

bevindingen uit DAP1 die puur correlatief van aard zijn. Ander onderzoek toont echter aan dat de omgekeerde projecties van de targetgebieden naar de amygdala ook belangrijk zijn. Daarmee zijn beide directies dus een mogelijkheid, en zullen beide dus getest moeten worden. Daarnaast is het niet mogelijk de experimenten sequentieel uit te voeren omdat de onderzoeker dan niet langer blind is voor de manipulatie (d.w.z. de experimentele groep). Dit zou de resultaten kunnen beïnvloeden. Om deze redenen achten wij het essentieel de voorgestelde experimenten tegelijkertijd uit te voeren. De toename in het aantal dieren dat hiervoor nodig is hebben we al maximaal proberen te beperken door de controle virus groep niet mee te nemen in de manipulaties van de omgekeerde verbindingen en deze te beperken tot een enkel tijdsinterval, omdat we aannemen dat de directionaliteit van de effecten niet verandert over de tijd.

De antwoorden hebben niet geleid tot aanpassing van het wijzigingsverzoek.

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een wijziging van vergunning met nummer AVD1030020186045. Aanvullend advies van de DEC over de wijziging is, in paarse tekst, ingevoegd in de tekst van het advies voor de laatste wijziging hieronder.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er is geen betrokkenheid van DEC-leden bij deze projectaanvraag, waardoor onafhankelijkheid en onpartijdigheid zijn gewaarborgd.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze aanvraag richt zich op het meten van de effecten van de toediening van noradrenaline en corticosteron op die mechanismen in het brein die ten grondslag liggen aan de accuraatheid/juistheid van het geheugen en het verloop daarvan op de lange termijn na zowel emotioneel ontwrichtende als emotioneel neutrale informatie. Ten gevolge van stress worden twee signaaltransductieroutes in ons brein geactiveerd. Aan de ene kant activeert stress snel het orthosympathische zenuwstelsel, wat resulteert in het vrijkomen van catecholamines zoals adrenaline en noradrenaline (NA). De catecholamines komen niet rechtstreeks in het brein, maar verhogen de NA niveaus in de hersenen door activatie van noradrenerge celgroepen binnen de nucleus tractus solitarius (NTS) en de locus coeruleus (LC). De toename van de noradrenerge signalering wordt in deze projectaanvraag bewerkstelligd door de toediening van yohimbine. Aan de andere kant kent stress ook een vertraagde respons die resulteert in de ophoping van corticosteroïden en activatie van de hypothalamus-schildklier-bijnier-corticoïde tot gevolg heeft. De corticosteroïden (CORT, corticosteron in knaagdieren, cortisol in mensen) kunnen wel direct opgenomen worden in het brein en binden aan receptoren die het signaal doorgeven. Daarnaast kunnen ze de activiteit van een groot aantal genen beïnvloeden die betrokken zijn bij een veelvoud aan cellulaire processen zoals energie verbruik, cellulair metabolisme, eiwitsynthese en turnover, signaal transductie, neuronale connectiviteit, en neurotransmissie zowel induceren als onderdrukken. Door middel van deze mechanismen zijn corticosteroiden in staat de neuronale processing op een tijdsafhankelijke wijze te beïnvloeden om zodoende de meest adaptieve vorm van stress respons te produceren. Een indrukwekkende hoeveelheid literatuur geeft aan dat zowel NA als CORT de effecten van stress en emotionele agitatie op de verbetering van

geheugenconsolidatieprocessen mediëren door aan te grijpen op een netwerk van interacterende hersengebieden, waaronder de basolaterale amygdala, de dorsale hippocampus, en de insulaire en prefrontale cortex. De aanvrager wil met de experimenten beschreven in deze projectaanvraag onderzoeken hoe de stresshormonen NA en CORT de geheugenprocessen die ten grondslag liggen aan de accuraatheid/juistheid van het geheugen versus de veralgemenisering van het geheugen, moduleren. Daartoe stellen ze zich 4 subdoelen:

1. Bepaling van de dosis-afhankelijke effecten van de twee stresshormonen NA en CORT op de accuraatheid en de sterkte van herinneringen over de tijd
2. Het onderzoeken van de dosis-afhankelijke effecten van de twee stresshormonen NA en CORT op de neuronale representatie binnen het netwerk van de interacterende hersengebieden
3. Onderzoeken van de mediërende rol van een neurotrofe factor (BDNF) in de effecten van deze twee stresshormonen op de accuraatheid van de herinneringen versus de veralgemenisering
4. Het oorzakelijke verband vinden voor de modulatie van het geheugencircuit in het brein in het bewerkstelligen van de effecten van deze twee stresshormonen op de accuraatheid van de herinneringen versus de veralgemenisering

Om herinneringen en de hersenmechanismen die eraan ten grondslag liggen op een gecontroleerde manier te kunnen meten wordt gebruik gemaakt van muismodellen die twee geheugentaken zullen ondergaan, één neutrale taak en één emotionele taak, beide afhankelijk van een ander geheugencircuit in het brein, waarin de sterkte en accuraatheid van de herinneringen onafhankelijk van elkaar bepaald kunnen worden.

De onderzoekers willen middels dit wijzigingsverzoek een derde geheugentaak gebruiken, die emotioneel gezien neutraal is en context afhankelijk (episodische geheugentaak). De hierboven beschreven geheugentaken verschillen namelijk niet alleen wat betreft emotionele lading, maar ook wat betreft geheugentype (episodisch of niet-episodisch). De derde taak wordt toegevoegd om te kunnen onderscheiden of verschillen in activiteitspatronen of specifieke pathways in de hersenen worden veroorzaakt door het verschil in geheugentype of door verschil in emotionele lading die is verbonden aan de taak. De commissie beschouwt dit als een wetenschappelijke verfijning van de aanvraag.

De voorgestelde wijziging betreft twee onderdelen, namelijk het vergroten van de onderzoeksgroepen enerzijds en het toevoegen van drie nieuwe experimenten en een muizenlijn waarmee de oorspronkelijke vraagstellingen beter beantwoord kunnen worden. Het vergroten van de onderzoeksgroepen is noodzakelijk, omdat meerdere groepen met elkaar vergeleken worden en de gemeten variatie in de uitkomstparameters groter is dan eerder ingeschat. Hierdoor zijn er meer dieren nodig om tot wetenschappelijk betrouwbare uitspraken te komen. Middels deze wijziging worden tevens fiberfotometrische experimenten toegevoegd waarmee onderzoeksdoelen 2 en 4 aanvullend en preciezer onderzocht kunnen worden. Met de in het oorspronkelijke project opgenomen immediate early gene expressie kan de activiteit in het hele brein worden onderzocht, waardoor duidelijk wordt welke gebieden relevant zijn. Geselecteerde gebieden kunnen vervolgens met fiberfotometrie worden onderzocht waardoor preciezere metingen van neuronale activiteit (vooral wat betreft tijd) mogelijk zijn. Deze nieuwe experimenten zijn daarmee een verdere wetenschappelijke verfijning van de aanvraag. Middels deze wijziging worden ook experimenten toegevoegd met een nieuwe muizenlijn en DREADD-manipulaties die het mogelijk maken om te onderzoeken in welke hersengebieden noradrenaline effect heeft op de accuraatheid van het geheugen en in welke hersengebieden op de sterkte van het geheugen. Het gezochte oorzakelijke verband uit doelstelling 4 is namelijk aangetoond, maar onduidelijk is nog welke hersengebieden en neuronale projecties daarbij precies betrokken zijn. De commissie is van mening dat het relevante experimenten betreft die belangrijke informatie opleveren waarmee de oorspronkelijke vraagstellingen preciezer beantwoord kunnen worden.

Dit wijzigingsverzoek bevat drie onderdelen, namelijk het corrigeren van de aantallen extra

dieren aangevraagd in het vorige wijzigingsverzoek, het toevoegen van een andere moeilijkheidsgraad aan de gedragstesten in bijlage 1, en extra dierproeven om de gerichtheid van een effect vast te kunnen stellen.

Bij het vorige wijzigingsverzoek is een vergissing gemaakt bij de berekening van het benodigde aantal dieren, waardoor er 1590 dieren te weinig zijn aangevraagd. Deze vergissing is door geen van de partijen opgemerkt. De commissie is van mening dat de vergissing dient te worden gecorrigeerd. Het grotere aantal dieren heeft geen gevolgen voor de uitkomst van de ethische afweging die destijds is gemaakt voor het wijzigingsverzoek.

Middels dit wijzigingsverzoek wordt een tweede moeilijkheidsgraad van de gedragstesten toegevoegd. Het blijkt niet mogelijk om de muizen zodanig te trainen op de gedragstaken dat zowel een verbetering als een verslechtering van toegediende stresshormonen op hun prestatie meetbaar is. Om zowel negatieve als positieve effecten van stresshormonen op geheugentaken vast te kunnen stellen, dienen de taken op twee moeilijkheidsniveaus uitgevoerd te worden, waardoor 1260 extra dieren nodig zijn. De commissie is van mening dat deze extra dieren noodzakelijk zijn om de oorspronkelijke vraagstelling te kunnen beantwoorden.

De experimenten in bijlage 3 zijn bedoeld om causaliteit vast te stellen in de interacties tussen hersengebieden betrokken bij accuraatheid van de herinneringen versus de veralgemenisering (onderzoeksvraag 4). Aangezien er, blijkens voortschrijdend inzicht, tussen de amygdala en de onderzochte hersengebieden (hippocampus, insula, mediane prefrontale cortex) kennelijk sprake is van projecties in beide richtingen, dienen beide richtingen getest te worden om de gerichtheid van de interacties vast te kunnen stellen. In de vorige wijziging werden dieren gevraagd voor het testen, met behulp van DREADD-experimenten, van slechts één van beide projecties. Hierdoor zijn meer dieren nodig (900) dan ten tijde van de vorige wijziging voorzien. Vaststelling van die directionaliteit is een belangrijk onderdeel van het bepalen van de causaliteit van een waargenomen effect.

Samenvattend is de commissie van mening dat de gevraagde wijziging nog binnen de reikwijdte van de oorspronkelijke aanvraag vallen. Het betreft experimenten / extra dieren die noodzakelijk zijn om eerder geformuleerde (en in de vergunning opgenomen) onderzoeksvragen te kunnen beantwoorden. Er is geen sprake van het toevoegen van onderzoeksvragen of subdoelstellingen.

De commissie constateert dat deze aanvraag een concrete, goed afgebakende doelstelling heeft en getypeerd kan worden als een project. De opzet komt het best overeen met voorbeeld 4B uit de 'Handreiking invulling definitie project'. De verschillende subdoelen zijn noodzakelijk om de doelstelling te behalen. Het is niet mogelijk om de individuele doelen te toetsen, omdat er sprake is van onderlinge afhankelijkheid en zij tezamen een geïntegreerd begrip van de moleculaire mechanismen geven. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft, zowel binnen de doelstellingen en bijlagen dierproeven, als tussen de doelstellingen, beschreven op basis van welke criteria zij zal besluiten het project voort te zetten. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.* De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed. De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.

2. Voor zover de DEC weet is er geen "tegenstrijdige" wetgeving die het uitvoeren van de experimenten in de weg zou kunnen staan. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.* De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed. De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.* De voorgestelde wijziging heeft hierop geen

invloed. De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is om meer inzicht te krijgen in de invloed van de stresshormonen noradrenaline en corticosteron op de kwaliteit van het geheugen en in de daarbij betrokken geheugencircuits in het brein. Het uiteindelijke doel is om wanneer men weet hoe de stresshormonen de accuraatheid van het geheugen beïnvloeden op zowel de korte als lange termijn, de processen die ten grondslag liggen aan het ontwikkelen van een Post Traumatische Stress Stoornis (PTSS) bij patiënten te begrijpen en, op termijn, een therapie te ontwikkelen voor deze patiënten. In patiënten die lijden aan post traumatische stress stoornis (PTSS) is te zien dat de herinnering aan hun trauma vaak feitelijk onjuist is, en dat deze herinnering te pas en te onpas opgehaald wordt, dus ook onder omstandigheden die vaak maar zeer beperkt op de traumatische gebeurtenis lijken. Er wordt verondersteld dat deze generalisatie van stressvolle traumatische herinneringen naar andere omstandigheden bijdraagt aan de ontwikkeling van PTSS. Daarom is het erg belangrijk te begrijpen hoe stresshormonen de accuraatheid (d.w.z. de feitelijke juistheid) van herinneringen beïnvloeden. Het is hierbij belangrijk te weten dat herinneringen normaal ook minder accuraat en gedetailleerd worden met het verstrijken van de tijd. De herinnering aan emotionele of traumatische gebeurtenissen, vooral in patiënten met PTSS, lijkt echter gevoelsmatig maar weinig te vervagen met het verstrijken van de tijd. Het is tot op heden niet bekend of dit ook echt zo is en hoe dit komt. *Voorts is niet bekend of dezelfde of verschillende corticale gebieden zijn betrokken bij de langetermijn opslag van emotionele gebeurtenissen en van neutrale gebeurtenissen. Door een episodische geheugentaak toe te voegen die plaatsvindt onder emotioneel neutrale omstandigheden (in aanvulling op de episodische geheugentaak onder emotionele omstandigheden) kan dit worden onderzocht.* Bovendien kan met fiberfotometrie nauwkeuriger worden vastgesteld of veranderingen in hersenactiviteit plaatsvinden tijdens het daadwerkelijk oproepen van bestaande informatie uit het geheugen, of dat die door het opslaan van nieuwe informatie tijdens de periode na de retentietest worden veroorzaakt. Daarnaast kan met behulp van een nieuwe muizenlijn en DREADD-manipulaties bepaald worden in welke hersengebieden noradrenaline effect heeft op de accuraatheid van het geheugen en in welke gebieden op de sterkte van het geheugen. Er is daarom binnen deze aanvraag een reële relatie tussen het doel van deze projectaanvraag en het uiteindelijke doel. De aanvrager heeft duidelijk gemaakt dat de kennis van de werkingsmechanismen, signaal transductie pathways en betrokken neurologische circuits in het brein als effecten van de toegenomen stresshormonen NA en CORT nog zeer beperkt is, dat deze kennis nodig is voor de ontwikkeling van nieuwe behandelingen, en dat er behoefte is aan nieuwe behandelingen. Naar de mening van de DEC is het doel van deze projectaanvraag daarom gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.* De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed. De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.
5. De belangrijkste belanghebbenden in deze projectaanvraag zijn de proefdieren, de onderzoekers en de doelgroep/patiënten. Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast (zie C11 en C12). De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan. Uiteindelijk zullen ze in het kader van het onderzoek gedood worden. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven. Voor de onderzoekers geldt dat het publiceren van belangrijke nieuwe wetenschappelijke inzichten resulteert in een goede wetenschappelijke reputatie, hetgeen vaak de sleutel is voor het verkrijgen van nieuwe onderzoeksmiddelen en mogelijkheden. Dit kan door de onderzoeker

zelf van belang geacht worden, maar dient naar de mening van de DEC geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren. Het gaat uiteindelijk om de vraag of dit onderzoek belangrijke maatschappelijke en wetenschappelijke doelen dient (gezondheid, kennis).

Voor patiënten is dit onderzoek indirect en op de lange termijn van belang, omdat het kan leiden tot de ontwikkeling van betere diagnostiek en/of nieuwe behandelingen voor PTSS. PTSS is een moeilijk te behandelen aandoening die de patiënt sterk belemmert in diens sociaal en emotioneel functioneren. Gerichtte behandeling op basis van mechanistisch inzicht kan bijdragen aan een betere diagnostiek en behandeling. Dit kan er toe leiden dat de patiënt weer gezond wordt, dan wel een betere kwaliteit van leven heeft. Kunnen beschikken over adequate behandelingen voor patiënten die lijden aan PTSS is van groot belang voor de samenleving. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.* De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed. De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.

6. De aanvrager maakt geen melding van onbedoelde nadelige effecten op het milieu. Er is geen aanleiding voor de DEC om te verwachten dat die er zullen zijn. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.* De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed. De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd. De aanvrager heeft zeer veel ervaring met de voorgestelde technieken (gedragsstudies, virale injecties in het brein, immunohistochemie in combinatie met de gebruikte transgene reporterlijn, en de beschreven iDISCO+ techniek om patronen van neurale activiteit in het gehele brein te kunnen volgen). Alle benodigde faciliteiten en expertise zijn aanwezig. Het voorgaande onderzoek heeft geresulteerd in tal van publicaties in goede wetenschappelijke tijdschriften. De commissie is daarom overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De aanvrager beschikt over voldoende kennis en kunde, onder andere op grond van een artikel 9 kwalificatie, om te kunnen voldoen aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent het verrichten van dierproeven. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.* De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed. De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.
8. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten logisch aan bij de doelstelling(en) (zie C4). Bovendien heeft deze groep veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De DEC is dan ook van mening dat het project goed is opgezet, en dat deze strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling(en) binnen het kader van het project. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.* Met de voorgestelde wijziging worden experimenten toegevoegd waarmee de oorspronkelijke vraagstellingen preciezer beantwoord kunnen worden. De commissie beschouwt dit als een verdere wetenschappelijke verfijning. De commissie heeft de onderzoeker verzocht toe te lichten of het project met de toename van het aantal dieren voor onderdeel 1 nog wel uitvoerbaar blijft binnen de toegekende looptijd. De onderzoeker heeft uitgelegd welke experimenten al zijn afgerond, en dat er meerdere onderzoekers werkzaam zijn op dit project, en zij heeft een grove planning aangeleverd voor de rest van de looptijd. Bovendien is de beslissing tot uitvoering van vervolgentoelagen onderhevig aan voortschrijdend inzicht op basis van de behaalde resultaten in voorgaande experimenten, waardoor bijvoorbeeld onderzoek naar effecten op lange termijn in de object recognition taak komt te vervallen. De voortgang tot nu toe, de vier onderzoekers die daaraan werken, de realistische planning en de zorgvuldige afstemming van vervolgentoelagen hebben de commissie overtuigd dat er niet meer dieren worden gebruikt dan strikt noodzakelijk, en dat het onderzoek kan worden afgerond binnen de looptijd van het project.

Welzijn dieren

9. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
 - Niet-menselijke primaten (10e)
 - Dieren in/uit het wild (10f)
 - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
 - Zwerfdieren (10h)
 - Hergebruik (1e lid 2)
 - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
 - x Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
 - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c lid 3)
- De aanvrager heeft als volgt onderbouwd dat dit noodzakelijk is: het toedienen van een voetschok aan de muizen, noodzakelijk in de 'inhibitory avoidance discrimination' taak, levert naar verwachting matig ongerief op voor de dieren omdat zij gedurende een heel korte periode pijn hiervan zullen ondervinden. Het ondervinden van die pijn is echter kritisch en essentieel voor de test. De DEC is het eens met deze onderbouwing. Bij de operationele procedure van het implanteren van een canule in de hersenen wordt wel adequate anesthesie en analgesie toegepast. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed. De commissie gaat ervan uit dat de toegevoegde gedragstest maximaal licht ongerief zal veroorzaken.* De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed. De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.
10. In de aanvraag wordt, om wetenschappelijke redenen afgeweken van de eisen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU betreffende de huisvesting en verzorging van de dieren. De dieren zullen allemaal gedurende langere tijd (1-2 mnd) individueel gehuisvest worden. De aanvrager geeft daarvoor de volgende reden: individuele huisvesting is noodzakelijk na het implanteren van de breincanules. De canules worden afgedicht met een metalen pin, die de dieren bij groepshuisvesting bij elkaar zullen verwijderen, waardoor de kans op infectie en mutilatie toeneemt. Omdat individuele huisvesting ook een effect heeft op de gedragsstudies, individuele huisvesting in bijlage 2 noodzakelijk is en de experimenten met elkaar vergelijkbaar moeten zijn, is individuele huisvesting van alle dieren noodzakelijk. En last but not least zal individuele huisvesting de effecten van sociale hiërarchie en de effecten van de volgorde waarin de dieren aan het experiment onderworpen worden, wegnemen. De DEC is van mening dat de gegeven redenen voldoende onderbouwing hiervoor zijn. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.* De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed. De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief voor alle dieren is ingeschat als matig. Voor de dieren in bijlage 1 wordt dit veroorzaakt door de individuele huisvesting en de blootstelling aan de voetschok, en voor de dieren in bijlage 2 en 3 wordt dit veroorzaakt door de individuele huisvesting, het bijkomen uit narcose na de operatie en het ondergaan van de gedragstesten. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.* De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed. De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.
12. De integriteit van dieren wordt aangetast door het instrumentele gebruik van de dieren dat inherent is aan het doen van dierproeven. De integriteit van dieren wordt fysiek en mentaal aangetast door het toedienen van een voetschok en het toedienen van injecties en voor een deel van de dieren (bijlage 2+3) het ondergaan van een operatie. De integriteit van dieren wordt

mentaal aangetast door het ondergaan van de individuele huisvesting en de gedragstesten. Het dier wordt hierdoor gehinderd in zijn normale gedrag en de zelfredzaamheid neemt af. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.* De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed. De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.

13. De criteria voor humane eindpunten zijn voldoende specifiek gedefinieerd en toegesneden op het experiment. Het percentage dieren dat een humaan eindpunt zal bereiken is naar verwachting zeer laag. Dit is op basis van eigen ervaring en gegevens uit de wetenschappelijke literatuur ingeschat. Voor de experimenten in bijlage 1 (1260 dieren) wordt niet verwacht dat er humane eindpunten bereikt zullen worden. Voor de experimenten in bijlage 2 (2680 dieren) wordt verwacht dat < 2% van de dieren een humaan eindpunt zal bereiken ten tijde van de herstelfase na de operatie. In bijlage 3 (1717 dieren) wordt eveneens verwacht dat < 2% van de dieren een humaan eindpunt zal bereiken ten tijde van de herstelfase na de operatie. De commissie is het eens met deze inschatting en de gehanteerde humane eindpunten. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.* De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed. De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De muis is het evolutionair gezien een geschikte diersoort waarin gedragsstudies kunnen worden uitgevoerd die conclusies rechtvaardigen over vergelijkbare situaties bij mensen. In tegenstelling tot bij mensen, kunnen de omgevingsfactoren, zoals het exacte moment en de exacte intensiteit en duur van de blootstelling van de stimulus, bij de muis volledig gecontroleerd worden. Het bestuderen van de neuronale circuits die betrokken zijn in de gedragsstudies kunnen alleen *in vivo* uitgevoerd worden en kennen geen *in vitro* of *in silico* alternatieven. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.* De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed. De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.
15. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en is proportioneel ten opzichte van de gekozen onderzoeksopzet en de looptijd. De onderzoekers hanteren een goede strategie om ervoor te zorgen dat er met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een wetenschappelijk betrouwbaar resultaat kan worden verkregen en de onderzoekers hebben goed gemotiveerd welke experimentele en controle groepen absoluut noodzakelijk zijn voor de experimenten. *De toegevoegde gedragstest dient uitgevoerd te worden met aparte groepen dieren, omdat de retentie-intervallen en de te gebruiken medicatie verschillen tussen de testen. Het totaal aantal benodigde dieren neemt derhalve toe door de voorgestelde wijziging.* In de praktijk blijkt de variatie in de metingen groter en de te gebruiken statistiek complexer dan vooraf ingeschat, waardoor de groepen vergroot moeten worden om betrouwbare uitspraken te kunnen doen over verschillen tussen groepen. Met behulp van de toegevoegde fiberoptometrie en met DREADD-experimenten kunnen preciezere metingen gedaan worden van neuronale activiteit in hersengebieden die betrokken zijn bij het door de stresshormonen NA en CORT gemedieerde effect op de accuraatheid en sterkte van herinneringen. Het totaal aantal benodigde dieren neemt wederom toe door de voorgestelde wijziging. Bij het vorige wijzigingsverzoek is een vergissing gemaakt bij de berekening van het benodigde aantal dieren, die nu wordt gecorrigeerd. Voorts blijkt het niet mogelijk om de muizen zodanig te trainen op de gedragstaken dat zowel positieve als negatieve invloeden van toegediende stresshormonen op hun prestaties op die gedragstaken meetbaar zijn. Alle gedragstaken dienen daarom bij twee moeilijkheidsgraden uitgevoerd te worden, zodat deze effecten wel meetbaar zijn. Ook voor het bepalen van de directionaliteit (in het kader van het vaststellen van causaliteit) zijn meer dieren nodig dan eerder aangevraagd. De onderzoekers hebben het aantal middels dit wijzigingsverzoek aangevraagde extra dieren zo veel als mogelijk getracht te beperken, door bepaalde

controlegroepen achterwege te laten en niet alle tijdsintervallen te onderzoeken. De commissie is van mening dat de aangevraagde extra dieren noodzakelijk zijn voor het beantwoorden van de onderzoeksvragen. De onderzoekers maken goede keuzes om het aantal benodigde dieren te beperken dat noodzakelijk is om wetenschappelijk betrouwbare uitspraken te kunnen doen.

16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven. De onderzoekers nemen alle mogelijke maatregelen om het ongerief van de dieren te beperken, echter het toedienen van een éénmalige, relatief milde voetschok, is kritisch voor het experiment omdat die gebeurtenis het onderzoek naar het geheugen voor stressvolle perioden en gebeurtenissen mogelijk maakt. Eveneens essentieel voor de vergelijking van deze experimenten onderling en met eerdere resultaten, is de individuele huisvesting van de dieren die ongetwijfeld van invloed is op het gedrag. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven proefopzet de meest verfijnde is en dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.* De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed. De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.
17. Het betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. De aanvrager zal in het project alleen gebruik maken van mannelijke dieren. De aanvrager geeft hiervoor de volgende onderbouwing: - de afgifte en effecten van stresshormonen zijn afhankelijk van sexe en ontwikkelingsstadium, - alle voorgaande data waarmee deze resultaten vergeleken zullen worden, zijn verkregen in mannetjes, en – het toedienen van tamoxifen, een oestrogeen receptor ligand noodzakelijk voor de expressie van de tomatokleur in de transgene lijn ter identificatie en lokalisatie van de neuronen, kan invloed hebben op het gedrag in vrouwtjes. De DEC is van mening dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het om de doelstellingen met zo min mogelijk dieren te bereiken noodzakelijk is om de proeven met alleen mannelijke dieren uit te voeren. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.* De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed. De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.
19. De dieren zullen in het kader van het project gedood worden. Dit is noodzakelijk om verschillende weefsels te kunnen onderzoeken voor het beantwoorden van bepaalde onderzoeksvragen. De gebruikte dodingsmethode staat vermeld in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.* De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed. De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.
20. Er worden in deze projectaanvraag geen landbouwhuisdieren, honden, katten of niet-humane primaten gebruikt (en dus ook niet gedood om niet-wetenschappelijke redenen). *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.* De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed. De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.

NTS

21. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd. *De wijziging is verwerkt in de NTS.* De wijziging is verwerkt in de NTS. De wijziging is verwerkt in de nieuwe NTS.

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt het belang van het verkrijgen van meer inzicht in de invloed van de stresshormonen noradrenaline en corticosteron op de kwaliteit van het geheugen en de daarbij betrokken geheugencircuits in het brein, en in de processen die ten grondslag liggen aan het ontwikkelen van een Post Traumatische Stress Stoornis (PTSS) bij patiënten om, op termijn, een therapie te ontwikkelen voor deze patiënten, het ongerief dat de dieren wordt aangedaan, en is aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan? *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.* De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed. De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.

2. Er vindt een matige aantasting van het welzijn en een aantasting van de integriteit van de proefdieren plaats. De doelstellingen kunnen niet zonder dieren behaald worden. De onderzoekers doen al het mogelijke om het lijden van de dieren en het aantal dieren te beperken (beschreven in C9 tot C20).
 Voor patiënten is dit onderzoek op termijn en indirect van belang, omdat het kan bijdragen aan een verbetering van hun geestelijke gezondheid en kwaliteit van leven. De DEC kent daar veel gewicht aan toe om de volgende redenen. Emotionele of stressvolle gebeurtenissen kunnen sterke, blijvende herinneringen veroorzaken. Dit is vooral een adaptief verschijnsel, dat ervoor zorgt dat belangrijke gebeurtenissen goed onthouden worden. Echter, het kan er ook toe leiden dat traumatische gebeurtenissen in het geheugen gegrift lijken te staan, en telkens weer (ongewild) herinnerd worden. Hoewel de herinneringen vaak erg levendig en invasief zijn, met een gevoel voor groot detail, kunnen ze opgehaald worden door willekeurige factoren en onder verschillende omstandigheden, die vaak niet gerelateerd zijn aan het trauma, zoals in PTSS. Momenteel gaan er 7,7 miljoen mensen in Europa alleen al gebukt onder PTSS en lijden daarnaast nog vele miljoenen mensen aan een fobie of een andere angststoornis. Dit belemmert hen sterk in hun sociaal en emotioneel functioneren. De behandelingsmogelijkheden schieten op het moment nog sterk tekort; minder dan de helft van de PTSS patiënten heeft baat bij huidige behandeling. Daarom is het van groot belang beter te begrijpen hoe stresshormonen niet alleen de sterkte van herinneringen beïnvloeden, maar ook hun accuraatheid (juistheid). Het is aannemelijk dat de doelstellingen op termijn behaald zullen worden. De commissie acht het begrip van de werkingsmechanismen van de stresshormonen NA en CORT en de bijdrage die dit op termijn kan leveren aan het ontwikkelen van een nieuwe therapie voor o.a. PTSS patiënten van groot wetenschappelijk en maatschappelijk belang. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.* De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed. De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.

3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: het verkrijgen van meer inzicht in de invloed van de stresshormonen noradrenaline en corticosteron op de kwaliteit van het geheugen en de daarbij betrokken geheugencircuits in het brein, en in de processen die ten grondslag liggen aan het ontwikkelen van een Post Traumatische Stress Stoornis (PTSS). De DEC is van mening dat het wetenschappelijk belang van het onderzoek en de belangen van PTSS-patiënten voldoende zwaar wegen om het schaden van de belangen van de proefdieren (om gevrijwaard te blijven van een aantasting van hun welzijn en integriteit) te rechtvaardigen. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De DEC is van mening dat het project goed is opgezet, en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat zij zal kunnen voorkomen dat mens, dier en het milieu onbedoelde negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. Hoewel er sprake is van een bijzondere categorie van handelingen, het niet toepassen van pijnbestrijding tijdens en na het opzettelijk toedienen van een voetschok, heeft de aanvrager in voldoende mate onderbouwd dat de doelstellingen niet anders bereikt

kunnen worden, omdat het opbouwen van een herinnering aan een stressvolle en pijnlijke ervaring essentieel is voor deze experimenten. De DEC is van mening dat de afwijkende behandeling daarmee acceptabel is.

De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan. *Door de voorgestelde wijziging zijn 2097 extra dieren nodig voor het onderzoek. Er zijn weliswaar veel extra dieren nodig, maar het ongerief voor deze dieren is vergelijkbaar met het ongerief voor de reeds vergunde dieren, en de extra experimenten leveren een belangrijke bijdrage aan het op de juiste wijze kunnen interpreteren / duiden van de resultaten. Per saldo is de commissie daarom nog steeds van oordeel dat het belang van dit onderzoek opweegt tegen de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren.* Door de voorgestelde wijziging zijn 5742 extra dieren nodig voor het beter kunnen beantwoorden van de onderzoeksvragen. Enerzijds gaat het om extra dieren die noodzakelijk zijn om te komen tot wetenschappelijk betrouwbare resultaten, anderzijds gaat het om extra dieren voor experimenten die complementair zijn aan de al vergunde experimenten waardoor uiteindelijk de onderzoeksvragen nauwkeuriger kunnen worden beantwoord. Het ongerief voor deze dieren is vergelijkbaar met het ongerief voor de al vergunde dieren, en het vergroten van de experimentele groepen en de extra experimenten zijn nodig om betrouwbare uitslagen te kunnen verkrijgen en om nauwkeuriger resultaten te krijgen waardoor de onderzoeksvragen preciezer beantwoord kunnen worden. Uiteindelijk is de commissie daarom nog steeds van oordeel dat het belang van dit onderzoek opweegt tegen de onvermijdelijke nadelige gevolgen van de experimenten voor de dieren. De voorgestelde wijziging betreft het toevoegen van 3750 dieren aan deze vergunning. Enerzijds is een deel van deze extra dieren nodig om gedragstesten op twee moeilijkheidsgraden uit te kunnen voeren, zodat zowel remming als bevordering van het geheugen door stresshormonen gemeten kan worden. Dit is noodzakelijk omdat het niet mogelijk blijkt de muizen zodanig te trainen voor de gedragstesten dat hun prestatie met stresshormonen kan verbeteren of verslechteren. Het ongerief voor deze dieren verandert niet door het aanpassen van de moeilijkheidsgraad van de gedragstesten. Anderzijds gaat het om dieren die eerder (per abuis) niet zijn opgevoerd om de benodigde experimenten voor de reeds beschreven en vergunde onderzoeksdoelen uit te kunnen voeren. Het ongerief voor deze dieren is identiek aan het ongerief voor de al vergunde dieren die dezelfde handelingen ondergaan. Het belang van dit onderzoek is onverminderd, en de extra aangevraagde proefdieren zijn noodzakelijk om het onderzoeksdoel te kunnen bereiken. De bevindingen uit eerdere experimenten worden gebruikt voor een zorgvuldige afstemming van vervolgexperimenten, waardoor er zo min mogelijk dieren worden gebruikt. De commissie is daarom andermaal van oordeel dat het belang van dit onderzoek opweegt tegen de onvermijdelijke nadelige gevolgen van de experimenten voor de dieren.

E. Advies

1. Advies aan de CCD
 - x De DEC adviseert de vergunning te verlenen
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
3. Er zijn geen knelpunten of dilemma's geconstateerd – zowel binnen als buiten de context van het project - die de verantwoordelijkheid en competentie van de DEC overstijgen.



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

T.a.v. 10.2 e. en g

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 93118

2509 AC Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD1030020186045-5

Bijlagen

3

Datum 3 november 2020

Betreft Beslissing Wijziging projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2 e. en g

Op 3 september 2020 hebben wij uw aanvraag voor een wijziging op een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Memory generalisation by stress: a neurobiological investigation into the effects of stress hormones on memory accuracy over time" met aanvraagnummer AVD1030020186045-5. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw wijzigingsaanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het vanaf de datum van deze brief is toegestaan om de aangevraagde projectwijziging uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. De vergunning is afgegeven van 11 oktober 2018 tot en met 31 augustus 2023.

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

Procedure

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie RU DEC (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 9 oktober 2020. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Overwegingen

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

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 93118, 2509 AC Den Haag.

Datum:

3 november 2020

Aanvraagnummer:

AVD1030020186045-5

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. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

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 vergunninghouder valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.nl of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

10.2 .e. en g

drs. F. Braunstahl
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Projectvergunning
- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Adres:

Postcode en plaats: NIJMEGEN

Deelnemersnummer: 10300

deze wijziging in de projectvergunning voor het tijdvak 11 oktober 2018 tot en met 31 augustus 2023, voor het project "Memory generalisation by stress: a neurobiological investigation into the effects of stress hormones on memory accuracy over time" met aanvraagnummer AVD1030020186045-5, na advies van dierexperimentencommissie RU DEC.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Assistant Professor.

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

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 3 september 2020
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 14 augustus 2018;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.4.1 Determining the effects of stress hormones on behavioural and neuronal readouts of accuracy and strength of memory over time, zoals ontvangen op 9 oktober 2020;
 - 3.4.4.2 Unravelling the role of a neurotrophic factor (BDNF) in mediating the effects of stress hormones on memory, zoals ontvangen op 9 oktober 2020;
 - 3.4.4.3 Providing causal evidence for the modulation of neural circuit function in the establishment of the effects of stress hormones on memory accuracy, zoals ontvangen op 9 oktober 2020;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 9 oktober 2020;
 - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 9 oktober 2020.

Aanvraagnummer:
AVD1030020186045-5

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
3.4.4.1 Determining the effects of stress hormones on behavioural and neuronal readouts of accuracy and strength of memory over time			
	Muizen (Mus musculus)	2.520 / 3.780	100,0% Matig
3.4.4.2 Unravelling the role of a neurotrophic factor (BDNF) in mediating the effects of stress hormones on memory			
	Muizen (Mus musculus)	5.270	100,0% Matig
3.4.4.3 Providing causal evidence for the modulation of neural circuit function in the establishment of the effects of stress hormones on memory accuracy			
	Muizen (Mus musculus)	6.405 / 8.895	100,0% Matig

Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, tweede lid 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:

AVD1030020186045-5

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, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet 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, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven 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 van de wet 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

Aanvraagnummer:

AVD1030020186045-5

voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn 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 van de wet 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 13c van de wet 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 13d van de wet 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.

Form

Project proposal • This form should be used to write the project proposal of animal procedures.

- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed
- For more information on the project proposal, see our website(www.zbo-ccd.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 10300
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
- 1.3 Provide the title of the project. Better safe than sorry? The role of the extended amygdala circuitry in generalized fear and anxiety

2 Categories

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

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

Learning to fear situations or cues that are predictive of danger is critical for survival. After all, recognizing dangerous situations allows you to react appropriately, like fighting or fleeing, to guarantee your safety. However, when fear becomes excessive or generalizes to harmless cues it becomes destructive. In these situations, being overcautious to environmental cues about harm or danger in order to guarantee safety doesn't outweigh the excessive feelings of fear and anxiety. In other words, it is not better to be safe than sorry. This excessive generalization of fear is presumably the etiological basis for anxiety disorders [1,2]. Patients with anxiety disorders are continuously anxious, even in the complete absence of threatening cues, which can severely impact their quality of life. Currently, approximately 15-18% of the population experiences at least one out of the wide variety of anxiety disorders, e.g. phobias, social anxiety and panic disorder [3,4], generating a substantial burden to society. Although the neural substrates of classical cued fear conditioning have been elaborately studied [5,6], the transition from cue-specific to generalized fear and anxiety is still poorly understood. Animal studies have shown that the bed nucleus stria terminalis (BST) is essential for generalized fear and increased anxiety [7], and that amygdala (hyper)activity determines the extent to which fear generalizes [8-10]. Patient studies have confirmed a role for the BST in anxiety pathophysiology [11-13], and linked both BST activity [14] and amygdala-BST-connectivity [15] to inter-individual differences in anxiety. Therefore, with this project we aim to test the novel hypothesis that fear generalization is induced by a shift in the recruitment of a local amygdala-circuitry essential to the encoding of specific fear to an extended amygdala-BST circuit producing generalized fear across subjects. Moreover, we aim to test whether the generalization of fear is directly related to subsequent, long-lasting anxiety across subjects. In addition, we aim to test whether inter-individual differences in anxiety are mediated by a different offset in this switch, making that the extended amygdala-BST circuit is recruited under already mildly stressful conditions. Further, we subsequently aim to investigate reactivity patterns of the amygdala-circuitry in generating fear and general anxiety behavioural within subjects.

Research has shown that a subset of dopamine neurons are activated by stimuli associated by threat during fear discrimination [19,20]. Suppression of dopamine increases susceptibility to fear and anxiety following a threat, as well as impairs discriminatory fear learning resulting in fear generalization [21-23]. An important site for fear memory formation and dopamine is the CeA [24]. Dopamine antagonists infused into the CeA promote fear generalization in mice that normally discriminate. Conversely, when a D2 receptor agonist was administered to mice that normally generalize, animals show improved fear discrimination [18]. Other research has shown that stimulating dopamine terminals during CS+ presentation prevents fear generalization while inhibiting them promotes generalization [25]. Although a bit is known about the role of dopamine (receptors) in the CeA regarding fear generalization and discrimination, not much is known about the circuits within the amygdala, as well as between the amygdala and BNST, regarding the dopamine pathways during fear generalization. Especially the role of dopamine in the BLA, CeL/CeM & BNSTov, which are all important targets for the main supplier of dopamine, the ventral tegmental area (VTA), is poorly understood. Understanding the role of dopamine in these subnuclei during fear generalization could ultimately result in targeting these areas and thereby preventing or threatening fear generalization in individuals susceptible to developing fear generalization. Therefore, lastly, we aim to test the role of the neurotransmitter dopamine that is proposed to facilitate fear discrimination, in the development of specific or generalized fear and anxiety.

Because the amygdala and BST comprise several functionally heterogeneous nuclei [16], which cannot be dissociated using human neuroimaging techniques (e.g. functional Magnetic Resonance Imaging), we will study this circuit in mice using a variety of behavioural, cellular and molecular techniques to determine the role of the extended amygdala in fear generalization. Besides studying neuronal activity in the extended-amygdala during the experience of an initial fearful episode, we will also study neuronal activity during its recall, and will investigate whether the same circuit coding generalized fear is responsible for mediating more long-term anxiety as a consequence of this episode. We will not only do so by comparing neuronal activity patterns across subjects, but also within subjects by measuring the reactivation of the neurons active during the initial fearful episode

upon fear recall and anxiety. Lastly, we will measure dopamine release in the aforementioned tests in order to establish the role of dopamine in modulating specific/generalized fear recall, as well as in the display of overall anxiety-like behaviour.

In order to do so, we will use the transgenic Fos2A-iCreERTdTomato mouse line [17]. In these mice, the presence of 4-hydroxytamoxifen (4-OHT), induces the permanent fluorescent labeling (by tdTomato expression) of active (i.e., Fos-expressing) neurons in living mice, which allows us to compare active cell populations at different time points within the same animal. We will use this technique to label neurons active during the experience of a fearful episode, and compare these to neurons active during the later expression of generalized fear and anxiety-related behaviour. To distinguish (the neural circuits representing) cue-specific from generalized fear, we will expose mice to different intensities of fearful episodes known to induce these distinct behavioural outcomes. Moreover, we will investigate the neural cause of inter-individual differences in the display of generalized fear and anxiety induced by relatively mildly stressful conditions (i.e., those overall inducing cue-specific fear).

References

1. Craske MG, et al. (2009). What is an anxiety disorder? *Depress Anxiety* 26(12):1066-85
2. Davis M, et al. (2010). Phasic vs sustained fear in rats and humans: role of the extended amygdala in fear vs anxiety. *Neuropsychopharmacology* 35(1):105-35
3. Kessler, R. C., Petukhova, M., Sampson, N. A., Zaslavsky, A. M., & Wittchen, H. U. (2012). Twelve-month and lifetime prevalence and lifetime morbid risk of anxiety and mood disorders in the United States. *International journal of methods in psychiatric research*, 21(3), 169-184.
4. Kessler, R. C., Akiskal, H. S., Ames, M., Birnbaum, H., Greenberg, P., ... & Wang, P. S. (2006). Prevalence and effects of mood disorders on work performance in a nationally representative sample of US workers. *American journal of psychiatry*, 163(9), 1561-1568.
5. LeDoux JE (2000). Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 23: 155-84
6. Maren S, Quirk GJ (2004). Neuronal signalling of fear memory. *Nat Rev Neurosci* 5(11):844-52
7. Maren S, Quirk GJ (2004). Neuronal signalling of fear memory. *Nat Rev Neurosci* 5(11):844-52
8. Duvarci S, et al. (2009). The bed nucleus of the stria terminalis mediates inter-individual variations in anxiety and fear. *J Neurosci* 29(33):10357-61
9. Ciocchi S, et al. (2010). Encoding of conditioned fear in central amygdala inhibitory circuits. *Nature* 468(7321):277-82
10. Ghosh S, Chattarji S (2015). Neuronal encoding of the switch from specific to generalized fear. *Nat Neurosci* 18(1):112-20
11. Botta P, et al. (2015). Regulating anxiety with extrasynaptic inhibition. *Nat Neurosci* 18(10):1493-500
12. Resnik J, Paz R (2015). Fear generalization in the primate amygdala. *Nat Neurosci* 18(2):188-90
13. Münsterkötter AL, et al. (2015). Spider or no spider? Neural correlates of sustained and phasic fear in spider phobia. *Depress Anxiety* 32(9):656-63
14. Brinkmann L, et al. (2017). Distinct phasic and sustained brain responses and connectivity of amygdala and bed nucleus of the stria terminalis during threat anticipation in panic disorder. *Psychol Med* 47(15):2675-88
15. Buff C, et al. (2017). Activity alterations in the bed nucleus of the stria terminalis and amygdala during threat anticipation in generalized anxiety disorder. *Soc Cogn Affect Neurosci* 12(11):1766-74
16. Somerville LH, et al. (2010). Human bed nucleus of the stria terminalis indexes hypervigilant threat monitoring. *Biol Psychiatry* 68(5):416-24
17. Allen, W. E., DeNardo, L. A., Chen, M. Z., Liu, C. D., Loh, K. M., Fenno, L. E., ... & Luo, L. (2017). Thirst-associated preoptic neurons encode an aversive motivational drive. *Science*, 357(6356), 1149-1155
18. De Bundel, D., Zussy, C., Espallergues, J., Gerfen, C. R., Girault, J. A., & Valjent, E. (2016). Dopamine D2 receptors gate generalization of conditioned threat responses through mTORC1 signaling in the extended amygdala. *Molecular psychiatry*, 21(11), 1545.
19. Gore, B. B., Soden, M. E., & Zweifel, L. S. (2014). Visualization of plasticity in fear-evoked calcium signals in midbrain dopamine neurons. *Learning & memory*, 21(11), 575-579.
20. Guarraci, F. A., & Kapp, B. S. (1999). An electrophysiological characterization of ventral tegmental area dopaminergic neurons during differential pavlovian fear conditioning in the awake rabbit. *Behavioural brain research*, 99(2), 169-179.

21. Zweifel, L. S., Parker, J. G., Lobb, C. J., Rainwater, A., Wall, V. Z., Fadok, J. P., ... & Phillips, P. E. (2009). Disruption of NMDAR-dependent burst firing by dopamine neurons provides selective assessment of phasic dopamine-dependent behavior. *Proceedings of the national academy of sciences*, 106(18), 7281-7288.
22. Zweifel, L. S., Fadok, J. P., Argilli, E., Garelick, M. G., Jones, G. L., Dickerson, T. M., ... & Palmiter, R. D. (2011). Activation of dopamine neurons is critical for aversive conditioning and prevention of generalized anxiety. *Nature neuroscience*, 14(5), 620.
23. Jones, G. L., Soden, M. E., Knakal, C. R., Lee, H., Chung, A. S., Merriam, E. B., & Zweifel, L. S. (2015). A genetic link between discriminative fear coding by the lateral amygdala, dopamine, and fear generalization. *Elife*, 4, e08969.
24. Fadok, J. P., Markovic, M., Tovote, P., & Lüthi, A. (2018). New perspectives on central amygdala function. *Current opinion in neurobiology*, 49, 141-147.
25. Jo, Y. S., Heymann, G., & Zweifel, L. S. (2018). Dopamine neurons reflect the uncertainty in fear generalization. *Neuron*, 100(4), 916-925.

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?

Main objective:

The main purpose of the project presented here is to characterize, in detail, the amygdala-BST circuitries mediating cue-specific and generalized fear and anxiety. More specifically, we aim to address the following issues:

- a. Investigating whether a differential amygdala-BST circuitry is involved in the encoding of specific fear vs generalized fear and establishing the role of dopamine in the development of these different phenotypes.
- b. Investigating whether the manifestation of anxiety is mediated by the same amygdala-BST circuitry as encoding generalized fear.
- c. Investigating whether differential recruitment of these circuits mediates inter-individual differences in generalized fear and anxiety.

These objectives are pursued by the execution of 4 sequential and partially dependent lines of experiments:

- Experiment 1. Investigating neuronal activity in amygdala-BST subnuclei related to cue-specific vs generalized fear and anxiety, and establishing the role of dopamine in the development of cue-specific vs generalized fear anxiety phenotypes.
- Experiment 2. Investigating the main projection sites of these activated neurons.
- Experiment 3. Characterizing the type of neurons involved in these main projections by analyzing gene expression profiles.
- Experiment 4. Providing causal evidence for the involvement of these projection neurons in the mediation of generalized fear and anxiety.

Feasibility:

We have the expertise and facilities in-house to perform the required studies. Researchers involved in this study have experience with a similar transgenic mouse line (i.e., FosCreERT2xtdtomato [1]), as well as the use of the proposed techniques (behavioural tests, viral injections, immunohistochemistry, FACS, RNA sequencing, and iDISCO+). This ensures successful execution of the experiments and animal welfare. Furthermore, our experiments are highly adaptable and build upon what we discover in earlier experiments. Even though we will look into certain subnuclei of the brain based on literature, our experiments can also be executed in other subnuclei if our first results would suggest this. Likewise, our go-no go set-up in our final experiment ensures that we will only execute well-thought through experiments with sound experimental basis, with profitable outcomes throughout our entire experiment.

References

1. Guenther, C. J., Miyamichi, K., Yang, H. H., Heller, H. C., & Luo, L. (2013). Permanent genetic access to transiently active neurons via TRAP: targeted recombination in active populations. *Neuron*, 78(5), 773-784.

3.3 Relevance

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

First and foremost, this research will contribute to the current scientific insight into the neural circuits coding for generalized fear. Although quite a lot is known about the specific fear circuits typically recruited by mild fear conditioning, little is known on the circuits that code for generalized fear, potentially involved in mediating anxiety. It is extremely important to also characterize the latter, thereby enabling future scientific research to investigate the circumstances under which this circuit gets activated and possible ways to manipulate this circuit in humans.

Epidemiological studies show that anxiety disorders are highly prevalent and an important cause of functional impairment, usually associated with fear, nervousness and panic, but may also affect the cardiovascular, respiratory and nervous systems [1]. Anxiety disorders have been subdivided into distinct entities such as panic disorder, phobias, posttraumatic stress disorder and general anxiety disorder, with a prevalence between 15-18% in the general population [2]. Besides their impact on quality of life, anxiety-related disorders are associated with a financial burden for patients and society alike. Health and research policies are increasingly influenced by the economic cost of diseases. Annually, neuropsychiatric and neurological disorders make up for a total cost of around 798 billion euros [3], under which both health care and the future economy suffer greatly. Taking the increasing life expectancy into the equation, these numbers are expected to only increase. Therefore, it is important to increase focus on research strategies, prevention, and care to attempt to reduce these costs in the future. New therapeutic options can be explored through the use of well-characterized animal models of neuropsychiatric disorders, as we plan to do here. This project is expected to provide novel scientific insight in the contribution of the amygdala-BST circuitry to generalized fear and anxiety, which is potentially involved in anxiety-related disorders. This is of great importance to improve current treatment, as current treatments for these disorders are not effective in a large number of cases, and anxiety disorders almost never improve spontaneously [4].

References

1. Rakei RE. Differential diagnosis of anxiety. *Psychiatr Ann*. 1981;11(suppl 11):11-14.
2. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 3rd ed. Washington, DC: American Psychiatric Association; 1980
3. Gustavsson, A., Svensson, M., Jacobi, F., Allgulander, C., Alonso, J., Beghi, E., ... & Gannon, B. (2011). Cost of disorders of the brain in Europe 2010. *European neuropsychopharmacology*, 21(10), 718-779.
4. Wittchen HU. *Natural Course and Spontaneous Remissions of Untreated Anxiety Disorders: Results of the Munich Follow-up Study (MFS)*. *Panics and Phobias*. Vol 2. Berlin, Germany: Springer Verlag; 1986.

3.4 Research Strategy

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

In Dec 2019 two go/no go decisions were made about DAP1 main experiment 1. 1) was to not include the anxiety test (elevated plus maze) in our behavioural design. 2) to leave out the CS* tone – the novel tone – because it turned out not have added value. See full explanation in file “Motivation go-no go DAP1-IVD-DG-December2019” under Notes.

In a first experiment (DAP 1), we will analyse the neuronal activation of amygdala-BST subregions induced by a differential auditory fear conditioning paradigm (Fig. 1). As the extent of (induced) fear generalization is modulated by the intensity of the unconditioned stimulus (US)[1], mice will be exposed to one of three conditions; conditioned to either a weak US (inducing specific fear for the conditioned stimulus (CS+)), a strong US (inducing generalized fear to other CS's) or no US, as control. Neurons activated during conditioning will be fluorescently labelled by the injection of 4-hydroxytamoxifen in the Fos2A-iCreERTdTomato mice immediately following conditioning [2]. Fear responses to the conditioned stimulus linked to the US (CS+), the conditioned stimulus linked to the US context but not the US itself (CS-), and a stimulus unrelated to the US (CS*), are tested afterwards to measure fear generalisation (assessed by the differential freezing response to the CS+ compared to other CS's). High freezing levels in response to the CS- and CS* indicate generalized fear, whereas the difference in freezing between the CS- vs CS* is informative on the extent to which the fear generalizes; within or between spatiotemporal contexts. Depending on whether animals will be sacrificed after this fear test or after an anxiety test, animals will be tested on the elevated plus maze to measure general levels of anxiety, after which mice will be sacrificed by perfusion-fixation. Both conditioning (and optionally anxiety-related) neuronal activation will be assessed (the latter using immunohistochemistry) and correlated to behavioural outcome. This enables us to link the induction of generalized fear to anxiety and neuronal activity patterns observed during both tests (Fig. 2A). We hypothesize that a hyperactive basolateral amygdala (BLA) and BST are associated with both the encoding of generalized fear and anxiety. Besides looking into the main effects of conditioning intensity on the recruited circuitry and resulting anxiety, we also aim at investigating inter-individual differences in the display of generalized fear and anxiety. Previous studies have shown that even under the relatively mildly stressful conditions that overall induce cue-specific fear [1], some animals develop generalized fear. Here, we aim to investigate whether these sensitive animals are characterized by an increased recruitment of neurons within the amygdala-BST subnuclei encoding generalized fear. After we have investigated which regional activity dissociates between the two fear phenotypes by comparing activity levels between animals with the use of immunohistochemistry, we will investigate reactivity patterns in these regions within the same animal. For this, we will use the fibre photometry technology, a new technique that allows us to visualize Ca²⁺ and dopamine influx in a targeted population of neurons by genetically encoded Ca²⁺ and dopamine indicators within neurons, with a fast temporal resolution through an optical fiber located at the target brain region. This method allows us to investigate brain activity of each individual animal towards the different tests. This allows us to not only compare the expected shift in brain activity towards the CS+ and the CS- between groups, but also within animals. This is a sophisticated way to research one of the objectives of this project, which aim it is to look into the inter-individual differences in developing fear and anxiety, meaning differences between animals in the same group as opposed to differences between groups, in developing generalized fear and anxiety and how this is represented in the brain, which had not been possible before.

In the first fibre photometry experiment, we will investigate reactivity patterns in the amygdala and BNST by investigating brain activity of these tissues, represented by Ca²⁺ influx. Given that neuronal Ca²⁺ activity correlates with neuronal activity, an increased Ca²⁺-induced fluorescence signal through the fibre indicates a higher neuronal activity of the targeted population in that brain region. We will use this technique as an addition to the previous experiments in this DAP1, as this method provides us with an in vivo marker of neuronal activity with superior temporal resolution that is necessary to contrast neuronal activity induced by the different behavioural components (e.g. re-exposure to multiple tones) within a single animal and link this to its behaviour, as opposed to comparing neuronal activity induced by the tones between subjects (as done in the first experiment). Here, we will target active neurons during fear encoding. Then, we will compare reactivation of those neuronal circuits during fear recall of the CS's in the re-exposure session within the animals. Further, because this technique enables us to measure neuronal activity within animals without having to sacrifice them after each test, as opposed to the first experiment where we did have to sacrifice the animals after one test to gather the brain data, we will also expose the mice to several anxiety tests in order to determine the contribution of the targeted fear representation to generating general anxiety. Here, we chose a battery of anxiety tests, as opposed to 1 single anxiety test, to increase the construct validity of the measurements [8]. We've chosen a battery of different anxiety tests that were available in our lab. The different tests have a few components in common, e.g. testing through locomotion of the animals, however they are certainly not identical [9-11] and therefore results to each test vary within animals within the

groups. Hence, this allows us to better investigate individual differences in developing anxiety, as is also the case in human patients where maladaptive anxiety is not always expressed in a similar way between patients [12,13]. Thereby, as opposed to the previous experiment in this DAP where we were only able to look at the activity of one re-exposure session and compare this between animals, here we are able to compare the reactivation of the fear conditioning neurons during multiple tests within one animal and link this reactivation to their individual specific or generalized phenotype.

Lastly, in the final experiment of DAP1 and the second fibre photometry experiment, we want to investigate the role of the neurotransmitter dopamine in the development of the different fear phenotypes. The extended amygdala is an important target of dopaminergic modulation, with the ventral tegmental area sending dopaminergic projections towards the (baso)lateral amygdala, centrolateral amygdala (CeL), and the oval nucleus of the BNST (BNSTov) (see overview [7]). Dopamine plays an important role in learning and memory, and specifically seems to facilitate fear discrimination between aversive and neutral stimuli in the amygdala and BNST [5-6]. Previous research has shown that blockage of the dopamine receptor 2 during fear conditioning in both the CeL and the BNSTov increases fear generalization responses towards the CS- [1]. Other research has shown that stimulating dopamine terminals during CS+ presentation prevents fear generalization while inhibiting them promotes generalization [14]. In this experiment, we will investigate the contribution of dopamine release in the previously determined regions of the amygdala and BNST in order to establish the role of dopamine in modulating fear recall during re-exposure to the CS's, as well as more general display of anxiety-like behaviour. For this, we will use fiber photometry that allows us to measure dopamine influx with superior temporal resolution. Here, we will expose the mice to the fear conditioning and fear recall sessions towards the CS's, which will give us insight into the dopamine release within the target regions in both the encoding/consolidation and retrieval phases of cued fear discrimination and generalization. Then, we will expose the mice to several anxiety tests (Elevated plus maze, Open Field, Dark-Light transfer test, Marbles burying) allowing us to assess the role of dopamine release in the target regions during the generation/display of anxiety-like behaviours. As argued above, we choose a battery of anxiety tests to increase construct validity of measuring anxiety [8], as well as to investigate individual differences in developing anxiety measured by different tests [12,13].

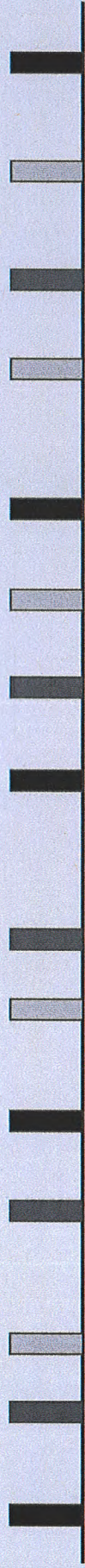
In a next experiment (DAP 2), we aim to dissect the exact activated amygdala-projections (mediating the increased BST-recruitment), by injecting the Fos2A-iCreERxtdTomato mice with a Cre-dependent green-fluorescent-protein (GFP)-expressing virus in the amygdala nuclei recruited by specific vs generalized fear as identified in DAP 1. After recovery from surgery, mice will be exposed to the exact same behavioural procedure as described in DAP 1 (i.e., differential auditory fear conditioning, 4-OHT injection, fear test, anxiety test). Expression of the GFP-marker will be restricted to neurons activated by the conditioning paradigm. To next visualise/quantify the intact amygdala-projections mediating specific vs. generalized fear, the brains will be analysed using the whole brain clearing method iDISCO+ [3] and imaged using light-sheet microscopy (Fig. 2B). This experiment allows us to investigate in more detail how the different levels of activity in the nuclei during specific vs generalized fear and anxiety (discovered in DAP 1) mediate the behavioural response. Again, besides looking at overall group differences between animals exposed to weak vs strong US's (causing overall cue-specific and generalized fear respectively), we will also investigate whether recruitment of the same projections observed in the strong US group can be observed in sensitive animals in the mild US group, and may therefore be the cause of their generalized fear and anxiety phenotype.

Next (in DAP 3), we aim to characterize the recruited projection neurons and enhance insight in the molecular underpinnings of the amygdala-neurons directing the circuit-switch. Therefore, the activated amygdala-projection neurons in both of the groups will be isolated using fluorescence-activated cell sorting (FACS), followed by RNA sequencing (Fig. 2C). Similar to DAP 2, Fos2A-iCreERxtdTomato mice will undergo surgery, but with this time a retrograde Cre-dependent green-fluorescent-protein (GFP)-expressing virus injected into the projection region (identified in DAP 2) to label the recruited projection neurons specifically. Then, mice will be exposed to the exact same behavioural procedure as in the first two experiments (i.e., differential auditory fear conditioning, 4-OHT injection, fear test, anxiety test), after which they will be sacrificed to isolate the brain region (identified in DAP 1) and subsequently sort the recruited cells. This experiment allows us to further investigate which type of projection neurons mediate specific vs generalized fear and anxiety. With the information gathered in this experiment, we will be able to target these neurons in the next experiment (DAP 4). Besides characterizing the neurons

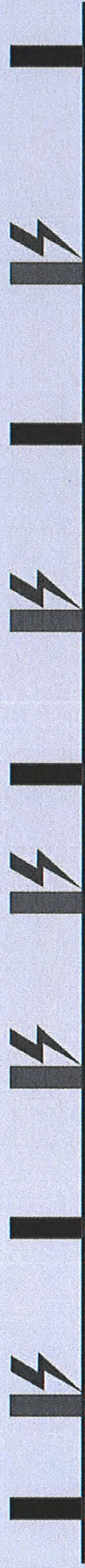
activated by both conditioning protocols, we will also assess differences in neuron recruitment between sensitive (i.e., generalizing) vs insensitive (i.e., displaying cue-specific fear) in the weak US conditioning group. RNA profiling could provide us with insight into the molecular mechanisms underlying differential recruitment of these neurons.

Lastly (in DAP 4), we aim to provide causal evidence for the role of the identified projection neurons in fear generalization and anxiety either by local and systemic drug administration targeting the recruited amygdala cell type as identified in DAP 3, or by activation/suppression of neuronal circuit activation by DREADD technology [4] (Fig.2D). Besides manipulating these neurons to show their sufficiency and necessity in generalized fear and anxiety, we also aim to manipulate these cells molecularly to prevent/reduce generalized fear and anxiety in sensitive animals. Therefore, we will apply gene silencing and overexpression for a target gene identified in DAP 3. Depending on the type of manipulation, either Fos2A-iCreERxtdTomato mice or wild type mice will be subjected to the same behavioural paradigm (i.e., differential auditory fear conditioning, 4-OHT injection, fear test, anxiety test), either before the intervention to target treatment, or after the intervention aimed at prevention, in order to establish causality and the potential for prevention and treatment. This experiment could lead to a possible future strategy to prevent or treat fear generalization and subsequent development of anxiety.

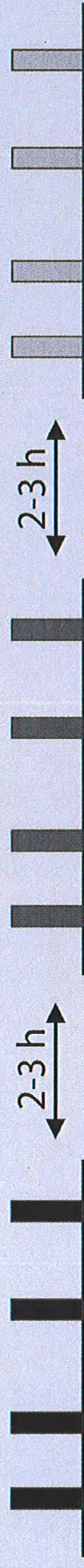
Day 1: Habituation (context A)



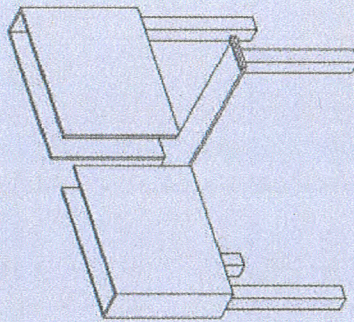
Day 2: Differential auditory fear conditioning (context B)



Day 3 - 5: Test (context A)



Day 4-9: Anxiety test



90 min →

Sacrifice

CS- : Sound A, pulse 5-15s at 85dB

CS+ : Sound B, pulse 5-15s at 85dB

Unrelated CS- : Sound C, pulse at 5-15s at 85dB

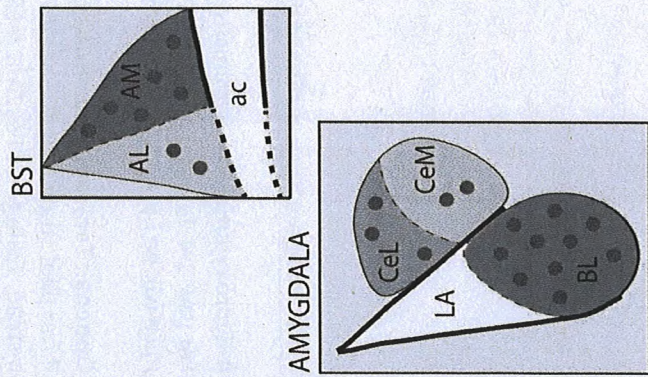
US : no foot shock (control group)

1s mild foot shock (specific fear group)

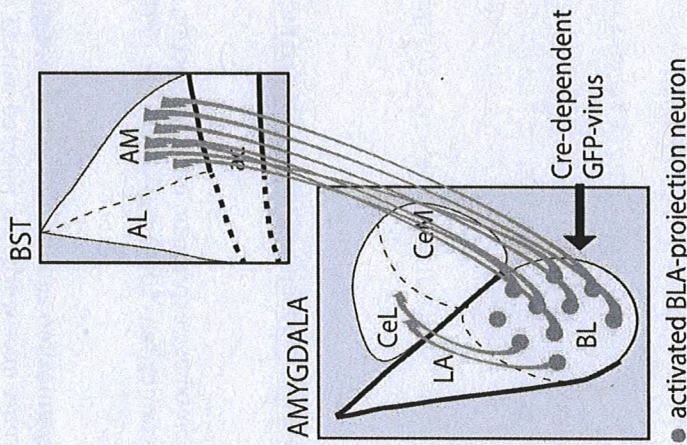
1s severe foot shock (generalized fear group)

Figure 1. Behavioural paradigm

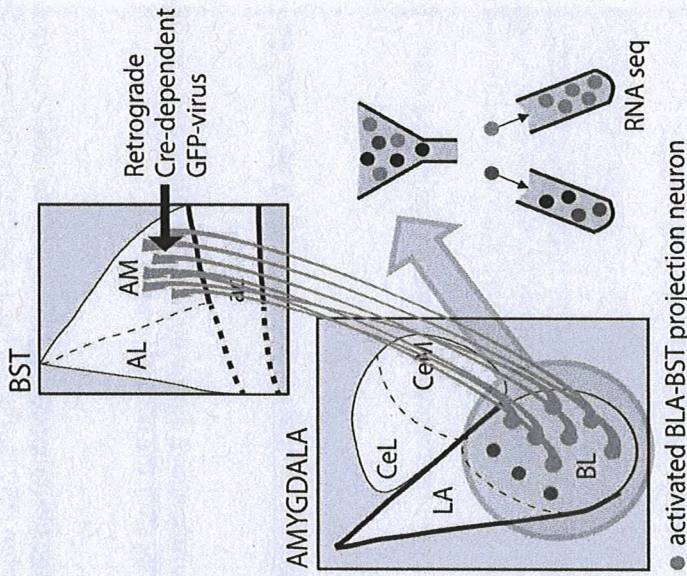
A. Experiment 1



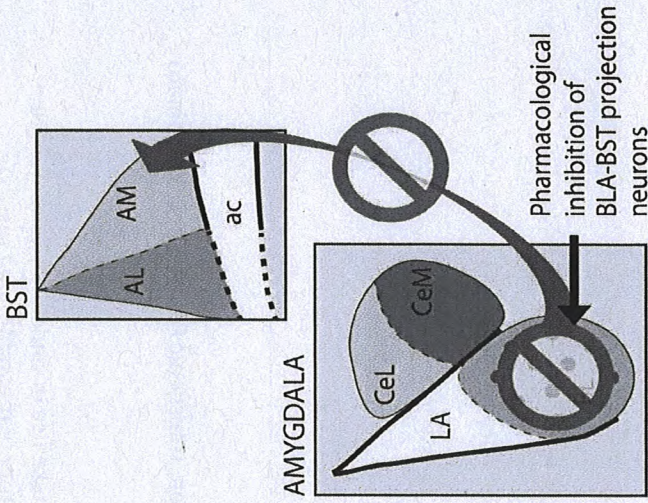
B. Experiment 2



C. Experiment 3



D. Experiment 4



BST; Bed nucleus stria terminalis, GFP; Green fluorescent protein, RNA seq; ribonucleic acid sequencing

LA; Lateral, BL; Basolateral, CeL; Central lateral, CeM; central medial

AL; Anterolateral, AM; Anteromedial, ac: Anterior Commissure

Figure 2. Schematic depictions of the experiments and their potential outcomes. A) Experiment 1: Example of neuronal activity that could be observed during generalized fear and anxiety. B) Experiment 2: Example of the injection of GFP-virus into the basolateral amygdala, resulting in fluorescently labeled projections towards the BST during generalized fear and anxiety. C) Experiment 3: Example of the retrograde GFP-viral injection resulting in the labeling of neurons involved in the amygdala-BST projections. Neurons will be isolated using FACS and RNA sequenced in order to establish the molecular markers (characterization) of these neurons. D) Experiment 4: Possible manipulations of the circuit involved in fear generalization and anxiety by pharmacological intervention.

Legenda: BST; Bed nucleus stria terminalis, GFP; Green Fluorescent Protein, RNA seq; Ribonucleic Acid sequencing

LA; Lateral amygdala, BL; Basolateral amygdala, CeL; Central lateral amygdala, CeM; Central medial amygdala

AL; Anterolateral bed nucleus stria terminalis, AM; Anteromedial bed nucleus stria terminalis, ac; Anterior commissure

References

1. De Bundel D, et al. (2016). Dopamine D2 receptors gate generalization of conditioned threat responses through mTORC1 signaling in the extended amygdala. *Mol Psychiatry* 21(11):1545-53
2. Guenther CJ, et al. (2013). Permanent genetic access to transiently active neurons via TRAP: targeted recombination in active populations. *Neuron* 78(5):773-84
3. Renier N, et al. (2014). iDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. *Cell* 159(4):896-910
4. Burnett CJ, Krashes MJ (2016). Resolving Behavioral Output via Chemogenetic Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs. *J Neurosci* 36(36):9268-82
5. Joshua, M., Adler, A., Mittelman, R., Vaadia, E., & Bergman, H. (2008). Midbrain dopaminergic neurons and striatal cholinergic interneurons encode the difference between reward and aversive events at different epochs of probabilistic classical conditioning trials. *Journal of Neuroscience*, 28(45), 11673-11684.
6. Zweifel, L. S., Fadok, J. P., Argilli, E., Garelick, M. G., Jones, G. L., Dickerson, T. M., ... & Palmiter, R. D. (2011). Activation of dopamine neurons is critical for aversive conditioning and prevention of generalized anxiety. *Nature neuroscience*, 14(5), 620.
7. De Oliveira, A. R., Reimer, A. E., de Macedo, C. E. A., de Carvalho, M. C., de Souza Silva, M. A., & Brandão, M. L. (2011). Conditioned fear is modulated by D2 receptor pathway connecting the ventral tegmental area and basolateral amygdala. *Neurobiology of learning and memory*, 95(1), 37-45.
8. Ramos, A. (2008). Animal models of anxiety: do I need multiple tests?. *Trends in pharmacological sciences*, 29(10), 493-498.
9. Do-Rego, J. C., Viana, A. F., Le Maître, E., Deniel, A., Rates, S. M., Leroux-Nicollet, I., & Costentin, J. (2006). Comparisons between anxiety tests for selection of anxious and non anxious mice. *Behavioural brain research*, 169(2), 282-288.
10. Carola, V., D'Olimpio, F., Brunamonti, E., Mangia, F., & Renzi, P. (2002). Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behavioural brain research*, 134(1-2), 49-57.
11. Kedia, S., & Chattarji, S. (2014). Marble burying as a test of the delayed anxiogenic effects of acute immobilisation stress in mice. *Journal of neuroscience methods*, 233, 150-154.
12. Brinkmann, L., Buff, C., Feldker, K., Neumeister, P., Heitmann, C. Y., Hofmann, D., ... & Straube, T. (2018). Inter-individual differences in trait anxiety shape the functional connectivity between the bed nucleus of the stria terminalis and the amygdala during brief threat processing. *Neuroimage*, 166, 110-116.
13. American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition. Arlington, VA: American Psychiatric Association, 2013.
14. Jo, Y. S., Heymann, G., & Zweifel, L. S. (2018). Dopamine neurons reflect the uncertainty in fear generalization. *Neuron*, 100(4), 916-925.

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.

4-hydroxytamoxifen administration

For DAP 1-4, in order to induce Cre-recombinase expression in the projection neurons active during memory encoding and consolidation, transgenic Fos2A-iCreERxtdTomato mice will be i.p. injected with 4-hydroxytamoxifen (50-70 mg/kg) prior to or shortly after the conditioning.

Optional: Tamoxifen administration.

If our pilot study suggest that 4-hydroxytamoxifen administration does not give the desirable effect with regards to labelling, we will make use of tamoxifen administration instead. Transgenic Fos2A-iCreERxtdTomato mice will be i.p. injected with tamoxifen (150 mg/kg) 12 hours before the differential auditory fear conditioning session.

Behavioural paradigms

Differential auditory fear conditioning

A specific or generalized fear phenotype will be induced in mice and their fear response is being measured (by assessing freezing behaviour). On the first day of the experiment, mice will be habituated to the three auditory cues (CS+, CS-, CS*) in context A. Then on the second day, mice will be presented with 2 of those auditory cues (CS+ and CS-) in context B, one of which will be linked to a foot shock (CS+). Depending on what group the mice are in, they will receive no shocks (control group), mild shocks (cue-specific fear group), or strong shocks (generalized fear group). Then, between day 3 and 5, mice will be re-exposed to the 3 auditory cues in separate sessions (all in context A) and no foot shocks will be given. On this day, their freezing response to each auditory cue will be recorded by use of a video camera.

Anxiety tests

Depending on the experiment, several anxiety tests of diverging degree of adversity can be used to assess anxiety-like behaviour in the mice.

(optional) Elevated plus maze

Between day 4 and 9 (depending on which day animals will be sacrificed and for how long their anxiety phenotype will remain), mice will be tested on the elevated plus maze in order to measure their overall levels of anxiety. Exploration times in the 2 open arms and 2 closed arms will be analysed, where less time spent and distance travelled on the open arms indicates increased anxiety.

Open field

Mice will be tested in the open field. This test is based on the animals' natural conflict between exploration of and the aversion against open, bright areas. The open field apparatus consists of a white Plexiglas box (50 x 50 x 40 cm) lightened with 120 lux. Each mouse will be placed in the corner of the apparatus to initiate a 10 min test session. Time spent in the centre (the inner 25 x 25 cm), distance travelled in the centre, number of visits to the centre, and total distance travelled will be quantified using a camera mounted above the apparatus and analysed by Ethovision software (Noldus, Wageningen, Netherlands).

Dark-light transfer test

The test apparatus consists of a box divided by a partition into two environments: a dark compartment and a brightly illuminated (1000–1100 lux) light compartment. The compartments are connected by a small passage in the centre of the partition. The mice are placed in the dark compartment to initiate a 5 minutes test session. Time spent in the light zone, number of visits to the light zone and the latency entering the light zone will be quantified using a camera mounted above the apparatus and analysed by Ethovision software (Noldus, Wageningen, Netherlands).

Marble burying

Marble burying will be assessed to measure hypervigilance, compulsivity and overall anxiety in the animals. Mice are placed in a compartment illuminated by 5-10 lux with dimensions (30 x 27 x 26 cm) containing 5 cm autoclaved bedding with 20 marbles centrally arranged 4 by 5. Mice are then filmed for 25 min. Videos are scored by counting the number of unburied marbles every 5 minutes until the end of the test.

Sacrifice

For (part of) DAP 1, 2 and 4, mice will be perfused in order to perform immunohistochemistry on the brain material or visualize activated neurons (labelled by tdTomato expression). Mice will be anesthetized with inhalation isoflurane and overdosed by i.p. injection with pentobarbital, 60-90 minutes after the elevated plus maze. Then they will be perfused with phosphate-buffered saline (PBS) and 4% paraformaldehyde (PFA).

For the fibre photometry experiments in DAP 1, to validate viral infection of the correct subnuclei, mice will be sacrificed by perfusion after the behavioural tests. For DAP 3, depending on what proves to be the optimal condition to isolate viable cells, which is tested in our lab right now, mice will be either perfused with PBS, or sacrificed using rapid decapitation in order to perform FACS and RNA sequencing on fresh brain material.

Stereotactic Surgery

For DAP 1, adeno-associated viruses (AAVs) encoding Cre-dependent genetically encoded Ca^{2+} indicators be stereotactically delivered unilaterally into subnuclei of the amygdala and BNST, determined by the experiment in DAP 1, of TRAP2 FosCreERT2xtdTomato mice. For the fibre photometry dopamine release experiments, adeno-associated viruses will be stereotactically delivered unilaterally into subnuclei of the amygdala and BNST, determined by the experiment in DAP 1, of wildtype mice. Following viral injection, an optical branching fibre will be placed in a fibre optic ferrule and will be inserted toward the target brain regions through a small craniotomy. Using a branching fibre will allow us to record from two brain regions at the same time, one predominantly recruited during the encoding of specific fear, and the other mostly involved in generating generalized fear. The ferrule will be further stabilized on the skull with screws and dental acrylic. For DAPs 2 & 3, mice will undergo surgery in which a virus will be bilaterally injected into either a subnucleus of the amygdala or BNST.

Mice will be anesthetized using 4% isoflurane, which will be reduced to 1.5-2% for maintenance during the surgical procedure. Moreover, mice will receive an analgesic during the surgery and 24 h post-surgery in order to minimize discomfort. Structured stereotaxic techniques and a highly standardized protocol for both the surgical procedure as well as pre-, peri-, and post-operative care steps will be followed. Mice will be left to recover for a minimum of 7 days before commencement of the behavioural procedures.

Fibre Photometry.

Before the behavioural testing, mice will be habituated to the experimenter by gentle handling, and will be connected to the optical cables to get acclimated with the procedure. During behavioural testing, mice will be connected to the optical cables for the recording of fluorescent signals. As the optical cables are light in weight and flexible, animals will be able to freely move. To perform fibre photometry measurements, a laser beam will be coupled to an optical commutator and fluorescent signals from the genetically encoded reporters (indicating neuronal activity or dopamine release) can be recorded. This fluorescent signal will be captured by a camera/photomultiplier tube (PMT). Following the measurement, mice will be disconnected from the optical cables and returned to their home-cage.

Intervention

For our last experiment, in order to manipulate the circuitry that induces generalized fear and anxiety, we want to use either a local and systemic drug delivery, or DREADDs. For our systemic drug delivery, Fos2A-iCreERTdTomato mice will be i.p. injected with a registered drug (e.g., a receptor agonist or antagonist) either prior to the differential auditory fear conditioning or prior to the fear recall in order to prevent or treat generalized fear and anxiety. For our local drug delivery, in Fos2A-iCreERTdTomato mice the drug will be infused using an intracranial cannula placed locally into the amygdala or BNST subnucleus that is active during fear generalization (as determined in DAP2) in order to prevent the development of the generalized fear and anxiety phenotype. For our DREADDs, wild type mice will be injected bilaterally with a retrograde virus expressing Cre-recombinase into the same subnucleus as DAP 2 (amygdala/BNST). An inhibitory or excitatory Cre-dependent virus coding the respective DREADD receptors will be injected bilaterally into the same subnucleus as identified in DAP 1 (amygdala/BNST). To induce neuronal activation/inhibition, the cognate ligand Clozapine-N-Oxide will be administered peripherally after the training session. For the gene-expression manipulation, we will deliver a lentivirus either expressing the gene of interest (to induce overexpression) or a short hairpin RNA targeting the gene of interest (to induce gene silencing) as determined in DAP 3, to the hyperactive subnucleus of the amygdala or BNST (determined in DAP 2). For all these approaches, similar procedures as described for the stereotaxic surgery will be followed.

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

The behavioural paradigm is essential to induce the specific or generalized fear phenotype in order to study the underlying mechanisms of the amygdala-BST circuit during specific fear and generalized fear and anxiety, as well as to study the mechanisms underlying differential sensitivity to develop generalized fear. The first experiment is necessary to understand which nuclei within the amygdala and BST are differentially active when compared between fear phenotypes. In the case of different amygdala/BNST nuclei being active between different phenotypes, we will continue with our second experiment. However, in case we do not find any differences between phenotypes in the amygdala or BNST, we will investigate other brain regions. In this highly unlikely situation, we will request for an amendment to continue a similar research in that brain region. The second part of DAP 1, the fibre photometry experiment, enables us to label active neurons during the fear conditioning in order to compare their activity during CS's exposure and several anxiety tests within-animals, to investigate whether this reactivation predicts the individual's levels of fear and anxiety. Further, it also allows us to investigate the role of dopamine during the fear conditioning, re-exposure to the CS's and during anxiety tests within-animals, and thereby link dopamine release to the different fear and anxiety phenotypes.

Our second experiment, in which we will visualize and quantify the main projections of these differences, is based on the (hyper)activity differences that are found in the first experiment, and will provide information on the projection sites of these cells. Once we have identified these projection sites, we would like to look further into the molecular characteristics of these specific projections (to be able to identify targets for treatment), which is described in DAP 3. Lastly, once we have established the characteristics of the neurons involved in these fear phenotype differences and innate inter-individual differences in sensitivity for generalized fear and anxiety, we would like to specifically manipulate their activity with systemic and local pharmacological intervention or DREADDs, and lentiviral manipulation of local gene expression. The type of manipulation used in DAP4 will depend on the outcome of DAP3. In case we find cells that are targetable by use of drugs, we will use a systemic and local drug infusion. In case we find cells that are not targetable by use of drugs, or in case DAP3 yields no results, we will make use of DREADDs.

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	amygdala/BNST neuronal activity assessment in circuit-switch
2	Amygdala/BNST projections in circuit-switch
3	amygdala/BNST cell characteristics assessment
4	amygdala/BNST manipulation

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD1030020186565-5 / 2018-0026
2. Titel van het project: Better safe than sorry? The role of the extended amygdala circuitry in generalized fear and anxiety
3. Titel van de NTS: De rol van het uitgebreide amygdala circuit in gegeneraliseerde angst
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer AVD1030020186565
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: RUDEC
 - telefoonnummer contactpersoon: 024-361 90 75, bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - e-mailadres contactpersoon: dierexperimentencommissie@radboudumc.nl
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 09-03-2020
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 10-03-2020
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en): van 16-03-2020 tot 22-04-2020/29-04-2020 (de beantwoording in eerste instantie is aangevuld op 29-04-2020)
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 22-04-2020/29-04-2020
 - advies aan CCD: 12-05-2020
7. De inhoud van dit project is afgestemd met de IvD en deze heeft geen bezwaren tegen de uitvoering van het project binnen deze instelling.
8. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
9. Correspondentie met de aanvrager:
 - Datum vragen: 16-03-2020
 - Datum antwoorden: 22-04-2020/29-04-2020
 - Gestelde vragen en antwoorden:
 - In het wijzigingsverzoek is onvoldoende beargumenteerd waarom de toegevoegde experimenten binnen de doelstelling van het project vallen. Zou u dit willen verduidelijken?
Antwoord: : De doelstelling van het project en DAP1 is het onderzoeken van de activiteit van de sub-gebieden van de amygdala en bed nucleus stria terminalis (BNST) in het geval van specifieke fear vs gegeneraliseerde fear en anxiety. Hier is de hypothese dat met name een verschuiving van activiteit tussen de sub-gebieden van de amygdala en de bed nucleus in een verandering van het fenotype (specifiek vs. gegeneraliseerd) resulteert. De toegevoegde experimenten vallen op 2 wijzen binnen de doelstelling:
 - 1. *In de huidige projectopstelling van hoofdexperiment 1 van DAP1 zijn wij in staat geweest om naar de hersenactiviteit te kijken van 1 meetmoment van de re-exposure sessie. Praktisch gezien betekent dit dat wij van elk dier alleen de hersenactiviteit van de reactie op de CS+ (de toon gekoppeld aan de voetschok) of de reactie op de CS- (de toon niet gekoppeld aan de*

voetschok) kunnen bekijken. Vervolgens voegen we deze dieren samen in hun groep (de specifieke of gegeneraliseerde fear en anxiety groep) en kijken we naar de gemiddelde hersenactiviteit van elke groep op de CS+ en de CS-. Echter, met het toevoegen van de voorgestelde experimenten zullen wij in staat zijn om de hersenactiviteit van elk dier op meerdere momenten te bekijken. Hierdoor zijn wij in staat om niet alleen per groep een mogelijke verschuiving van hersenactiviteit in de sub-gebieden te bekijken, maar zelfs per dier de hersenactiviteit als reactie op de CS+ en de CS-. Omdat de doelstelling van ons project onder anderen het bestuderen van interindividuele verschillen omvat, dwz verschillen tussen individuen en niet noodzakelijk tussen groepen, biedt het toevoegen van de fibre photometry experimenten een verfijnde manier om dit toch te onderzoeken, waar dit eerder niet mogelijk was.

2. Naast het herhaaldelijk meten van de activiteit van de sub-gebieden van de amygdala en BNST dmv het meten van de calcium influx, geeft de nieuwe fibre photometry techniek ook de mogelijkheid om op een relatief gemakkelijke wijze dopamine influx herhaaldelijk te meten welke als een belangrijke neurotransmitter wordt gezien in fear generalisatie en anxiety. Hier waren wij eerder met de methodes in ons lab niet toe in staat.
3. In hoofdexperiment 1 van DAP1 hebben wij uiteindelijk alleen fear gemeten, en geen anxiety. De keuze hiervoor is in het antwoord op de volgende vraag uitgebreid beargumenteerd. Kort samengevat, wij zijn niet in staat geweest om te bepalen of de gebieden die verhoogde activiteit laten zien tijdens specifieke of gegeneraliseerde fear, en met name de verschuiving van deze representatie in de gebieden, hetzelfde zijn als voor anxiety.

- In december 2019 is in samenspraak met de IvD besloten om het gedragsexperiment juist achterwege te laten. Kunt u duidelijker uitleggen waarom deze beslissing destijds is genomen, en waarom u nu weer nieuwe gedragstesten toevoegt?

Antwoord: In december 2019 is in samenspraak met de IvD besloten om 2 onderdelen uit het hoofdexperiment van DAP1 (2018-0026-004) achterwege te laten, namelijk één van de CS'en en de anxiety test. In de originele aanvraag vond er een perfusie plaats na de anxiety test, waardoor wij in staat zouden zijn om hersencellen die actief waren tijdens de anxiety test te kleuren. Hierdoor zouden wij een van de hoofdvragen van DAP1 kunnen beantwoorden, die onderzoekt welke sub-gebieden in de amygdala en bed nucleus actief zijn in het geval van anxiety. In de pilots voorafgaand aan het hoofdexperiment van DAP1, hebben wij echter gemerkt dat de gedragsresultaten van de re-exposure sessie, een test die specifieke of gegeneraliseerde fear meet voorafgaand aan de anxiety test, interessanter bleken dan de gedragsresultaten van de anxiety test. Omdat wij door de perfusie, in combinatie met de immunokleuringen, maar in staat zijn om van 1 moment actieve hersencellen te labelen hebben wij destijds een keuze moeten maken. Wij hebben destijds, toen al met het oog op de huidige aanvraag, in overleg besloten dat het voor de originele hoofdaanvraag interessanter zou zijn om te focussen op het fear gedrag en de daarbij horende actieve hersencellen, om later pas anxiety te bestuderen. Wellicht onduidelijk uit de notitie die door ons onderzoekers gemaakt is in dit overleg, is dat het achterwege laten van de anxiety test alleen bedoeld was voor het hoofdexperiment van DAP1.

In het hoofdexperiment van DAP1 zijn wij door deze beslissing dus slechts in staat geweest om 1 van de hoofdvragen te onderzoeken, namelijk hoe specifieke of gegeneraliseerde fear gerepresenteerd wordt in de sub-gebieden van de amygdala en de bed nucleus. Echter, ons andere hoofddoel, namelijk de representatie van anxiety in deze sub-gebieden, hebben wij dus niet kunnen onderzoeken. Met de fibre photometry techniek in de huidige aanvraag is het mogelijk om herhaaldelijk actieve hersencellen in deze sub-gebieden te meten zonder het dier te hoeven opofferen. Om al onze hoofddoelen van DAP1 te kunnen beantwoorden hebben we daarom anxiety testen toegevoegd aan deze aanvraag.

-Binnen het wijzigingsverzoek worden ook verschillende gedragstesten toegevoegd, maar de onderbouwing daarvoor ontbreekt. Zo wordt niet duidelijk waarom niet kan worden volstaan met één gedragstest, wat de resultaten van elke gedragstest zullen toevoegen, en waarom alle testen noodzakelijk zijn om de doelstelling van het onderzoek te bereiken.

Antwoord: In het hoofdexperiment van DAP1 is voorheen slechts de elevated plus maze aangevraagd. Dit had als voornaamste reden dat de hersenactiviteit van maar 1 moment gemeten kon worden. Met de nieuwe fibre photometry techniek is het mogelijk om tijdens meerdere testen de hersenactiviteit te meten. Door het in gebruik nemen van meerdere anxiety testen zijn wij in staat om de uiteindelijke construct validiteit van de te meten construct 'anxiety' te verhogen. Immers, het meermaals meten van een construct (in dit geval anxiety) geniet per definitie de voorkeur dan één enkele meting voor de validiteit van het resultaat [9]. De verschillende ongeconditioneerde anxiety testen overlappen op een aantal parameters (ze meten bijvoorbeeld allen anxiety dmv locomotion), maar ze zijn zeker niet identiek waardoor dieren in verschillende testen ook verschillende mate van anxiety worden toegemeten [10-12]. Met name in dit onderzoek, waarin we o.a. individuele verschillen voor het ontwikkelen van gegeneraliseerde anxiety onderzoeken, zouden we individuele verschillen in het ontwikkelen en uiten van anxiety kunnen missen als er maar door 1 soort anxiety test gemeten wordt.

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een wijziging op een vergunning. Aanvullend advies van de DEC over de wijziging is, in blauwe tekst, ingevoegd in de tekst van het meest recente advies (d.d. 04-07-2020) hieronder.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er is geen betrokkenheid van DEC-leden bij deze projectaanvraag, waardoor onafhankelijkheid en onpartijdigheid zijn gewaarborgd.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze fundamenteel wetenschappelijke aanvraag richt zich op het achterhalen van het mechanisme dat verantwoordelijk is voor de generalisatie van angst. De onderzoekers willen bij muizen de hypothese testen dat angstgeneralisatie ontstaat als gevolg van een verschuiving van de activiteit van de lokale amygdala circuits betrokken bij specifieke angst naar een uitgebreider amygdala - bed nucleus stria terminalis (BST) circuit dat gegeneraliseerde angst veroorzaakt. Voorts willen zij onderzoeken of gegeneraliseerde angst direct gerelateerd is aan langdurige gegeneraliseerde angstigheid, en of individuele verschillen in gegeneraliseerde angstigheid veroorzaakt worden door een verschil in het moment waarop de verschuiving in betrokken amygdala circuits plaatsvindt. Deze onderzoeksvragen worden achtereenvolgens onderzocht met gedragstesten, en cellulaire en moleculaire technieken in genetisch gemodificeerde muizen waarin activiteit van neuronen eenvoudig zichtbaar gemaakt kan worden. De commissie constateert op grond van de beschrijving van de doelstellingen en de gekozen aanpak dat deze aanvraag een concrete, goed afgebakende doelstelling heeft en getypeerd kan worden als een project. De opzet komt het best overeen met voorbeeld 1 uit de 'Handreiking invulling definitie project'. De verschillende subdoelen volgen logisch op elkaar en zijn noodzakelijk om de

doelstelling te behalen. Het is niet mogelijk om de individuele doelen te toetsen, omdat er sprake is van onderlinge afhankelijkheid en zij tezamen een geïntegreerd begrip van de generalisatie van angst geven. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft, zowel binnen de doelstellingen en bijlagen dierproeven, als tussen de doelstellingen, beschreven op basis van welke criteria zij zal besluiten het project voort te zetten. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. *De voorgestelde wijziging heeft betrekking op de pilotexperimenten waarin de omstandigheden voor het induceren van gegeneraliseerde of specifieke angst worden uitgetest. Tot nu toe zijn de onderzoekers er niet in geslaagd om specifieke angst bij de muizen te induceren. De commissie is van mening dat de onderzoekers voldoende aannemelijk hebben gemaakt dat er extra muizen nodig zijn om de juiste omstandigheden voor inductie van specifieke angst te vinden, en dat dit noodzakelijk is alvorens met de rest van de experimenten gestart kan worden.* De voorgestelde wijziging betreft het toevoegen van 202 extra dieren aan bijlage 1 om fiberfotometrie te kunnen toepassen in dit onderzoek, en het uitbreiden van het onderzoek met meerdere anxiety testen. De fiberfotometrie techniek maakt het mogelijk om herhaaldelijk metingen te doen aan bepaalde hersengebieden bij hetzelfde dier, waardoor reacties op verschillende stimuli en gedragstesten vergeleken kunnen worden. Onderzoek naar de betrokkenheid van hersengebieden vond tot nu toe plaats door middel van immunokleuringen van de hersenen (waarvoor het dier eerst gedood moet worden) Vergelijkingen tussen reacties op stimuli en gedragstesten van hetzelfde dier waren hiermee niet mogelijk. De voorgestelde wijziging zorgt voor een verfijning van het onderzoek, waardoor de oorspronkelijke doelstellingen van het project uitgebreider onderzocht kunnen worden, en ook de rol van dopamine in het verwerken en herinneren van angstige situaties bestudeerd kan worden.

2. Voor zover de DEC weet is er geen "tegenstrijdige" wetgeving die het uitvoeren van de experimenten in de weg zou kunnen staan. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.* De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.* De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is de amygdala circuits identificeren die betrokken zijn bij specifieke angst, dan wel gegeneraliseerde angst. Het uiteindelijke doel is een bijdrage te leveren aan de behandeling van met name die angststoornissen waarbij gegeneraliseerde angst waarschijnlijk ook een rol speelt. Deze basaal wetenschappelijke aanvraag richt zich op hetgeen zich afspeelt in de verschillende amygdala circuits in muizenhersenen bij de inductie van specifieke angst en bij de generaliseerde angst. Ook wordt getest of medicatie hierop van invloed is, hetgeen een eerste indicatie is voor mogelijkheden voor (preventieve) behandeling. Er is daarom binnen deze aanvraag wel een reële maar geen directe relatie tussen het doel van deze projectaanvraag en het uiteindelijke doel. De aanvrager heeft duidelijk gemaakt dat de kennis van gegeneraliseerde angst en de hersencircuits die daarbij betrokken zijn nog zeer beperkt is, dat deze kennis nodig is voor de ontwikkeling van nieuwe behandelingen voor angststoornissen, en dat er behoefte is aan nieuwe behandelingen. Naar de mening van de DEC is het doel van deze projectaanvraag daarom gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld. *De*