New people in the lab that are licensed to work with animals will be trained by the experienced staff members before they can start working with animals. Animals will be closely monitored and any sign of discomfort will be taken care of. The researchers working with the animals fully understand the impact of welfare on the scientific outcomes.

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

The animals will be taken care of by skilled and experienced staff. All possibilities to reduce pain, fear or suffering will be used. There are no negative environmental effects; all mice will be housed under strict D1 conditions. To reduce discomfort due to the genetic mutation we will, if possible: limit the lifespan of animals, house the mice in groups (social housing) and apply heterozygous breeding. We will check the animals daily on several parameters (overall appearance, size, weight and growth, coat condition, behaviour, clinical signs) as has been described in the Directive 2010/63/EU: corrigendum of 24 Jan. 2013. In addition, humane endpoints will be described for specific experiments in the work protocols.

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.

For surgical procedures, anaesthetics will be applied. Pre- and post-surgery the mice will be given systemic pain relief agents. In addition, antibiotics may be used to prevent infection. The anaesthetics, analgesics, and antibiotics used will be appropriate for mice.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Very rarely, surgical methods described in this procedure might cause complications resulting in discomfort for the animal (from experience less than 1%). If careful monitoring and pain relief measures will not lead to the recovery of animal discomfort we will termination the mice.

The AD mouse models that overexpress hAPP are known for the occurrence of sudden death in 15% of the mice.

Explain why these effects may emerge.

- Although extremely rare, any surgical procedure will involve a risk of discomfort.

- In mouse models with overexpression of hAPP (Alzheimer mouse models) epileptic events and sudden deaths have been reported. The cause may be the transgene, but the exact cause is unknown. It can not be predicted which mouse will suffer from this discomfort, therefore these mouse lines will be closely monitored.

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

The mentioned procedures have been performed in the lab for several years and there is expertise to ensure that the incidence of complications is minimal. Post-operative monitoring of animals will be done carefully with proper welfare diaries. In case of complications, careful monitoring of animal behaviour such as lack of voluntary movement, piloerection, or recovery of eating behaviour after surgery will be evaluated and if found abnormal will be considered for humane endpoints without causing further distress to the animal.

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.

We will monitor for clinical signs and pathophysiological changes. In balance with the scientific endpoint, we will decide what the humane endpoints are. If a gene is manipulated that has been implicated in a disease, the humane endpoints are those clinical signs and pathophysiological changes that are not observed in the human patient with a mutation in the same gene. Animals in pain and distress with signs not mimicking the disease will be killed. If the clinical signs and pathophysiological changes fit the disease that we aim to mimic, then we will reduce pain and distress in these animals by giving analgesics appropriate for mice and by giving optimal care (e.g. warming pads and soft chow).

In the case of surgery, the humane endpoint is when the weight of the animal is decreasing over 15% in 2 days (by checking their weight on a daily basis) and 20% in body-weight within 7 days (by checking their weight on a weekly basis). In case of surgery, if the wound healing is incomplete and causing suffering to the animal a humane endpoint is reached. Also, when post-operative mice show abnormal overall appearance (piloerection), decreased/increased size/growth development which is not part of their expected phenotype, (de)hydration, changes in colour (skin, eyes, mucous membranes) and (stereotype)behaviour these will be considered humane endpoints and the animals will be killed.

Indicate the likely incidence.

The procedures are well known in the department. Therefore we expect that for maximum 20% of the animals that will undergo surgery a humane endpoint will be reached.

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').

In vivo experiments:

In \pm 40% of the cases, animals will undergo mild procedures, such as injections or behavioural tasks that can cause mild discomfort. In the other 60% of the cases animals will undergo moderate and severe procedures. In our case these reflect the surgeries where animals experience discomfort due to anaesthesia and the recovery of the surgery. A maximum 20% of these animals will reach a humane endpoint (see J) = 12%. Also, behavioural testing can cause moderate discomfort because animals are tested in multiple tests. In some cases, surgery and behavioural tasks may occur in the same animal. Animals that are bred with discomfort and used for these tests may experience severe discomfort. However, the number of animals that will encounter this is low, maximum 3%. Thus in total mild 40% - 3% = 37%; moderate 60%-12%=48%; and severe is 3%+12%=15%.

Maximal 50% of the animals are AD mice with overexpression of hAPP. This will lead to moderate discomfort in 15% of the mice, leading to sudden death (possibly due to epilepsy).

Mild 37%

Moderate 48% (including the discomfort induced by the hAPP gene).

Severe 15%

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 the collection of the tissue necessary for experiments.

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

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

Yes

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : 2017.I.527.022
2. Titel van het project : Understanding the pathobiology of Alzheimer's disease and evaluation of potential therapies; a focus on glia
3. Titel van de NTS : Het ontrafelen van de pathobiologie van dementie en de evaluatie van potentiële therapieën; een focus op glia

4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning
 wijziging van vergunning met nummer :

5. Contactgegevens DEC

- Naam DEC : DEC Utrecht
Telefoonnummer contactpersoon : 088 – 75 59 247
Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):

- ontvangen door DEC: 23-10-2017
 aanvraag compleet:
 in vergadering besproken: 01-11-2017
 anderszins behandeld:
 termijnonderbreking(en) van / tot : 08-11-2017/12-11-2017
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
 aanpassing aanvraag:
 advies aan CCD: 04-12-2017

7. De aanvraag is afgestemd met de IvD en deze is hiermee akkoord.

8. Eventueel horen van aanvrager

- Datum:
- Plaats:
- Aantal aanwezige DEC-leden:
- Aanwezige (namens) aanvrager:
- Gestelde vragen en verstrekte antwoorden:
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag.

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 08-11-2017
- Datum antwoord: 12-11-2017
- Gestelde vragen en antwoorden:

Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: Zoals u zelf aangeeft in 3.2 is dit project onderdeel van een langlopend onderzoeksprogramma ("Since 1998 we have studied Alzheimer disease ..."). De DEC zou graag wat uitgebreider toegelicht zien wat u tot nu toe heeft gevonden en waarom dat aanleiding is om de richting in te slaan die u kiest in dit project. Wat met name opvalt is dat u vrij stellig bent over de ophoping van Amyloïd β als basale oorzaak en over het feit dat de glia daarop reageren en dat die reactie aan de basis ligt van de cognitieve achteruitgang ("We hypothesize that the Amyloid- β -induced activation of glia triggers a loss of their neuron-supportive phenotype and leads to synaptic pruning and cognitive impairment. etc"). Wat is nu precies de reden dat u niet de Amyloïd β kiest als target voor therapie?

Er is een paragraaf toegevoegd waarin beschreven is wat de aanleiding is om de glia te onderzoeken en waarom amyloïd β als therapie tot nu toe niet werkt. Er zijn veel pogingen gedaan om de productie van amyloïd β te remmen, d.m.v. het remmen van enzymen die APP knippen. Dit leidt helaas ook tot problemen met b.v. NOTCH- en groei-factor signalering. De enzymen die APP knippen, zijn niet specifiek en knippen ook honderden andere eiwitten. Remmen van dit enzym leidt tot problemen. Amyloïd β wordt opgenomen door de bloedbaan d.m.v. interactie met apolipoproteïne E (ApoE). ApoE (een risicogen in AD) wordt voornamelijk geproduceerd door astrocyten en microglia, en deze cellen fagocyteren ook amyloïd β plaques. Een stimulatie van de afbraak van amyloïd β d.m.v. vaccinatie, was zeer veelbelovend maar leidde helaas tot een ongewenste inflammatie in de hersenen. Sinds kort is er een grote interesse in de rol van glia in hersenziekten. Deze cellen reageren op amyloïd β , en proberen het amyloïd β op te ruimen. Amyloïd β zelf leidt niet direct tot dementie, maar het zet wel een cascade in gang die leidt tot neuronale schade (tau tangles) en gliosis. Het opruimen van amyloïd β is daarom ook niet het meest belangrijke om dementie tegen te gaan. Mogelijk is het onderdrukken van de gliose veel effectiever, omdat goed functionerende glia de neuronen in goed conditie houden en zorgen voor een goede communicatie via de synaps.

- 3.1 Achtergrond: Welke andere, vernieuwende strategie wordt in dit project gekozen met betrekking tot screening op genen en pathways die bij Alzheimer betrokken zijn (Determine amyloid- β induced molecular changes ...)? Kunt u inzichtelijk maken wat het vernieuwende is van de benadering in dit project t.o.v. reeds verricht onderzoek, waardoor u verwacht dat het nu iets gaat opleveren.

Er is een paragraaf toegevoegd over het vernieuwende van de strategie. In het kort: Alzheimer onderzoekers hebben zich tot nu toe vooral gericht op de neuronen, APP en tau biochemie, en MRI veranderingen. Dit heeft niet geleid tot een effectieve therapie. De andere hersencellen zijn jarenlang genegeerd in het Alzheimer onderzoek. Recente studies laten zien dat glia zeer belangrijk zijn voor gezonde hersenen, en dat deze cellen zeer sterk reageren in Alzheimer patiënten. Hoe dit de functie van glia cellen beïnvloedt is onbekend. Nieuwe technologieën (single cell RNAseq, muizen met calcium-reporters in glia etc.)

maken het nu mogelijk om de cellulaire veranderingen in Alzheimer muismodellen te bestuderen.

- 3.1 Achtergrond: U zegt (in bold): "***There is an urgent need for a cure ...***". De commissie vraagt zich af of het verstandig is om in dit stadium van het onderzoek dat al zo te benadrukken (zie ook de volgende vraag).
Ik ben het met u eens dat het vette lettertype wat te sterk was. Dit heb ik verwijderd. Maar het is zeker belangrijk dat er een therapie komt, en het onderzoek aan glia in muismodellen zal hier aan bijdragen. We zullen in dit project ook al therapieën testen.
- 3.2 Doel: U formuleert een viertal onderzoeksvragen. Met betrekking tot de 3e onderzoeksvraag: "Can we prevent, reverse, or halt the neurodegeneration and cognitive impairment by targeting glia (reactive and neurogenic glia)?" vraagt de DEC zich af of dit niet wat te ambitieus is en of u daar wel aan toe komt in dit project. Graag uw visie.
Hier kom ik zeker aan toe, omdat ik Alzheimer muizen ga kruisen met een muismodel waar de glia-reactie is onderdrukt. Daarnaast zullen we met farmaca de glia-reactie onderdrukken. Beide aanpakken zijn een onderdeel van het toegekende ZonMW Memorabel project.
- 3.2 Doel: Met betrekking tot de derde onderzoeksvraag en het tweede deel van de 4e onderzoeksvraag: "... and can we follow the reverse of pathology by novel drugs or biologicals in living mice?" is de DEC van mening dat u er goed aan zou doen om dit als het uiteindelijke doel te noemen waaraan dit onderzoek een bijdrage zou kunnen leveren. Als u denkt dat het wel om directe doelen gaat die u binnen het tijdsbestek van dit project (dus maximaal 5 jaar) kunt realiseren, dan zou de DEC graag zien dat u dat onderbouwt. Deze opmerking geldt ook voor de strategie, 3.4.2, stap 3.
De onderzoeksvragen zijn nu genummerd, zodat er makkelijker naar verwezen kan worden. Onderzoeksvraag 3 en 4 zijn wel concrete doelen. Uit eerder werk komen een paar targets, die we nu al direct gaan testen in onderzoeksvraag 3 en 4. Deze targets staan gemeld bij de research strategy step 2 (GFAP en vimentin) en het muismodel staat genoemd bij step 1/models/animal procedure 1. In de tekst van stap 3 zijn deze targets ook nog genoemd. Nieuwe targets zullen hier in de komende 5 jaar aan toegevoegd worden.

Bijlage 1

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: In de laatste zin van punt A zegt u: "*For the number of GGMs needed for experiments the statistical evaluation is described in procedure 1*". Hier bedoelt u waarschijnlijk bijlage 2 en 3. Graag wijzigen.
Dit is aangepast.
- K. Classificatie van ongerief: U geeft hier aan dat de pups licht ongerief ondervinden. Waaruit bestaat het ongerief voor de pups? De DEC raadt u aan om er nog bij te vermelden dat het echte ongerief voor de pups plaatsvindt bij de experimenten (in bijlage 2 en 3).
De pups zijn weggehaald uit de zin. Deze zullen geen ongerief ondervinden.

Bijlage 2

- J. Humane eindpunten: De zin: *"In balance with the scientific endpoint, we will decide what the humane endpoints are"* lijkt wat ongelukkig geformuleerd, omdat (mogelijk) de indruk gewekt wordt dat de humane eindpunten opgerekt worden om zo toch nog het wetenschappelijke doel te behalen. De DEC raadt u aan dit anders te formuleren. *Deze zin is weggehaald, de zin was overbodig omdat er uitgelegd wordt hoe we de humane eindpunten vaststellen.*
- K. Classificatie van ongerief: U geeft aan dat 88% van de dieren mild ongerief ondervindt, en 20% van de dieren het humane eindpunt bereikt (J). Dit lijkt tegenstrijdig met elkaar. Graag verhelderen. *Het gaat om maximaal 20% van alle dieren die een operatie ondergaan (viral injection), dat kom ik op 1%. Ik heb de categorie "severe" toegevoegd. Deze aanpassing heeft geen effect op het uiteindelijke aantal dieren met ernstig ongerief in de NTC.*

Bijlage 3

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: U doet een batterij aan testen, die niet allemaal gerelateerd zijn aan cognitie. Het is de DEC niet helder hoe deze testen bijdragen aan beantwoording van uw onderzoeksvraag en wat de ratio is van het doen van bijvoorbeeld de motorische testen? *Dementie heeft ook een effect op sociale taken, daarom zullen we cognitie en sociale taken testen. De DEC heeft een punt wat betreft de motorische testen. Alzheimer patiënten hebben wel motorproblemen, maar dat komt vaak later dan de cognitieve problemen. Ik heb de volgende testen uit het voorstel gehaald: SHIRPA, grip test, rotarod. Daarnaast heb ik op een paar plaatsen in de tekst het gedrag op motoriek verwijderd (in rood aangegeven).*
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De DEC merkt op dat het wenselijk zou zijn dat, indien er een duidelijke aanwijzing is dat een gerichte interventie zou kunnen werken, deze effecten dan ook tijdsafhankelijk in het gedrag en met andere technieken gemeten worden. *Dit is zeker ook de bedoeling. De volgende zin is toegevoegd: ", and the effect of the interventions will be followed at specific time points after the start of the interventions. If an intervention seems successful, the effect of the intervention will be followed in time using behaviour, translational and post-mortem analyses."*
- J. Humane eindpunten: Waar is het percentage van 20% uitval op gebaseerd? Is dat inclusief het wetenschappelijke eindpunt? Zo ja, dan het percentage graag opsplitsen. *Het gaat hier met name om injecties met b.v. virale vectoren of DNA. Dit is gebaseerd op ervaring over de laatste jaren. Zie ook procedure 2. Hier is aan toegevoegd (in rood) "that will undergo surgery". De berekening is aangepast en de aantallen dieren met de verschillende klassen van ongerief in de NTS ook.*

Niet Technische Samenvatting

- 3.2 Opbrengsten project en wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang: De DEC raadt u aan ook hier iets te nuanceren dat er nieuwe therapieën getest zullen worden.
Er zijn enkele nuances aangebracht.
 - 3.3 Diersoort en geschatte aantallen: Hier ook graag aangeven dat het om muizen gaat.
Dit is toegevoegd.
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er zijn geen DEC-leden betrokken bij het betreffende project.

C. Beoordeling (inhoud):

1. De belangrijkste oorzaak van verlies aan cognitieve capaciteit en dementie bij met name oudere personen is de ziekte van Alzheimer (AD), die wordt gekenmerkt door progressieve degeneratie en afsterven van cellen in de hersenen, waaronder neuronen, glia cellen (astrocyten en microglia) en cellen uit de vaatwanden. Tot op heden bestaan er geen mogelijkheden de ziekte te voorkomen of te genezen. Een aantal genen, coderend voor amyloid precursor proteïn (APP), presenilin 1 en 2 (PS1 en 2) en apolipoproteïn E (APOE) worden in verband gebracht met AD, maar in veel gevallen is de exacte oorzaak van de ziekte onduidelijk. Er zijn echter aanknopingspunten om een centrale rol aan glia toe te kennen in het proces van dementie. APOE komt voornamelijk tot expressie in glia en er zijn sterke aanwijzingen dat glia cellen neurale communicatie reguleren. Uitlopers van astrocyten vormen belangrijke onderdelen van synapsen; microglia en astrocyten zijn betrokken bij synaptische plasticiteit en maar ook bij vroeg verlies aan synapsen bij neurodegeneratieve ziekten door ontregelde *synaptic pruning* (=verwijdering van synapsen). De onderzoekers veronderstellen daarom dat het verlies aan cognitief functioneren en dementie bij AD zeer waarschijnlijk veroorzaakt wordt door veranderingen in functionele contacten tussen glia en neuronen. Hierop is de hypothese gebaseerd die het gehele project omvat en als volgt kan worden weergegeven: *Amyloid- β - geïnduceerde activatie van glia zet een verlies van hun neuronaal ondersteunend fenotype in*

gang, hetgeen leidt tot 'synaptic pruning' en als gevolg daarvan verlies aan cognitieve functies. Deze veranderingen vormen de eerste stap in het multi-factoriele proces naar dementie. Het doel van het project wordt daarmee geconcretiseerd, d.i. het ontrafelen van de moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan de glia-gemedieerde veranderingen in het functioneren van, en verlies aan synapsen die manifest zijn in AD. Het project kent een duidelijke, in vier stappen verdeelde onderzoekscyclus. Stap 1 bestaat uit het bestuderen en/of ontwikkelen van AD-ziektemodellen (GGM-muizen) met een duidelijk reactief gliosis, geïnduceerd door amyloid- β . Stap 2, het zoeken naar targets, omvat het ontrafelen van moleculaire en cellulaire pathways in glia die de oorzaak zijn *synaptic pruning* en cognitief verlies. Geïsoleerde glia cellen worden bestudeerd m.b.v. diverse 'omics'. Stap 3 bestudeert de functionele veranderingen die veroorzaakt worden door de moleculair genetische modificaties in de glia cellen d.m.v. *in vitro*, *ex vivo*, *in vivo* en *post mortem* onderzoek. Stap 4 evalueert de verzamelde kennis en leidt tot meer inzicht in de moleculaire, cellulaire en fysiologische pathways die oorzaak zijn van het neuro-glia disfunctioneren, cognitieve veranderingen en dementie. Dit kan leiden tot nieuwe mogelijkheden voor therapeutische interventie of het ontwikkelen van biomarkers om de ziekte in een vroeg stadium te onderkennen of het verloop ervan te monitoren. Het kan ook leiden tot het ontwikkelen van nieuwe ziektemodellen (terug naar stap 1) voor nieuwe targets in genoemde pathways. De DEC is van oordeel dat het project transparant is opgezet, met duidelijke beslismomenten en onderzoeksdoelen. De vier stappen in de onderzoekscyclus volgen elkaar logisch op en kunnen niet los van elkaar gezien worden. Ook is duidelijk weergegeven hoeveel en waarvoor de proefdieren ingezet gaan worden en wat daarbij de schade en ongerief zullen zijn die de dieren zullen ondervinden. De DEC acht daarom het project toetsbaar en is van mening dat het voldoende samenhang vertoont. Het komt het meest overeen met voorbeeld 1 uit de "Handreiking Definitie Project".

2. Voor zover de DEC bekend, is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de dierexperimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën sluiten aan bij de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is het ontrafelen van de moleculaire, cellulaire en fysiologische pathways die oorzaak zijn van het neuro-glia disfunctioneren in GM-muismodellen voor AD, het vinden van targets en het ontwikkelen van biomarkers en interventies om dit disfunctioneren te onderkennen, te voorkomen, of te herstellen. Het uiteindelijke doel van het project is de verzamelde kennis te vertalen naar humane patiënten om AD in een vroeg stadium te kunnen diagnosticeren, de ziekte te voorkomen, het verloop te vertragen, dan wel te genezen. De DEC is van mening dat er in voldoende mate een relatie is tussen het directe doel en het uiteindelijke doel.

5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: de proefdieren, doelgroep n.l. patiënten met de ziekte van Alzheimer of, veelal oudere personen, die de ziekte dreigen te krijgen, het onderzoeksgebied en de onderzoekers. De belangen die voor de proefdieren in het geding zijn: alle proefdieren worden in belangrijke mate in hun natuurlijk gedrag beperkt, een groot aantal dieren zal een min of meer ingrijpende operatie moeten ondergaan, meer dan de helft zal genetisch gemodificeerd zijn, hetgeen hun cognitieve en/of motorische capaciteit kan aantasten en aan het einde van de experimenten zullen de dieren gedood worden, in de meeste gevallen ten behoeve van *post mortem* onderzoek. De belangen voor personen bij wie AD wordt voorzien of die er al aan lijden zullen zeer groot zijn indien het uiteindelijke doel van het project bereikt wordt. AD is een frequent voorkomende aandoening, ernstig voor zowel de patiënt, zijn directe omgeving en de maatschappij als geheel. Dit project heeft niet alleen belang voor kennisontwikkeling met betrekking tot AD, maar ook voor verwant onderzoek naar andere neurodegeneratieve aandoeningen en voor de neurobiologie in het algemeen. Voor de onderzoeker geldt dat aansprekende resultaten hem/haar zal stimuleren en in staat zal stellen verder bij te dragen aan dit belangwekkende onderzoek.
6. De DEC ziet geen aanleiding om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd. Dit project is onderdeel van een al langer lopend onderzoek waarbinnen wordt samengewerkt met andere groepen, waarover gepubliceerd wordt in vooraanstaande wetenschappelijke tijdschriften en waaraan belangrijke subsidies zijn toegekend. De DEC ziet daarom geen redenen er aan te twifelen dat de doelstellingen behaald kunnen worden. Zij is ook van mening dat aan de 3V-beginselen voldaan kan worden en dat voorkomen zal worden dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. Het ontwikkelen van genetisch gemodificeerde AD-muismodellen (stap 1) wordt steeds voorafgegaan door *post mortem* onderzoek aan humane hersenen van AD-patiënten en *in silico* en *in vitro* onderzoek om voldoende argumenten te verzamelen voor het maken van een nieuw model. Mogelijk constitutioneel ongerief van de GGMs wordt zoveel mogelijk gereduceerd door de dieren niet onnodig lang te laten leven, groepshuisvesting en het gebruik van heterozygote lijnen. Stap 2 bestaat hoofdzakelijk uit bioinformatische analyse van de omics-gegevens. Het onderzoek in stap 3 naar mogelijk functieverlies en de effecten van interventie bestaat voor een belangrijk deel uit *in vitro* en *ex vivo* experimenten. De dieren die ingezet worden voor de *in vivo* experimenten worden naar *best practice* verzorgd, pijn, stress en angst zullen tot een minimum beperkt worden en het doden zal op een humane manier plaats vinden.
8. Het project is gebaseerd op een duidelijke en beperkende hypothese, en wordt gekenmerkt door een transparante planning via de 4-stappen onderzoekscyclus. De voorgestelde onderzoekslijn en experimentele opzet sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven

doelstellingen. De gekozen strategie en experimentele aanpak is gericht op het identificeren van moleculaire, cellulaire en fysiologische pathways die een sleutelpositie innemen in het neuroglia disfunctioneren bij AD. De DEC acht de kans groot dat deze strategie zal leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

Welzijn dieren

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

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

10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU richtlijn.

11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geëvalueerd.

Bijlage 1: Ontwikkelen van GGMs. De muizen die het humane APP-gen tot expressie brengen vallen onder fok met constitutioneel ongerief. 15% van de dieren sterft nl. zonder tekenen van ongerief vooraf en zonder duidelijk aanwijsbare oorzaak. Het daarmee gepaard gaande ongerief wordt geëvalueerd als matig. Voor het genereren van 5 GGMs zijn in totaal 1965 dieren nodig, waarvan 1215 15% kans lopen op deze wijze te overlijden. Over het geheel genomen wordt het ongerief ingeschat als mild voor 30% (donoren), en matig 70% (vasectomie voor mannen en fok met discomfort).

Bijlage 2: Voor primaire cel cultures, ex vivo electrofysiologie en het oogsten van glia cellen m.b.v. FACS worden dieren (2250, maar daarnaast ook embryo's 750 die nog niet als proefdier aangemerkt worden) op verschillende leeftijden gedood. Ongerief inschatting: mild. 5% Van de dieren ondergaat vooraf een virusinjectie in de hersenen: ongerief matig. Daarenboven loopt weer 15% van de helft van de dieren, als gevolg van het humane APP-gen (dat betreft 1125 dieren) zonder duidelijke oorzaak te overlijden: matig ongerief. Overall leidt dit tot 88% mild ongerief, 7% matig als gevolg van de kans op voortijdig overlijden en 5% matig vanwege de virale injecties.

Bijlage 3: Omvat gedragsstudies met AD-muizen voor het testen van cognitieve en motorische functies, met en zonder interventie; analyse van hersenen van AD-muizen met en zonder

interventie, m.b.v. MRI en fMRI; SPECT en PET imaging, en analyse van bloed voor biomarkers en concentraties van therapeutische stoffen.

In totaal zullen hiervoor 4800 muizen worden gebruikt, waarvan weer de helft het humane APP-gen draagt en dus weer 15% kans loopt vroegtijdig te overlijden. Hiervoor wordt gecompenseerd met 360 dieren. De dieren die onderworpen worden aan de gedragsstudies worden of direct daarna gedood, of komen terug in de volgende fase, de analyse van de hersenen.

Mild ongerief ondervindt 37% als gevolg van injecties en gedragsproeven. Matig ongerief wordt toegebracht aan 60% van de dieren als gevolg van het bijkomen uit narcose, meerdere en soms belastende gedragstesten of combinaties daarvan. Ernstig ongerief bij naar schatting 3% doordat de genetische modificatie dusdanige gevolgen heeft dat de dieren niet in staat zijn enigszins normaal te functioneren. Omdat vooraf niet duidelijk is welke gevolgen nieuwe genetische modificaties teweeg zullen brengen moeten deze inschattingen wellicht later bijgesteld worden.

12. Afgezien van het instrumentele gebruik van de dieren ten behoeve van het analyseren van gedrag, cognitieve vermogens, het neuron-glia complex (dis)functioneren en het doden wordt de integriteit van 50% van de dieren aangetast door de genetische modificatie die als doel heeft de ziekte van Alzheimer te veroorzaken.
13. De humane eindpunten zijn in de bijlage dierproeven goed gedefinieerd en het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is goed ingeschat. De humane eindpunten verschillen per bijlage. In bijlage 1 en 2: GGMs die verschijnselen van ongerief vertonen, die niet overeenkomen met lijden van humane AD-patiënten worden geacht het (wetenschappelijke) humane eindpunt bereikt te hebben en ze worden uit het experiment genomen. Dieren met ernstiger ongerief, maar overeenkomend met humaan lijden bij AD wordt zo nodig pijnstilling geboden en extra zorg. Dezelfde criteria gelden ook voor bijlage 3, maar daar zal deze selectie voor een deel al plaats gevonden hebben. Echter, de ingrepen die uitgevoerd worden ten behoeve van de *in vivo* experimenten kunnen dusdanig ingrijpend zijn dat als gevolg daarvan de humane eindpunten bereikt worden. Voor het gehele project wordt ingeschat dat 20% van de dieren het al dan niet wetenschappelijke humane eindpunt zullen bereiken.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Voor het formuleren van de doelstellingen van dit project is, en wordt, veel *post mortem* onderzoek gedaan aan hersenen van AD-patiënten. Analyse van data van omics-onderzoek en bioinformatica uit fase 2 vormen de basis voor fase 3 waar voor het eerst dierexperimenteel onderzoek aan de orde is. In deze studies worden de moleculaire data gecombineerd met functionele en gedragsgegevens. Omdat er geen mogelijkheid is tot nu toe om cognitie *in vitro* te meten zijn dierproeven in deze fase van het project niet te vervangen.

15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen.

In dit project wordt gebruik gemaakt van muismodellen met glia-specifieke expressie patronen en waarin het verloop van cognitieverval en dementie sterk lijkt op dat van humane patiënten met AD. Het onderzoek aan muizen wordt steeds gecombineerd met onderzoek aan humaan hersenmateriaal. Er wordt optimaal gebruik gemaakt van de proefdieren door steeds zoveel mogelijk materiaal te verzamelen en zo mogelijk worden dieren of weefsels gedeeld met andere onderzoekers om het fokoverschot zo gering mogelijk te laten zijn. Groepsgroottes worden tot een minimum beperkt op grond van statistische berekeningen vooraf.

16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. De dierexperimenten worden uitsluitend uitgevoerd door ervaren medewerkers. De dieren worden nauwkeurig gemonitord, bij tekenen van ongerief dat voorkomen kan worden wordt adequaat gehandeld.

17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Dieren van beide geslachten zullen in gelijke mate worden ingezet.

19. De dieren worden in het kader van het project gedood voor het *post mortem* fysiologisch en/of morfologisch onderzoek. De dieren worden volgens een, bijlage IV van de EU richtlijn, passende methode gedood.

20. De vraag over hergebruik is niet van toepassing omdat de dieren gedood worden in het kader van het experiment.

NTS

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

D. Ethische afweging

1. De morele vraag die aan de orde is, is of het belang van dit onderzoek, namelijk het zoeken en ontrafelen van moleculaire, cellulaire en fysiologische pathways die een sleutelpositie innemen in het (dis)functioneren van het neuron-glia complex in AD-muismodellen en humane AD-patiënten het gebruik van proefdieren rechtvaardigt met in acht neming van de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de gebruikte proefdieren.

2. De meeste proefdieren ondergaan een beperkte aantasting van hun welzijn. Naast het instrumentele gebruik van de dieren en het doden wordt bij ongeveer de helft van de proefdieren via GGM een lichte tot ernstige vorm van de ziekte van Alzheimer en dementie geïnduceerd. Met name dat laatste beschouwt de DEC als een ernstige aantasting van de integriteit van de proefdieren.

Indien de hierboven genoemde hypothese geverifieerd kan worden en de moleculaire, cellulaire en fysiologische processen die een sleutelpositie innemen bij het ontstaan en verloop van AD kunnen worden begrepen, dan zal dit project er toe bijdragen dat in de toekomst de ziekte van Alzheimer in een vroeg stadium kan worden opgespoord, wellicht kan worden voorkomen, het verloop kan worden vertraagd of zelfs kan worden genezen. De DEC acht het aannemelijk dat de fundamentele, en in aanzet ook de translationele doelstelling (interventie) behaald kan worden. Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk, maar de onderzoekers doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken. Ook het bredere onderzoek naar neurodegeneratieve ziekten zal gebaat zijn bij de resultaten van dit project. Dat het voor de individuele onderzoeker van belang kan zijn om aansprekende onderzoeksresultaten te boeken is juist, het zal hem/haar stimuleren tot verder onderzoek. Aan persoonlijke voordelen voor de onderzoeker in de vorm van prestige en carrière kent de DEC weinig gewicht aan toe in haar afweging voor proefdiergebruik.

3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat het ontrafelen en begrijpen van de mechanismen die ten grondslag liggen aan het disfunctioneren van het neuron-glia complex bij de ziekte van Alzheimer een substantieel belang vertegenwoordigt en dat dit substantiële belang opweegt tegen de beperkte, resp. aanzienlijke aantasting (onder 2 hierboven wordt het een ernstige aantasting van de integriteit genoemd, moet dit niet in overeenstemming zijn met wat hier staat?) van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag acht de DEC daarmee gerechtvaardigd.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

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

Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.

Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist

Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...

De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...

De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
3. Er zijn geen knelpunten/dilemma's naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 80125

3508 TC UTRECHT



**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
AVD1150020174314

Bijlagen

2

Datum 8 december 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 6 december 2017. Het gaat om uw project "Understanding the pathobiology of Alzheimer's disease and evaluation of potential therapies; a focus on glia". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1150020174314. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:

8 december 2017

Aanvraagnummer:

AVD1150020174314

Datum:

8 december 2017

Aanvraagnummer:

AVD1150020174314

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11500

Naam instelling of organisatie: UMC Utrecht

Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde:

Postbus: 80125

Postcode en plaats: 3508 TC UTRECHT

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam:

Functie: Hoogleraar

Afdeling:

Telefoonnummer:

E-mailadres:

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: 15 januari 2018
Geplande einddatum: 15 januari 2023
Titel project: Understanding the pathobiology of Alzheimer's disease and evaluation of potential therapies; a focus on glia
Titel niet-technische samenvatting: Het ontrafelen van de pathobiologie van de ziekte van Alzheimer en de evaluatie van potentiële therapieën; een focus op glia.
Naam DEC: DEC Utrecht
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

Datum:

8 december 2017

Aanvraagnummer:

AVD1150020174314

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: 
Functie: 
Plaats: Utrecht
Datum: 5 december 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UU-ASC
Postbus 80.011
3508 TA UTRECHT


**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
AVD1150020174314
Bijlagen
2

Datum 8 december 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 8 december 2017
Vervaldatum: 7 januari 2018
Factuurnummer: 174314
Ordernummer: o.v.v. CB.841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1150020174314	€ 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.



Datum 31-1-2018
Betreft Reactie op e-mail CCD dd 31-1-2018

Geachte Centrale Commissie Dierproeven,

Op 31-1-2018 hebben we een e-mail van u gekregen waarin opheldering wordt gevraagd over wat onduidelijkheden in de projectaanvraag "Understanding the pathobiology of Alzheimer's disease and evaluation of potential therapies; a focus on glia" met aanvraagnummer AVD1150020174314.

Hieronder vindt u ons antwoord op de onduidelijkheden:

-In bijlage 3.4.4.2 wordt beschreven dat embryo's gebruikt worden. In de vergunning dient vermeld te worden hoeveel embryo's er gebruikt worden. Kunt u aangeven hoeveel embryo's bijlage 3.4.4.2 betreft?

In bijlage 3.4.4.2 hebben we nu het aantal embryo's aangegeven.

-In bijlage 3.4.4.2 is aangegeven dat alle dieren volgens richtlijn 2010/63/EU bijlage IV gedood worden. Kunt u aangeven welke methode hiervoor gebruikt wordt bij embryo's en pups? Indien dit decapitatie betreft dan dient u te onderbouwen waarom andere methodes niet toegepast kunnen worden.

We hebben nu aangegeven dat we de pups dmv decapitatie doden, omdat cervicale dislocatie niet mogelijk is. De diertjes zijn hier te klein voor. De efficiency van cervicale dislocatie in deze dieren is laag en het mogelijke lijden hoog. Koolstofdioxide blootstelling leidt niet tot snelle doding van embryo's en jonge knaagdieren en een percuterende slag op de kop is niet mogelijk omdat wij juist de hersenen willen analyseren. Ook injecties met anesthesie/euthasaat in embryo's of jonge pups zijn niet efficiënt en zorgen voor meer ongerief dan decapitatie. De embryo's worden gedood volgens de richtlijn, omdat ze direct nadat ze uit de uterus worden gehaald op ijswater worden gelegd, hierna volgt decapitatie. Dit staat nu in de bijlage beschreven.

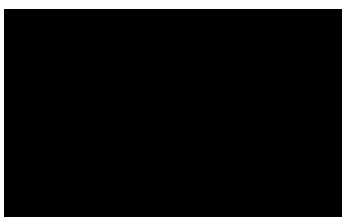
-In bijlage 3.4.4.3 worden gedragsanalyses uitgevoerd. Het is voor de CCD niet volledig duidelijk welke gedragstesten er gedaan worden. Wilt u alle gedragstesten omschrijven zodat het duidelijk wordt welke handelingen de dieren ondergaan?
De gedragstesten staan nu beschreven in de bijlage.

-De Niet-technische samenvatting (NTS) bevat ruim 1100 woorden in plaats van de in de richtlijn aangegeven 500 woorden. Wij verzoeken u secties 3.1 en 3.2 van de samenvatting in te korten en de nieuwe versie van de NTS toe te sturen.

De NTS is ingekort.

Met vriendelijke groet,

[Redacted signature]



[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

Hoogleraar "[Redacted]"
 [Redacted] UMC Utrecht

Hoogleraar [Redacted]
 [Redacted],
 Universiteit van Amsterdam

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 80125

3508 TC UTRECHT



**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
AVD1150020174314

Bijlagen

1

Datum 16 februari 2018

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 6 december 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Understanding the pathobiology of Alzheimer's disease and evaluation of potential therapies; a focus on glia" met aanvraagnummer AVD1150020174314. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a lid 1 van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet).

U kunt met uw project starten. De vergunning wordt afgegeven van 16 februari 2018 tot en met 15 januari 2023.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

Procedure

Advies dierexperimentencommissie

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie (DEC) DEC Utrecht gevoegd. Dit advies is ontvangen op 6 december 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Het advies van de DEC is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Datum:
16 februari 2018
Aanvraagnummer:
AVD1150020174314

Nadere vragen aanvrager

Op 31 januari 2018 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. De aanvullingen hadden betrekking op het aantal embryo's in bijlage 3.4.4.2, de dodingsmethode van de pups, omschrijving van de gedragstesten en een wijziging in de NTS. Uw antwoord is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Overwegingen

Alle hierboven genoemde stukken liggen ten grondslag aan ons besluit.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1 lid 1 sub d en artikel 10a1 lid 3 van de wet. De reden van deze beoordeling achteraf is dat in dit project dieren ernstig ongerief ondergaan. Deze beoordeling zal uiterlijk januari 2024 plaatsvinden. Meer informatie over de eisen die gesteld worden bij de beoordeling achteraf vindt u in de bijlage 'Weergave wet- en regelgeving'.

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen. Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

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

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

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

Meer informatie

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

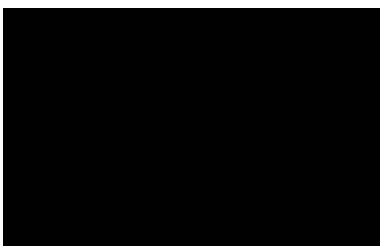
Datum:

16 februari 2018

Aanvraagnummer:

AVD1150020174314

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

**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: UMC Utrecht
Adres: Postbus 80125
Postcode en plaats: 3508 TC UTRECHT
Deelnemersnummer: 11500

deze projectvergunning voor het tijdvak 16 februari 2018 tot en met 15 januari 2023, voor het project "Understanding the pathobiology of Alzheimer's disease and evaluation of potential therapies; a focus on glia" met aanvraagnummer AVD1150020174314, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Hoogleraar.

Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 6 december 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 6 december 2017;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.4.1 Generation of genetic mouse models for studying the role of glia in cognitive impairment and dementia, and maintenance of colonies of genetically modified mice, including breeding with discomfort. zoals ontvangen op 6 december 2017;
 - 3.4.4.2 Amyloid-triggered glia response and its role in cognitive impairment and dementia: Molecular analyses, functional consequences, and test novel strategies to prevent, stop or reverse dementia - Ex vivo and in vitro., zoals ontvangen op 2 februari 2018;
 - 3.4.4.3 Amyloid-triggered glia response and its role in cognitive impairment and dementia: Molecular analyses, functional consequences, and test novel strategies to prevent, stop or reverse dementia - In vivo., zoals ontvangen op 2 februari 2018;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 2 februari 2018;
 - d Advies van Dierexperimentencommissie zoals ontvangen op 6 december 2017
 - e De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 2 februari 2018.

Aanvraagnummer:
AVD1150020174314

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst
3.4.4.1 Generation of genetic mouse models for studying the role of glia in cognitive impairment and dementia, and maintenance of colonies of genetically modified mice, including breeding with discomfort.			
	Muizen (Mus musculus)	1.965	70,0% Matig 30,0% Licht
3.4.4.2 Amyloid-triggered glia response and its role in cognitive impairment and dementia: Molecular analyses, functional consequences, and test novel strategies to prevent, stop or reverse dementia - Ex vivo and in vitro.			
	Muizen (Mus musculus) / 375 van het totale aantal betreft embryo's	3.169	1,0% Ernstig 12,0% Matig 87,0% Licht
3.4.4.3 Amyloid-triggered glia response and its role in cognitive impairment and dementia: Molecular analyses, functional consequences, and test novel strategies to prevent, stop or reverse dementia – In vivo.			
	Muizen (Mus musculus)	5.160	15,0% Ernstig 48,0% Matig 37,0% Licht

Voorwaarden

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk januari 2024 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst de dierproeven conform de vergunning waren.

Aanvraagnummer:

AVD1150020174314

Ter informatie

Onderstaande informatie is opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden 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.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



Aanvraagnummer:

AVD1150020174314

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:

AVD1150020174314

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.

Beoordeling achteraf

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



Aanvulling Niet-technische samenvatting

Beoordeling achteraf 20174314-BA

1.1	Titel van het project	1 Algemene gegevens Het ontrafelen van de pathobiologie van dementie en de evaluatie van potentiële therapieën; een focus op glia.
		2 Gebruik dieren
2.1	Welke diersoorten zijn gebruikt?	Muis
2.2	Hoeveel dieren zijn gebruikt?	1585
2.3	Wat is het werkelijke ongerief dat de dieren hebben ondergaan?	Terminaal: 286 (18%) Licht: 865 (54,6%) Matig: 171 (10,8%) Ernstig: 263 (16,6%)
3.1	Wat zijn de belangrijkste opbrengsten van het project?	3 Opbrengsten Dit onderzoek heeft geholpen om te begrijpen waarom mensen met Alzheimer moeite hebben met hun geheugen. We hebben ontdekt dat niet alleen de zenuwcellen, maar ook de ondersteunende cellen, de glia, worden aangetast. In de hersenen van mensen met Alzheimer ontstaan er klontjes eiwitten, de plaques. Rondom deze plaques ontstaan kleine ontstekingsreacties waar de glia bij betrokken zijn. Samen zorgt dit ervoor dat zenuwcellen niet goed met elkaar kunnen communiceren, wat leidt tot geheugenproblemen. Ons onderzoek bij muizen met Alzheimerplaques heeft laten zien dat het verminderen van deze ontstekingsreacties in de hersenen ervoor zorgt dat er minder geheugenproblemen zijn.
4.1	Zijn er nieuwe inzichten die kunnen leiden tot vervanging, vermindering en/of verfijning?	4 Nieuwe inzichten Gedurende de looptijd van dit project zijn er nieuwe technieken in het laboratorium ontwikkeld en geïmplementeerd, die bijdragen tot vervanging, vermindering, en/of verfijning van dierproeven. Vervanging: -We gebruiken steeds vaker celkweekmodellen van menselijke cellen. Deze modellen worden steeds geavanceerder, en we kunnen de

interacties tussen zenuwcellen en gliacellen hierin onderzoeken. Als start van deze celkweken gebruiken we cellen die afkomstig zijn van huid en/of bloedcellen van mensen met Alzheimer en gezonde mensen.

- We hebben de hersenen van de muizen die in deze studie gebruikt zijn, zijn ingevroren. En dit materiaal kunnen we gebruiken voor vervollexperimenten.

Vermindering:

- Nieuwe technologische snuffjes zoals multi-electrode arrays en RNA-sequencing helpen ons om veel meer gegevens te verzamelen van minder proefdieren. We kunnen nu met hersenmateriaal van minder dieren heel veel data verzamelen die ons helpen om te begrijpen wat er precies verandert in hersenen van muizen met plaques.

- Dankzij betere statistische analyses kunnen we gerichtere experimenten uitvoeren en hebben we minder proefdieren nodig.

- We zorgen er ook voor dat we goed kijken naar welk hersenmateriaal we al hebben in de vriezer, zodat we niet steeds nieuwe proefdieren nodig hebben.

Verfijning:

- We passen gedragsexperimenten en toedieningsmethoden aan om ervoor te zorgen dat dieren minder ongerief ervaren.

- We houden het welzijn van de dieren continu in de gaten en hebben duidelijke regels over wanneer een proef moet stoppen om te zorgen dat we de methoden steeds beter maken.

5 In te vullen door CCD

Publicatie datum

3-5-2024

Andere opmerkingen

Formulier

Beoordeling achteraf

(Versie 11 juli 2018)

- Dit formulier gebruikt u om uw beoordeling achteraf te schrijven.
- Gebruik bij het invullen van dit formulier de Toelichting op het formulier 'Beoordeling achteraf'.
- Meer informatie over de beoordeling achteraf vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.

1 Algemene gegevens

1.1	Vul het AVD nummer in.	AVD1150020174314						
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder in.	<table><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>UMC Utrecht</td></tr><tr><td>E-mailadres contactpersoon</td><td></td></tr><tr><td>(Optioneel) e-mailadres Instantie voor Dierenwelzijn</td><td>info@ivd-utrecht.nl</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	UMC Utrecht	E-mailadres contactpersoon		(Optioneel) e-mailadres Instantie voor Dierenwelzijn	info@ivd-utrecht.nl
Naam instelling of organisatie	UMC Utrecht							
E-mailadres contactpersoon								
(Optioneel) e-mailadres Instantie voor Dierenwelzijn	info@ivd-utrecht.nl							
1.3	Vul hier de gegevens van de verantwoordelijk onderzoeker in.	<table><tr><td>Titel, voorletters en achternaam</td><td>[REDACTED]</td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td></tr></table>	Titel, voorletters en achternaam	[REDACTED]	Telefoonnummer	[REDACTED]	E-mailadres	[REDACTED]
Titel, voorletters en achternaam	[REDACTED]							
Telefoonnummer	[REDACTED]							
E-mailadres	[REDACTED]							

1.1	Vul de titel van het project in.	Understanding the pathobiology of Alzheimer's disease and evaluation of potential therapies; a focus on glia
-----	----------------------------------	--

2 Gebruik dieren

2.1	Geef per bijlage en per diersoort aan hoeveel dieren u heeft gebruikt. -Indien niet alle aangevraagde diersoorten gebruikt zijn, licht dit toe. -Indien dit afwijkt van het aantal dieren in de vergunning, verklaar het verschil.	<p><i>Bijlage 1: Generation of genetic mouse models for studying the role of glia in cognitive impairment and dementia, and maintenance of colonies of genetically modified mice, including breeding with discomfort.</i></p> <p>Aantal dieren in vergunning: 1.965 Aantal dieren gebruikt: 0 Diersoort: Muis</p> <p>Afwijking: De experimenten in dit project zijn gestart met bestaande muismodellen (zie 4.1). Gedurende het project zijn stappen ondernomen om een GFAP/VIM knock-out muismodel te genereren door genetisch gemodificeerde muismodellen te kruisen. De resulterende nakomelingen zijn ingezet voor experimenten en vallen officieel onder</p>
-----	--	--

bijlage 2 en 3 van dit project. Gedurende het onderzoek was er geen noodzaak om andere muismodellen te verkrijgen. Er is nagedacht om de klassieke GFAP/VIM knockout te vervangen door een induceerbare knockout, maar er was geen mogelijkheid om hier projectfinanciering voor aan te vragen (er was geen geschikte call). Daarnaast is het onderzoek ook vertraagd door corona (zie ook 6.1).

Bijlage 2: Amyloid-triggered glia response and its role in cognitive impairment and dementia: Molecular analyses, functional consequences, and test novel strategies to prevent, stop or reverse dementia - Ex vivo and in vitro.

Aantal dieren in vergunning: 3.169

Aantal dieren gebruikt: 1383

Diersoort: Muis

Afwijking: Een groot deel van de experimenten uitgevoerd op dit project vielen onder bijlage 2 en hadden de focus op neuron-glia communicatie, synaptische plasticiteit en de activiteit van neuronale circuits. We hebben er voor gezorgd dat herhaalde metingen zoveel mogelijk werden uitgevoerd op dezelfde samples. Daarnaast hebben we, waar mogelijk, ook aanvullende experimenten uitgevoerd op eerder gebruikte samples, zodat verschillende resultaten aan elkaar gecorreleerd konden worden. Deze aanpak heeft geleid tot een aanzienlijke vermindering van het aantal vereiste proefdieren. Bovendien is er minder projectfinanciering binnengekomen op proefdieronderzoek naar de ziekte van Alzheimer, waardoor minder experimenten zijn uitgevoerd.

Bijlage 3: Amyloid-triggered glia response and its role in cognitive impairment and dementia: Molecular analyses, functional consequences, and test novel strategies to prevent, stop or reverse dementia - In vivo.

Aantal dieren in vergunning: 5.160

Aantal dieren gebruikt: 202

Diersoort: Muis

Afwijking: Bijlage 3 omvat alle *in-vivo* experimenten, waaronder gedragsexperimenten. Oorspronkelijk was de intentie om, tegen het einde van het project, verkregen resultaten van *ex-vivo/in-vitro* experimenten te valideren middels gedragsexperimenten. De *ex-vivo/in-vitro* experimenten namen echter meer tijd in beslag dan ingeschat. Daarnaast was er in het algemeen minder tijd en personeel (zie 6.1) beschikbaar om *in-vivo* experimenten uit te voeren. Tevens zijn veel experimenten ten tijde van dit project uitgevoerd in onderzoeksconsortia. In deze consortia is besloten de *in-vivo* experimenten voornamelijk aan andere universiteiten uit te voeren, waaronder aan de VU Amsterdam. Deze experimenten vielen dan ook niet onder deze CCD aanvraag.

- 2.2 Geef per bijlage en per diersoort aan: het aantal dieren dat terminaal, licht, matig of ernstig ongerief heeft ondergaan.
-Indien dit afwijkt van het vooraf ingeschatte cumulatieve ongerief, verklaar het verschil.

Bijlage 1: Generation of genetic mouse models for studying the role of glia in cognitive impairment and dementia, and maintenance of colonies of genetically modified mice, including breeding with discomfort.

Aantal dieren (muis) in vergunning: 1.965
Als terminaal voorzien in aanvraag: 0 (0%)
Als terminaal beoordeeld na inzet: 0 (0%)

Als licht voorzien in aanvraag: 590 dieren (30%)
Als licht beoordeeld na inzet: 0 (0%)

Als matig voorzien in aanvraag: 1375 dieren (70%)
Als matig beoordeeld na inzet: 0 (0%)

Als ernstig voorzien in aanvraag: 0 (0%)
Als ernstig beoordeeld na inzet: 0 (0%)

Afwijking: Zoals hierboven vermeld zijn er tijdens dit project geen dieren gebruikt onder bijlage 1.

Bijlage 2: Amyloid-triggered glia response and its role in cognitive impairment and dementia: Molecular analyses, functional consequences, and test novel strategies to prevent, stop or reverse dementia - Ex vivo and in vitro.

Aantal dieren (muis) in vergunning: 3.169
Aantal dieren gebruikt: 1383

Als terminaal voorzien in aanvraag: 0 (0%)
Als terminaal beoordeeld na inzet: 286 dieren (20,7%)

Als licht voorzien in aanvraag: 2757 dieren (87%)
Als licht beoordeeld na inzet: 713 dieren (51,6%)

Als matig voorzien in aanvraag: 380 dieren (12%)
Als matig beoordeeld na inzet: 147 dieren (10,6%)

Als ernstig voorzien in aanvraag: 32 dieren (1%)
Als ernstig beoordeeld na inzet: 237 dieren (17,1%)

Afwijking: Er is een hoger aantal dieren dan verwacht dat terminaal ongerief heeft ervaren. Tijdens de aanvraag werden de handelingen met deze dieren ingeschat als licht, gebaseerd op de verwachte mate van ongerief tijdens de handeling, niet op de uiteindelijke uitkomst. Ondanks het gebruik van volledige narcose was de uitkomst voor het dier terminaal. Dit is vooraf onterecht als licht ongerief ingeschat. Hier zal rekening mee gehouden worden in toekomstige aanvragen.

Een hoger aantal dieren dan verwacht heeft ernstig ongerief ervaren omdat tijdens het project duidelijk werd dat APP/PS1 muizen het risico lopen op epileptische aanvallen, wat gepaard gaat met ernstig ongerief. Daarnaast werd in de loop van het project duidelijk dat mannelijke GFAP/VIM knock-out muizen verhoogde sterfte lieten zien. Deze informatie was vooraf niet beschikbaar. In overleg met de IvD is besloten om deze lijnen te classificeren als 'lijnen met ongerief'. Vanaf dat moment zijn de lijnen behandeld volgens de daarvoor geldende richtlijnen, en is het welzijn van de dieren intensiever gecontroleerd.

Bijlage 3: Amyloid-triggered glia response and its role in cognitive impairment and dementia: Molecular analyses, functional consequences, and test novel strategies to prevent, stop or reverse dementia – In vivo.

Aantal dieren (muis) in vergunning: 5.160
Aantal dieren gebruikt: 202

Als terminaal voorzien in aanvraag: 0 (0%)
Als terminaal beoordeeld na inzet: 0 (0%)

Als licht voorzien in aanvraag: 1.909 dieren (37%)
Als licht beoordeeld na inzet: 152 dieren (75,2%)

Als matig voorzien in aanvraag: 2477 dieren (48%)
Als matig beoordeeld na inzet: 24 dieren (11,9%)

Als ernstig in aanvraag: 774 dieren (15%)
Als ernstig beoordeeld na inzet: 26 dieren (12,9%)

Afwijking: n.v.t.

3 De 3V's

3.1 Vervanging

Zijn er tijdens het project voor het project relevante mogelijkheden voor vervanging naar voren gekomen?

- Zo ja, welke?

- Zo ja, in hoeverre heeft u deze kunnen toepassen in het project?

-Zo ja, in hoeverre zijn deze mogelijkheden relevant voor toekomstig onderzoek?

Vervanging:

- Humane celkweekmodellen en netwerkanalyses zijn veelbelovende alternatieven voor dierproeven.
- In dit project is ingevroren hersenmateriaal succesvol gebruikt, wat het gebruik van proefdieren vermindert.

Er zijn de laatste decennia significante ontwikkelingen gaande binnen ons vakgebied met betrekking tot humane celkweek modellen. Deze modellen bieden de mogelijkheid om op een patiënt-specifieke wijze de effecten van Alzheimer-pathologie op cellulaire processen te onderzoeken. Verder is er tegenwoordig een toenemende trend in het uitvoeren van netwerk analyses op basis van neuronale activiteit. Deze netwerkanalyses zullen in de toekomst (deels) vervangen kunnen worden door *in-silico* modellen. Verdere ontwikkelingen op het gebied van humane en *in-silico* modellen zullen veelbelovend zijn met betrekking tot het vervangen van dierexperimenten in de toekomst.

Deze modellen zijn echter nog niet toegepast in het huidige project omdat ze het ziekteproces momenteel nog onvoldoende nabootsen. Wel zijn een aantal andere maatregelen genomen tijdens dit project die hebben geleid tot "vervanging". Gedurende de looptijd van het project is gebleken dat voor diverse experimenten reeds ingevroren en opgeslagen hersenmateriaal met succes kon worden ingezet. Met name bij experimenten waarbij immunokleuringen en genexpressie werden geanalyseerd, heeft deze benadering positieve resultaten opgeleverd. De integratie van deze methode gedurende het project heeft bijgedragen aan de vermindering van het aantal gebruikte proefdieren. Het systematisch inventariseren van beschikbaar hersenmateriaal voorafgaand aan het onderzoek biedt een effectieve strategie om de behoefte aan proefdieren in toekomstige studies te minimaliseren.

3.2 Vermindering

Zijn er tijdens het project voor het project relevante mogelijkheden voor verdere vermindering naar voren gekomen?

- Zo ja, welke?

- Zo ja, in hoeverre heeft u deze kunnen toepassen in het project?

- Zo ja, in hoeverre zijn deze mogelijkheden relevant voor toekomstig onderzoek?

- Was het vooraf ingeschatte aantal dieren per proefgroep optimaal voor betrouwbare statistische analyse?

Vermindering:

- Technologische ontwikkelingen, zoals multi-electrode arrays en RNA-sequencing, versnellen data-acquisitie en verminderen de afhankelijkheid van proefdieren.

- Nieuwe inzichten in statistische analyses bieden gerichtere experimenten en verminderen de behoefte aan proefdieren.

- Systematische inventarisatie van beschikbaar hersenmateriaal minimaliseert het benodigde aantal proefdieren.

Recente technologische ontwikkelingen in ons vakgebied zullen in toenemende mate bijdragen aan de vermindering van het aantal benodigde proefdieren. Het wordt steeds belangrijker en eenvoudiger om uitgebreide hoeveelheden data te verzamelen, waardoor we niet alleen naar biologische processen en activiteiten op cellulair niveau kunnen kijken, maar ook naar het effect van pathologie op cel-cel interacties, netwerkactiviteit en functionaliteit. De ontwikkeling van innovatieve onderzoekstechnieken, zoals multi-electrode arrays en single cell RNA sequencing, maakt dit mogelijk door gelijktijdig de activiteit en genexpressie van talrijke cellen te meten. Deze technieken, die momenteel nog in opkomst zijn, zullen in de toekomst de verzameling van een aanzienlijke hoeveelheid data mogelijk maken in een fractie van de tijd, wat zal leiden tot een afname in de afhankelijkheid van proefdieren.

Naast de ontwikkeling van nieuwe technieken zijn er voortdurend nieuwe inzichten met betrekking tot het uitvoeren van statistische en meta-analyses (bijv. *Bonapersona et al., Increasing the statistical power of animal experiments with historical control data, Nat. Neurosci., 2021*). Deze inzichten zullen bijdragen aan het gericht uitvoeren van dierexperimenten en een vermindering in het aantal benodigde controle dieren.

Deze aspecten zijn tot dusver niet geïmplementeerd in dit project, voornamelijk vanwege de praktische haalbaarheid, omdat veel technieken op het gebied van functionele neuron-glia interactie nog verder ontwikkeld moeten worden. Daarnaast zijn de omics technologieën zeer kostbaar, en was hier niet voldoende projectfinanciering voorhanden. Wel zijn een aantal andere maatregelen genomen die hebben geleid tot vermindering van het aantal proefdieren. In het proces van *ex-vivo* elektrofysiologische metingen hebben we herhaalde metingen uitgevoerd op dezelfde hersenplakjes en cellen, wat aanzienlijk heeft bijgedragen aan het verminderen van het aantal vereiste proefdieren. Daarnaast hebben we het gebruikte weefsel geconserveerd door het in te vriezen, waardoor het later kon worden gebruikt voor aanvullende experimenten zoals immunokleuringen en genexpressie-analyses. Deze aanpak resulteert niet alleen in een vermindering van het aantal proefdieren voor diverse experimenten, maar maakt ook correlatie van resultaten tussen verschillende experimenten mogelijk. Voor het verkrijgen van de GFAP^{-/-}VIM^{-/-} muislijn hebben we een doelgerichte aanpak gevolgd, waarbij GFAP^{+/-}VIM^{+/-} muizen zijn teruggekruist op een C57BL/6 achtergrond. Deze terugkruising werd versneld met behulp van het "speed congenics" programma aangeboden door Charles River, waardoor we binnen slechts 5 generaties de beoogde muizenlijn verkregen, in plaats van de gebruikelijke meer dan 10 generaties.

Voor alle uitgevoerde experimenten en gevraagde werkprotocollen zijn poweranalyses uitgevoerd waarbij bovenstaande punten zijn

meegenomen. Dit heeft er toe geleid dat het aantal ingeschatte dieren per proefgroep lager is uitgevallen dan oorspronkelijk ingeschat.

3.3 Verfijning

- Zijn er tijdens het project voor het project relevante mogelijkheden voor verdere verfijning naar voren gekomen?
- Zo ja, welke?
- Zo ja, in hoeverre heeft u deze kunnen toepassen in het project?
- Zo ja, in hoeverre zijn deze mogelijkheden relevant voor toekomstig onderzoek?
- Is de monitoring van het dierenwelzijn adequaat gebleken?
- Kunnen de criteria voor humane eindpunten verfijnd worden?

Verfijning:

- Aanpassingen in gedragsexperimenten en toedieningsmethoden verminderen stress en ongerief.
- Continue monitoring van dierenwelzijn en effectieve criteria voor humane eindpunten dragen bij aan verbetering van proefmethoden.

Er vinden voortdurend ontwikkelingen plaats op het gebied van het verfijnen van dierproeven, bijvoorbeeld de ontwikkeling van niet-invasieve beeldvormende technieken, verbeterde pijnverlichtingsmethoden, en het helder vaststellen, monitoren en updaten van humane eindpunten. In dit project zijn verschillende strategieën toegepast om proefdierexperimenten te verfijnen.

Gedragsexperimenten voor ruimtelijk geheugen bij muizen zijn uitgevoerd, traditioneel met de Morris Water Maze, maar vanwege mogelijk ongerief voor de dieren is overgeschakeld naar de Barnes Maze, algemeen beschouwd als een diervriendelijker alternatief.

Daarnaast is, waar mogelijk, gekozen voor orale toediening van teststoffen in plaats van intraperitoneale injecties. Muizen zijn, indien haalbaar, in hun thuishok gelaten tijdens experimentele behandelingen, met behulp van tussenschotten om scheiding tijdens de behandeling te garanderen. Bovendien is gebruikgemaakt van "transfer buizen" voor het verplaatsen van dieren tijdens experimentele handelingen, wat als een minder stressvolle ervaring wordt beschouwd in vergelijking met oppakken met de handen.

Het welzijn van de dieren is dagelijks gecontroleerd gedurende het project en er zijn geen onvoorziene afwijkingen geconstateerd. De vooraf genoemde criteria voor humane eindpunten zijn afdoende gebleken en kunnen ook gebruikt worden voor toekomstig onderzoek.

4 Strategie

4.1 Voldeden de diermodellen aan de verwachtingen?

Licht uw antwoord toe.

- Indien de diermodellen niet voldeden, beschrijf wanneer dit werd signaleerd, of de modellen zijn aangepast en of besloten is de proeven (tijdelijk) te stoppen?

Tijdens dit project hebben wij twee muislijnen gebruikt.

We hebben gewerkt met het transgene APP^{swe}/PSEN1^{dE9} (APP/PS1) muismodel voor de ziekte van Alzheimer om Alzheimer-gerelateerde processen te onderzoeken. Dit dubbel-transgene model vertoont Alzheimer-pathologie-kenmerken, zoals eiwitophopingen en ontstekingsreacties in astrocyten en microglia, zonder duidelijk zichtbaar ongemak voor de dieren. Wildtype dieren afkomstig uit hetzelfde nestjes dienden als controle groepen.

Om het effect van astrocyte ontsteking te bepalen, hebben we gebruik gemaakt van APP/PS1 muizen met knock-outs voor GFAP en GFAP/VIM (APP-PS1:GFAP^{-/-} en APP-PS1:GFAP^{-/-}VIM^{-/-}). Voor controle condities gebruikten we C57BL/6J dieren met knock-outs voor GFAP en GFAP/VIM (GFAP^{-/-} en GFAP^{-/-}VIM^{-/-}).

Wat betreft de ontwikkeling van pathologische kenmerken, voldeden deze lijnen aan onze verwachtingen. Er werden geen duidelijke

functionele verschillen waargenomen waardoor vervolg experimenten tijdelijk zijn stopgezet.

4.2 Waren de in de aanvraag beschreven keuzemomenten en de criteria op basis waarvan keuzes werden gemaakt voldoende specifiek om onnodig gebruik en/of ongerief van dieren te voorkomen?

In de projectaanvraag worden specifieke keuzemomenten genoemd, waarbij de criteria voor deze keuzes zijn overwogen om onnodig gebruik en ongerief van dieren te voorkomen. Voorbeelden van keuzemomenten zijn:

1. Evaluatie van Diermodellen

De gebruikte diermodellen in dit project behoren tot de veelgebruikte modellen binnen het vakgebied. Ze zijn bewust geselecteerd vanwege hun relevante pathologische kenmerken die direct verband houden met de moleculaire mechanismen van de ziekte van Alzheimer. Deze doelgerichte keuze is toegepast om onnodig gebruik van proefdieren in andere, minder specifieke modellen te voorkomen. Wat betreft de ontwikkeling van pathologische kenmerken, voldeden deze lijnen aan onze verwachtingen.

2. Relevantie van geïdentificeerde (moleculaire) targets voor het ziekteproces

Een belangrijk keuzemoment in ons project betrof de beoordeling van de relevantie van geïdentificeerde (moleculaire) targets voor het ziekteproces, met als doel onnodig gebruik van dieren te voorkomen. Om deze beoordeling uit te voeren, hebben we gebruik gemaakt van literatuurstudies, meta-analyses, en systematische reviews (*zie referenties hieronder). Deze aanpak stelde ons in staat om de relevantie van de geïdentificeerde targets vooraf in te schatten en vervolgens meer gerichte experimenten uit te voeren die direct betrekking hebben op processen die cruciaal zijn voor het ziekteproces.

Een belangrijke kanttekening hierbij is dat deze voorafgaande beoordeling van relevantie met name van toepassing is wanneer de geïdentificeerde targets al eerder in verband zijn gebracht met het ziekteproces. In gevallen waar targets nog niet eerder zijn geïdentificeerd, erkennen we dat het vooraf inschatten van hun relevantie een uitdaging kan vormen. Als een leerpunt voor toekomstige projecten stellen we voor om een gestandaardiseerde lijst van criteria te definiëren op basis waarvan de relevantie van nieuwe eiwitten, genen, of processen kan worden beoordeeld. Dit zal niet alleen de voorafgaande inschatting van relevantie vergemakkelijken, maar ook bijdragen aan een meer doelgerichte benadering bij het bepalen van de experimentele focus, met als resultaat een verdere vermindering van onnodig gebruik van proefdieren.

*Referenties:

The Role of Astrocytes in Synapse Loss in Alzheimer's Disease: A Systematic Review. Hulshof LA, van Nuijs D, Hol EM, Middeldorp J. Front Cell Neurosci. 2022 Jun 16;16:899251. doi:10.3389/fncel.2022.899251.

Reactive astrocytes as treatment targets in Alzheimer's disease- Systematic review of studies using the APPswePS1dE9 mouse model. Smit T, Deshayes NAC, Borchelt DR, Kamphuis W, Middeldorp J, Hol EM. *Glia*. 2021 Aug;69(8):1852-1881. doi: 10.1002/glia.23981.

3. Betrouwbaarheid en consistentie van data verkregen uit beschikbare modellen

De betrouwbare en consistente verwerving van data vormt een belangrijk aspect om onnodig gebruik van dieren te vermijden. Het streven naar een consistente dataverzameling draagt niet alleen bij aan een efficiënter gebruik van proefdieren, maar vergemakkelijkt ook het verkrijgen van meer data met minder variabiliteit. Onze benadering om dit te waarborgen omvatte het gebruik van gestandaardiseerde technieken, waarbij zorgvuldig rekening werd gehouden met de te verwachten effectgroottes.

Bij het bepalen van de verwachte effectgroottes baseerden we ons vooral op bestaande literatuur en verkregen inzichten uit pilotstudies. Deze voorbereidende stappen stelden ons in staat om een poweranalyse uit te voeren, wat resulteerde in het vaststellen van het optimale aantal proefdieren voor elk experiment. Deze systematische aanpak heeft met succes voorkomen dat onnodig veel dieren werden ingezet, waarmee zowel ethische overwegingen als wetenschappelijke nauwkeurigheid werden gegarandeerd.

Deze benadering zal ook in toekomstige projecten consequent worden toegepast.

5 Verworvenheden

(wat heeft het project opgeleverd?)

- 5.1 In hoeverre zijn de directe doelen van het projectvoorstel bereikt? Indien de directe doelen niet (volledig) bereikt zijn, licht toe waarom niet.

Het overkoepelende doel van dit project was het begrijpen van de moleculaire, cellulaire en fysiologische processen die ten grondslag liggen aan cognitieve beperkingen en het beoordelen van potentiële therapieën, met als doel fundamenteel inzicht te verkrijgen in het ziekteproces van de ziekte van Alzheimer en het identificeren van nieuwe potentiële biomarkers en therapeutische doelen.

De specifieke onderzoeksvragen genoemd in de projectaanvraag zijn:

1. Wat zijn de moleculaire veranderingen in glia op het niveau van het epigenoom, transcriptoom, proteoom en metabooloom?

Dit doel is gedeeltelijk behaald. Niet alle genoemde omics analysis zijn gedaan (metabooloom en epigenoom), omdat we geen projectfinanciering hadden voor alle omics technieken. Dit project heeft geleid tot interessante bevindingen als het gaat om moleculaire veranderingen op het niveau van het transcriptoom en proteoom. Deze bevindingen zijn gepubliceerd in peer-reviewed wetenschappelijke artikelen.

2. Wat zijn de gevolgen van deze veranderingen voor bijvoorbeeld neuron-glia-communicatie, de neurovasculaire eenheid, activiteit van neurale circuits, synaptische plasticiteit, gliafunctie en gedrag?

Een groot deel van de experimenten uitgevoerd op dit project hadden de focus op neuron-glia communicatie, synaptische plasticiteit en de activiteit van neuronale circuits. Experimenten hebben uitgewezen dat de functie van gliacellen (astrocyten/microglia) is aangedaan in een veelgebruikt muismodel in de ziekte van Alzheimer, en dat dit gepaard gaat met veranderingen in neuronale activiteit, gedrag, en cognitie. Deze bevindingen zijn gepubliceerd in peer-reviewed wetenschappelijke artikelen.

3. Kunnen we neurodegeneratie en cognitieve beperking voorkomen, omkeren of stoppen door gerichte aanpak van glia (reactieve en neurogene glia)?

Een deel van onze experimenten hebben zich gefocust op de rol van astrocyten en microglia in het ontstaan van neurodegeneratie en verminderde cognitie. Uit onze resultaten blijkt dat het voorkomen van reactiviteit, met name van microglia, bijdraagt aan het tegengaan van neurodegeneratie en cognitieve achteruitgang. Deze bevindingen zijn gepubliceerd in een peer-reviewed wetenschappelijk artikel. Andere resultaten worden momenteel geanalyseerd en zullen binnenkort worden gepubliceerd.

4. Kunnen we (neuronale, gliale en vasculaire) pathologie beelden met MRI/PET/SPECT-scans en kunnen we de omgekeerde loop van pathologie volgen met nieuwe geneesmiddelen of biologische stoffen in levende muizen?

De eerder genoemde experimenten hebben meer tijd in beslag genomen dan oorspronkelijk gepland. Hierdoor hebben we niet de mogelijkheid gehad om experimenten uit te voeren met het doel neuronale en gliale pathologie te visualiseren met MRI/PET/SPECT-scans.

Gepubliceerde artikelen:

Het werk is gedeeltelijk ook in Amsterdam gedaan op vergunningen aldaar (samenwerking in een consortium/eerder werk van Hol in Amstern).

Prevention of microgliosis halts early memory loss in a mouse model of Alzheimer's disease. Kater MSJ, Huffels CFM, Oshima T, Renckens NS, Middeldorp J, Boddeke EWGM, Smit AB, Eggen BJL, Hol EM, Verheijen MHG. *Brain Behav Immun.* 2023 Jan;107:225-241. doi: 10.1016/j.bbi.2022.10.009.

Calcium signaling in individual APP/PS1 mouse dentate gyrus astrocytes increases ex vivo with A β pathology and age without affecting astrocyte network activity. Huffels CFM, Osborn LM, Cappaert NLM, Hol EM. *J Neurosci Res.* 2022 Jun;100(6):1281-1295. doi: 10.1002/jnr.25042.

Both male and female APP^{swe}/PSEN1^{dE9} mice are impaired in spatial memory and cognitive flexibility at 9 months of age. Hulshof LA, Frajmund LA, van Nuijs D, van der Heijden DCN, Middeldorp J, Hol EM. *Neurobiol Aging.* 2022 May;113:28-38. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2021.12.009.

Amyloid- β plaques affect astrocyte Kir4.1 protein expression but not function in the dentate gyrus of APP/PS1 mice. Huffels CFM, Osborn LM, Hulshof LA, Kooijman L, Henning L, Steinhäuser C, Hol EM. *Glia.* 2022 Apr;70(4):748-767. doi: 10.1002/glia.24137.

Mechanical alterations of the hippocampus in the APP/PS1 Alzheimer's disease mouse model. Antonovaite N, Hulshof LA, Huffels CFM, Hol EM, Wadman WJ, Iannuzzi D. J Mech Behav Biomed Mater. 2021 Oct;122:104697. doi: 10.1016/j.jmbbm.2021.104697.

Early amyloid-induced changes in microglia gene expression in male APP/PS1 mice. Oshima, T, Kater M, Huffels CFM, Wesseling E, Middeldorp J, Hol EM, Verheijen M, Smit AB, Boddeke E, Eggen B. Submitted

The first transcriptional changes in microglia in response to amyloid in APP/PS1 mice. Oshima T, Kater M, Huffels C, Verheijen M, Smit AB, Middeldorp J, Hol EM, Boddeke E, Eggen BJ. In preparation.

Proefschriften:

Lianne Hulshof, (2022). Assessing astrocytes in Alzheimer's disease. DOI: 10.33540/1507

Christiaan Huffels, (2022). Tracing the signals: Unravelling neuron-glia interactions in Alzheimer's disease. DOI: 10.33540/1445

5.2 Zijn er nog andere waardevolle opbrengsten van het project te vermelden?

Dit project heeft niet alleen nieuwe wetenschappelijke inzichten opgeleverd, maar ook waardevolle bijdragen geleverd aan de maatschappij. De bevindingen zijn gedeeld via internationale conferenties en publicaties, waardoor ze toegankelijk zijn voor de wetenschappelijke gemeenschap. Het heeft de basis gelegd voor toekomstig Alzheimeronderzoek door het identificeren van relevante mechanismen en therapeutische doelen. De deelname aan publieksvoorlichting (presentaties, interviews) heeft geleid tot een toename van de bewustwording en biedt perspectieven voor translationele toepassingen. De opbrengsten dragen daarmee bij aan maatschappelijke relevantie en toekomstige ontwikkelingen.

6 Overige aspecten

6.1 Heeft u nog verdere opmerkingen die volgens u relevant zijn voor de beoordeling achteraf van het project?

De coronapandemie heeft er aan bijgedragen dat tijdens een aanzienlijk deel van dit project (2020 - 2021) geen, of in beperkte mate experimenten konden worden uitgevoerd. Ook zijn er minder mensen op dit project aangenomen dan oorspronkelijk ingeschat, vanwege minder projectfinanciering op dierproeven. Dit heeft ertoe geleid dat het totaal aantal gebruikte dieren op dit project aanzienlijk lager is uitgevallen dan vooraf ingeschat.

7 Leerpunten

7.1 Beschrijf wat voor u de belangrijkste leerpunten zijn met betrekking tot het ontwerp van en de uitvoering van toekomstige projecten.

1. Voorafgaand (literatuur) onderzoek: Het belang van uitgebreid literatuuronderzoek voorafgaand aan het project is cruciaal, met het oog op het identificeren van bestaande methoden, modellen, en inzichten om onnodig gebruik van proefdieren te minimaliseren.
2. Efficiënt gebruik van opgeslagen hersenmateriaal: Het succesvol inzetten van ingevroren en opgeslagen hersenmateriaal gedurende het project benadrukt het belang van het identificeren en benutten van bestaande middelen.
3. Definieren van standaardcriteria: Een belangrijk leerpunt voor toekomstige projecten is het vaststellen van gestandaardiseerde criteria om de relevantie van nieuwe eiwitten, genen, of processen te beoordelen. Dit bevordert een gerichtere experimentele aanpak, vermindert onnodig gebruik van proefdieren en maakt de voorafgaande beoordeling van relevantie eenvoudiger.

8 Ondertekening

8.1

Ondertekening door de portefeuillehouder namens de instellingsvergunninghouder. De ondergetekende verklaart:

- dat de beantwoording van de vragen in het formulier Beoordeling achteraf is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam

Datum

Handtekening

